

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MESANE ÜROTELİAL KARSİNOMLARININ TANISI  
VE İZLEMİNDE İDRAR SİTOLOJİSİ VE FLORESAN İN SİTU  
HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİNİN GÜVENİLİRLİĞİ**

**Dr. Bora GÜREL**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA  
2007

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MESANE ÜROTELİAL KARSİNOMLARININ TANISI  
VE İZLEMİNDE İDRAR SİTOLOJİSİ VE FLORESAN İN SİTU  
HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİNİN GÜVENİLİRLİĞİ**

**Dr. Bora GÜREL**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar FIRAT**

ANKARA  
2007

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında büyük emeği geçen tez danıŐmanım sayın Doç. Dr. Pınar Fırat'a; özellikle tez laboratuvar altyapısının hazırlanmasında benden hiçbir desteği esirgemeyen sayın Prof. Dr. AyŐegül Üner, sayın Prof. Dr. Arzu Sungur ve sayın Prof. Dr. Haluk zen'e; istatistik hesaplamalarda bizden bilgilerini esirgemeyen sayın Dr. Anıl Barak'a ve tüm Patoloji Anabilim dalı ve Sitoloji Ünitesi đretim üyeleri, asistanları ve çalıŐanlarına teŐekkürü borç bilirim.

**Dr. Bora GÜREL**

## ÖZET

**Gürel, B. Mesane ürotelial karsinomlarının tanısı ve izleminde idrar sitolojisi ve floresan in situ hibridizasyon yöntemlerinin güvenilirliği. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Tezi. Ankara, 2007.**

Mesane karsinomlarının tanı ve izleminde idrar sitolojisi, sistoskopi ile beraber rutin olarak kullanılan bir yöntemdir; ancak duyarlılığı, özellikle düşük dereceli ürotelial karsinomların tanısında oldukça düşüktür. İdrar sitolojisinin duyarlılığını artırmak amacı ile birçok ek biyokimyasal ve moleküler patolojik teknik geliştirilmiştir. Bu araştırmada, bu yöntemlerden biri olan çok renkli, çok problu floresan in situ hibridizasyon yönteminin (FISH) mesane ürotelial karsinomlarının tanısı ve izleminde duyarlılık ve seçiciliğini araştırmak, tanısal güvenilirliğini idrar sitolojisi ile karşılaştırmak amaçlanmıştır. Bu çalışma histopatolojik ve/veya klinik izlemi olan 54 hastanın mesane yıkama sıvıları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çok renkli çok problu FISH yönteminin duyarlılığı (%77.7) ve seçiciliği (%100) idrar sitolojisine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. İdrar sitolojisi ile olguların %22.5'i benign ya da malign olarak sınıflanamayarak atipik tanısı almış, bu tanı negatif sonuç olarak kabul edildiğinde sitolojinin duyarlılığın %38.8, seçiciliğinin %100; atipik tanısı pozitif sonuç olarak değerlendirildiğinde duyarlılığın %66.6, seçiciliğinin %81.8 olduğu görülmüştür. Sitolojide atipik olarak değerlendirilen dokuz olgudan yedisi FISH ile doğru sınıflanmıştır. Her iki inceleme yönteminin de yüksek dereceli neoplazileri saptamada düşük dereceli neoplazilere göre daha duyarlı olduğu dikkati çekmiş, düşük dereceli neoplazilerde daha belirgin olmak üzere, her iki grupta da FISH testinin sitolojiye göre daha çok olguda pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Ürotelyal karsinomların tanısında çok renkli çok problu FISH yönteminin, idrar sitolojisine ek olarak, özellikle tanı zorluğu yaşanan olgularda etkili ve güvenilir bir tanı yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Ürotelial karsinom, sitoloji, FISH

## ABSTRACT

**Gurel, B. The reliability of urine cytology and fluorescent in situ hybridization techniques in the diagnosis and follow-up of urothelial carcinomas of the urinary bladder. Hacettepe University School of Medicine, Thesis in Medical Pathology, Ankara, 2007.**

Urine cytology, as a noninvasive, inexpensive and simple test, has been used alongside cystoscopy in the diagnosis and follow-up of bladder carcinomas. However, the sensitivity of urine cytology is especially low in the diagnosis of low grade urothelial carcinomas. A number of biochemical and molecular techniques have been developed to increase the sensitivity of urine cytology. The aim of this study is to evaluate the value of fluorescent in situ hybridization in the diagnosis and follow up of urothelial carcinomas and compare its reliability with urine cytology. This study was performed on the bladder washings of 54 patients with histopathological and/or clinical follow-up data. The sensitivity (77%) and specificity (100%) of multicolor multiprobe fluorescent in situ hybridization has been found to be significantly higher than that of urine cytology. 22.5% of cases has been diagnosed as atypical using urine cytology. When atypical cases were included in the benign group, the sensitivity of urine cytology was found to be 38.8% and the specificity was 100%, whereas when these cases were included in the malignant group, the sensitivity was calculated as 66.6% and the specificity as 81.8%. seven of nine cases diagnosed as atypical using urine cytology was correctly diagnosed using FISH. Both methods were found to have higher sensitivity in diagnosing high grade urothelial carcinomas compared to low grade carcinomas, and the FISH test was found to be of higher sensitivity and specificity in both grades, especially in low grade carcinomas. It is our opinion that multicolor multiprobe FISH can be used in addition to urine cytology in the diagnosis of urothelial carcinomas, especially in cases showing diagnostic difficulty.

**Keywords:** Urothelial carcinoma, cytology, FISH

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER.....	vi
TABLolar.....	vii
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mesane Tümörlerinde Epidemiyoloji ve Etyoloji.....	3
2.2. Mesane Epiteli Histolojisi.....	4
2.3. Mesane Karsinomu Patolojisi.....	5
2.4. Mesane Karsinomlarında Sitoloji.....	10
2.5. Mesane Karsinomu Tanısında Kullanılan Ek Yöntemler.....	17
2.6. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi.....	19
MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Örnek toplama.....	23
3.2. Örnek fiksasyon işlemleri.....	24
3.3. Preparat hazırlama işlemleri.....	24
3.4. FISH Probu.....	25
3.5. FISH öncesi preparat ön hazırlık işlemleri.....	25
3.6. FISH işlemleri.....	25
3.7. Hibridizasyon sonrası yıkama.....	26
3.8. Preparatların incelenmesi.....	29
3.9. Bulguların değerlendirilmesi ve istatistik analizler.....	30
BULGULAR.....	33
TARTIŞMA.....	48
SONUÇLAR.....	55
KAYNAKLAR.....	557
EKLER.....	65

## KISALTMALAR

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BLCA4	Mesane Kanseri Antijeni 4
BTA	Mesane Tümör Antijeni
CEP	<i>Chromosome Enumeration Probe</i>
CIS	Karsinoma in Situ
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FDP	Fibrin Yıkım Ürünleri
FISH	Floresan İn Situ Hibridizasyon
HA	Hyaluronik Asit
Haase	Hyaluronidaz
LSI	<i>Locus Specific Identifier</i>
NMP22	Üriner Nükleer Matriks Protein 22
NP-40	Nonidet P-40
p	<i>Probability</i>
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PUNLMP	<i>Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SSC	Salin Sodyum Sitrat
SKY	<i>Spectral Karyotyping</i>
TPA	Doku Polipeptid Antijeni
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Normal ürotelial epitel.....	5
2.2. Ürotelial Neoplaziler.....	8
2.3. Benign idrar sitolojisi.....	12
2.4. Ürotelial hücrelerde karşılaşılan çeşitli benign morfolojiler.....	13
2.5. Malign idrar sitolojisi.....	14
2.6. İdrar sitolojisinde tanıda sorun yaratan çeşitli faktörler.....	16
3.1. İdrar örneğinin toplanmasından FISH boyanmasına kadar sırası ile geçirdiği işlemler.....	27
3.2. İdrar örneğinin toplanmasından FISH boyanmasına kadar sırası ile geçirdiği işlemler.....	28
4.1 Normal bir ürotelial hücre grubunun FISH mikroskopunda çeşitli filtreler ile değerlendirilmesi.....	35
4.2. Malign hücrelerin FISH mikroskopunda incelenmesi.....	36
4.3. Sadece p16 delesyonu gösteren malign hücreler.....	37
4.4. Her bir kromozom için elde edilen ROC eğrileri.....	41

## TABLOLAR

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. American Joint Committee on Cancer (AJCC)'e göre Mesane Tumorü Evreleri.....	6
2.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Ürotelial Neoplazi Histolojik Sınıflandırması, 2004.....	6
2.3. Ürotelial Papiller Lezyonların Histolojik Özellikleri.....	7
2.4. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2004 Sınıflamasının İlk Tanı Evresi, Progresyon ve Prognoz ile İlişkisi. ....	9
2.5. Örnekleme yöntemlerine bağlı sitolojik farklar. ....	10
2.6. Reaktif epitel, düşük malignite potansiyelli ürotelial neoplazi (PUNLMP), düşük dereceli ürotelial karsinom, yüksek dereceli ürotelial karsinom ve ürotelial karsinoma in situ (CIS) sitolojik ayırıcı tanısı.....	15
2.7. Çeşitli İdrar Bazlı Mesane Tumor Testlerinin İdrar Sitolojisi ile Karşılaştırmalı Duyarlılık ve Seçicilikleri. ....	17
2.8. 2000-2007 yılları arasında yayınlanan bazı araştırmalarda FISH ve İdrar sitolojisi yöntemlerinin duyarlılık ve seçiciliğinin karşılaştırılması. ....	21
4.1. Sitolojik tanıların histopatolojik tanıları ve klinik veriler ile karşılaştırılması. ....	34
4.2. Çok problu çok renkli FISH testi sonuçlarının histopatolojik tanıları ve klinik veriler ile karşılaştırılması.....	38
4.3. Düşük dereceli ve yüksek dereceli ürotelyal neoplazilere idrar sitolojisi ile verilen tanıları.....	38
4.4. Düşük dereceli ve yüksek dereceli ürotelyal neoplazilerde çok problu çok renkli FISH sonuçları.....	39

4.5.	Benign ve malign hasta gruplarında tarama ve sayma yöntemi ile bulunan ortalama anormal hücre sayılarının incelenen kromozomlara göre dökümü. ....	40
4.6.	ROC analizi yöntemi ile elde edilen kesim noktalarına göre hesaplanan duyarlılık ve seçicilik değerlerinin incelenen kromozomlara göre dökümü. ....	42
4.7.	Benign ve malign hasta gruplarında, her örnekte saptanan anöploidi gösteren hücre sayısı ve ROC analizine göre her kromozom için ayrı olarak belirlenen kesim noktalarına göre duyarlılık ve seçicilik değerleri. ....	43
4.8.	FISH tanısında kullanılan malignite kriterleri .....	44
4.9.	Benign ve malign hasta gruplarında, her örnekte izlenen anormal hücre sayısı ve ROC analizine göre her kriter için ayrı olarak belirlenen kesim noktalarına göre duyarlılık ve seçicilik değerleri. ....	45
4.10.	FISH malignite kriterlerinin ROC analizi ile hesaplanan kesim noktalarına göre duyarlılık ve seçicilikleri. ....	46
5.1.	UroVysion yöntemi ve idrar sitolojisinin karşılaştırıldığı yayınlarda ürotelial neoplazinin derecesine göre duyarlılıklar. ....	50
5.2.	Araştırmamızda uygulanan sayma ve tarama yöntemleri ile saptanan duyarlılığının Sokolova ve arkadaşlarının elde ettiği orijinal değerler ile karşılaştırılması. ....	52

## GİRİŞ

Mesane kanseri, prostat karsinomlarından sonra en sık görülen üriner sistem malignitesi olması yanı sıra<sup>1</sup>, özellikle izlem ve tedavisinde karşılaşılan özgün sorunlar nedeniyle dikkat çeken bir olgu grubudur. Mesane malignitelerinin büyük bölümünü ürotelial karsinomlar oluşturmaktadır. Bu neoplazmlar yüksek oranda (%75) rekürrens göstermekte<sup>1</sup> ve noninvaziv formlarında %5-30 oranında invaziv tümöre progresyon görülmektedir<sup>2</sup>. Mesane karsinomlarının tanısında ve özellikle takibinde sistoskopi ve idrar sitolojisi birlikte kullanılmaktadır. Sistoskopi primer papiller karsinomların tanısında duyarlı olmasına karşın, pahalı ve invaziv bir yöntemdir ve papiller olmayan lezyonların (örn. “Flat” karsinoma in situ) tanısında duyarlılığı düşüktür.<sup>1</sup> Buna karşın, idrar sitolojisi noninvaziv, ucuz ve kolay bir yöntemdir. İdrar sitolojisi özellikle yüksek dereceli lezyonların tanısında yüksek duyarlılığa (%95) sahip olmasına karşın, düşük dereceli neoplazilerin tanısında duyarlılığı %15-20'lere kadar düşmektedir.<sup>1</sup>

Bu sebeplerden dolayı, ne sistoskopi, ne de idrar sitolojisi mesane ürotelial karsinomlarının erken tanısında veya takibinde tek başına güvenilir bir tetkik olamamaktadır. Bu nedenle, idrar sitolojisinin duyarlılığını -özellikle düşük dereceli lezyonlar söz konusu olduğunda- arttırmak ve hastaları gereksiz sistoskopiden korumak amacı ile birçok ek biyokimyasal ve moleküler patolojik teknik geliştirilmiştir.<sup>3,4,5</sup> İdrar sitolojisine ek olarak yapılan çok problu çok renkli floresan in situ hibridizasyon (FISH) yönteminin idrar sitolojisinin duyarlılığını arttırırken, yüksek özgüllük sağladığı bildirilmektedir.<sup>6</sup>

Bu çalışmada, mesane ürotelial karsinomlarının erken tanısı ve operasyon sonrası rekürrens takibinde idrar örneklerine uygulanan çok problu çok renkli FISH tekniğinin duyarlılık ve seçiciliğini araştırmak ve tanısal güvenilirliğini idrar

sitolojisi ile karşılaştırmak; ürotelyal karsinomların sitomorfolojik tanı özelliklerini gözden geçirmek; çok renkli çok problu FISH yönteminin kendi laboratuvarımız için pozitif tanı kriterlerini ve ideal kesim noktalarını belirlemek amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mesane Tümörlerinde Epidemiyoloji ve Etyoloji.

Mesane karsinomları, 2003 yılı Dünya Sağlık Örgütü kanser istatistiklerine göre 336.000 yeni vaka ile tüm kanserler arasında dünyada dokuzuncu en sık<sup>7</sup>, Amerikan Kanser Topluluğu 2007 yılı kanser istatistiklerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde 50.040 vaka ile dördüncü en sık<sup>8</sup> görülen kanser olarak yer almaktadır. Avrupa Topluluğu Ülkelerinde mesane karsinomu yılda 91.000 vaka ile yine dördüncü sırada bildirilmiştir<sup>9</sup>. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 1999 yılı verilerine göre de mesane karsinomları 1165 yeni vaka ile üçüncü sırada bulunmaktadır<sup>10</sup>. Japonya, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Topluluğu gibi sanayileşmiş toplumlarda gelişmekte olan ülkelere kıyasla mesane kanseri insidansı yaklaşık 2 kat, prevalans ise 6 kat daha yüksektir<sup>11,12</sup>.

Mesane kanseri, erkeklerde kadınlara oranla belirgin olarak daha sıktır (erkek: kadın insidans oranı yaklaşık 3.1:1)<sup>7,12</sup>. Ortalama yaş 65-70 olup, hastaların büyük çoğunluğu ilk tanı konulduğu anda 50 yaşından büyüktür. Erkeklerde mesane kanserinin yaş dağılımı çok daha geniştir; kadınlarda 40 yaşından önce mesane kanseri neredeyse hiç görülmezken, erkeklerde adolesan çağda bile mesane kanseri görülebilmektedir<sup>13</sup>.

Mesane böbrek tarafından dolaşımdan süzülen toksik bileşiklerin yoğunlaştığı veya yoğun bir biçimde biriktiği bir organ olduğundan, dış kaynaklı karsinojen ajanlara duyarlılığı yükselmektedir. Mesane kanseri etyolojisinde özellikle aromatik amin bileşiklerinin (örn. benzidin ve naftilamin) oynadığı rol uzun zamandan beri bilinmektedir<sup>12-14</sup>.

Gelişmiş ülkelerde mesane kanseri etyolojisinde en büyük risk faktörü olarak sigara içimi gösterilmektedir<sup>13-15</sup>. Gelişmiş ülkelerde erkeklerde görülen mesane kanserlerinin %65'inden, kadınlarda görülen mesane kanserlerinin ise %35'inden sigara içimi sorumlu tutulmaktadır. Bunun sebebinin sigara dumanında bulunan aromatik aminler olduğu düşünülmektedir.<sup>12-15</sup> Mesane kanseri riski, sigara içme

süresine ve günde içilen sigara sayısına doğru orantılı olarak artmaktadır.<sup>15</sup> Buna uygun olarak, sigara içiminin kesilmesinden sonraki yıllarda mesane kanseri riski giderek azalmaktadır.<sup>7,16</sup>

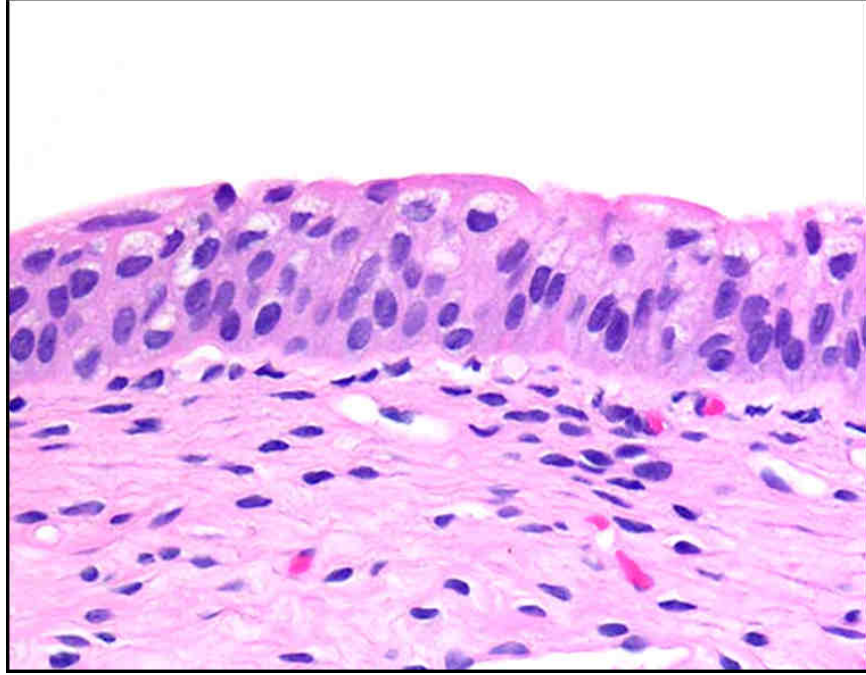
Aromatik amin bileşikleri, anilin boya, plastik, epoksi yapıştırıcılar ve poliüretan imalatında kullanılmaktadır ve bu alt sanayi dallarında çalışan ve mesleksi olarak bu maddelere maruz kalan kişilerde mesane kanseri sık olarak görülmektedir.<sup>12,13</sup> Buna benzer şekilde, polisiklik hidrokarbon bileşikleri, formaldehit ve asbest maruziyeti de mesane kanseri riskini arttırmaktadır.<sup>7</sup> Mesleksi maruziyetin tüm mesane kanserlerinin %25'inden sorumlu olduğu düşünülmektedir.<sup>17</sup> Fenasetin içeren analjezikler, siklofosfamid ve klornafazin kullanımı da mesane kanseri ile ilişkilendirilmiştir.<sup>12</sup>

*Schistosoma haematobium* enfeksiyonunun sebep olduğu kronik sistitin de mesane kanseri etyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir. Japonya, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Ülkeleri gibi gelişmiş ülkelerde ürotelial karsinomlar daha sık görülürken, mesane kanseri etyolojisinde sıklıkla *Schistosoma haematobium* enfeksiyonunun sebep olduğu kronik sistitin sorumlu tutulduğu gelişmekte olan ülkelerde, mesane kanserlerinin büyük çoğunluğunu skuamöz hücreli karsinomlar oluşturmaktadır.<sup>7,12</sup>

## 2.2. Mesane Epiteli Histolojisi

Mesane epiteli bazal lamina üzerine tek sıra halinde oturan bazal hücreler, 2 ila 5 hücre kalınlığında “intermediate” hücre tabakası ve epitel yüzeyini örten tek sıra “şemsiye” hücreleri olmak üzere toplam 3 ila 7 hücre kalınlığında 3 hücre tabakasından oluşmaktadır (Şekil 2.1). Bazal hücre tabakası mesane epitelinin rezerv hücreleri olup, benign mesane epitelinde bu tabakada nadir mitotik figürler görmek mümkündür. Bazal hücreler mesane boş iken kolumnar morfolojide olup, mesane doldukça esneyerek küboidal şekil almaktadır. Mesane epitelinin yüzeyi, her biri birden fazla intermediyer hücreyi örten “şemsiye” hücreleri ile örtülüdür. Değişici epitel hücreleri birbirlerine elastik bağlar ve çok sayıda sıkı bağlantılarla bağlıdır. Böylece, mesane epiteli hücreleri mesane idrar ile doldukça esneyerek ve birbirleri

üzerinden kayarak epitelin mesane duvarı ile beraber genişleyebilmesini, mesane boşaldığı zaman da hızla eski haline dönmesini mümkün kılmaktadır. Epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, mesane içerisindeki konsantrite toksik maddelerin kana karışmasını engelleyen bir “kan-idrar bariyeri” oluşturmaktadır.



Şekil 2.1. Normal ürotelial epitel.

### 2.3. Mesane Karsinomu Patolojisi.

Tüm dünya genelinde mesane malignitelerinin %90'ından fazlasını ürotelial karsinomlar meydana getirmektedir. Adenokarsinomlar %6, skuamöz karsinomlar %2, küçük hücreli karsinomlar ise yaklaşık %1 oranında görülmektedir<sup>7</sup>.

Mesane ürotelial karsinomları, klinik davranışları açısından ”Non-invaziv neoplaziler” ve “infiltratif ürotelial karsinomlar” olarak iki ana grup altında toplanabilir<sup>12,13</sup>. Non-invaziv papiller neoplaziler, papiller organizasyon göstermekte ve mesane muskularis propria tabakasını salim bırakarak submukozada sınırlı kalmaktadır (TNM sınıflamasına göre Tis, Ta veya T1 evresinde).

Noninvaziv ürotelial neoplaziler, papiller neoplaziler ve “düz” karsinoma in situ olarak ikiye ayrılabilir. Papiller neoplazmlar da kendi içinde “Papillary

Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential” (PUNLMP), düşük dereceli noninvaziv papiller ürotelial karsinom ve yüksek dereceli noninvaziv papiller ürotelial karsinom olmak üzere 3 grupta toplanmaktadır (Tablo 2.2).

**Tablo 2.1.** American Joint Committee on Cancer (AJCC)’e göre Mesane Tümörü Evreleri.<sup>18</sup>

**T-Primer tümör**

TX-	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör bulgusu yok
Ta	Noninvaziv papiller karsinom
Tis	Karsinoma in situ: “düz tümör”
T1	Tümör subepitelial bağ dokusuna invaze
T2	Tümör mesane muskularis propria tabakasına invaze
T2a	Tümör yüzeysel kas tabakasına invaze
T2b	Tümör derin kas tabakasına invaze
T3	Tümör perivezikal dokulara invaze
T3a	Mikroskopik olarak
T3b	Makroskopik olarak (ekstravezikal kitle)
T4	Tümör bunlardan herhangi birine invaze: prostat, uterus, vajen, pelvik duvar, abdominal duvar
T4a	Tümör prostat, uterus veya vajene invaze
T4b	Tümör pelvik veya abdominal duvara invaze

**N-Rejyonel lenf nodları**

NX	Rejyonel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Rejyonel lenf nodu metastazı yok
N1	En büyük boyutu 2 cm’den az tek bir lenf noduna metastaz
N2	En büyük boyutu 2 ila 5 cm arasında tek bir lenf noduna veya en büyük boyutu 5 cm’den az birden fazla lenf noduna metastaz
N3	En büyük boyutu 5 cm’den büyük bir veya birden fazla lenf noduna metastaz

**M-Uzak metastaz**

MX	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

**Tablo 2.2.** Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Ürotelial Neoplazi Histolojik Sınıflandırması, 2004.<sup>12</sup>

**A. Noninvaziv ürotelial neoplaziler**

1. Papiller Ürotelial Neoplaziler

- a. PUNLMP
- b. Düşük dereceli noninvaziv papiller ürotelial karsinom
- c. Yüksek dereceli noninvaziv papiller ürotelial karsinom

2. Ürotelial karsinoma in situ

**B. İnvaziv ürotelial neoplaziler**

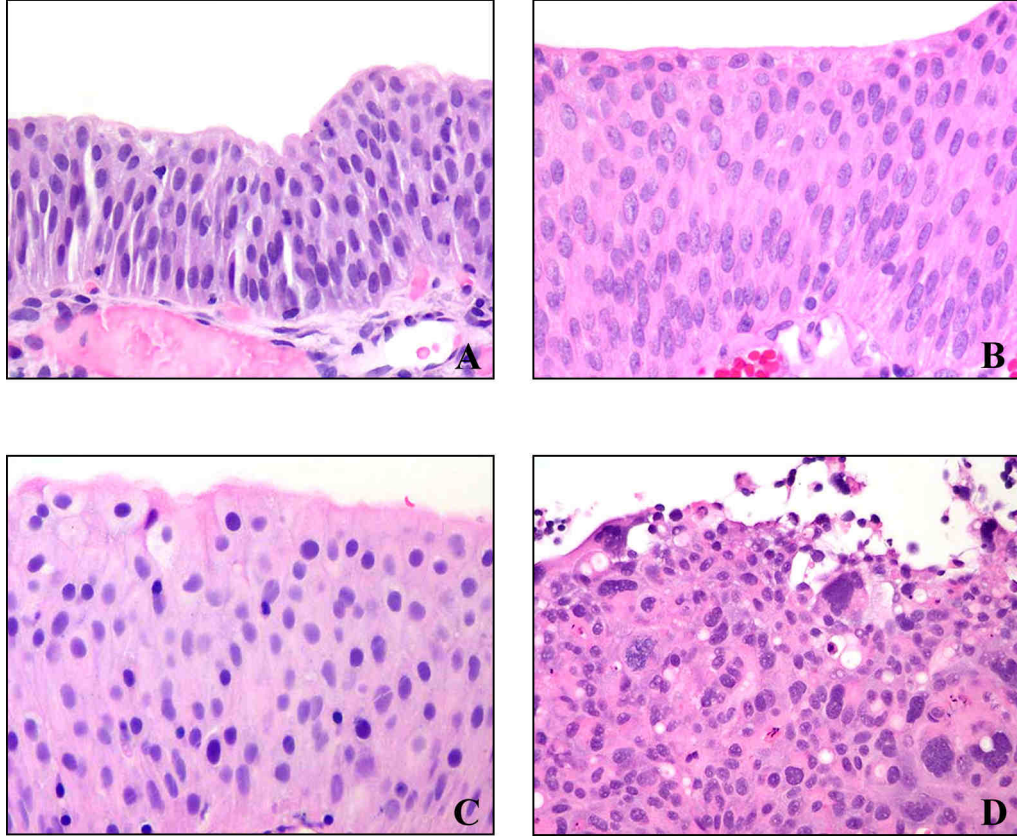
**Tablo 2.3.** Ürotelial Papiller Lezyonların Histolojik Özellikleri.<sup>19</sup>

	Papillom	PUNLMP	Düşük Derece	Yüksek Derece
<b>Mimari</b>				
Papiller yapılar	İnce	İnce, nadiren kaynaşma gösterir	Kaynaşma ve dallanma	Kaynaşma ve dallanma
Hücre organizasyonu	Normal ürotel ile aynı	Polarite normal ürotel ile aynı; kalınlık değişken; kaynaşma	Büyük oranda düzenli, ancak hücrelerde kalabalıklaşma ve minimal polarite kaybı; kalınlık değişken; kohezif	Büyük oranda düzensizleşme ve belirgin polarite kaybı; kalınlık değişken, diskohezif
<b>Sitoloji</b>				
Nükleer boyut	Normal ürotel ile aynı	Uniform olarak artmış olabilir	Artmış ve değişken	Artmış ve değişken
Nükleus şekli	Normal ürotel ile aynı	Yuvarlak-oval, uniform	Yuvarlak-oval; sınırlanmada hafif varyasyon	Orta şiddette-belirgin pleomorfizm
Nükleer kromatin	İnce	İnce	Hücreler arasında hafif varyasyon	Orta şiddette-belirgin varyasyon; hiperkromazi
Nükleoller	Yok	Yok-belirsiz	Genelde belirsiz	Birden fazla, belirgin nükleoller
Mitotik figürler	Yok	Nadir, bazal	Tek tük, epitelin herhangi bir katında	Genelde sık, epitelin herhangi bir katında
Şemsiye hücreleri	Uniform olarak mevcut	Mevcut	Genelde mevcut	Kayıp olabilir

Papiller ürotelial neoplazilerde derece tayini, Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 Ürotelial Karsinom evreleme kriterlerine uygun olarak, neoplazmin sitolojik ve yapısal özellikleri göz önüne alınarak yapılmaktadır (Tablo 2.3). PUNLMP tanısı için papiller mimari ve hücre dizilenmesinde artış yeterli olmakta, ilerleyen dereceler için giderek artan şiddette hücresel atipi, mitotik indekste artış, papiller yapılarda düzensizlik göz önünde bulundurulmaktadır.<sup>17, 19-21</sup>

Ürotelial karsinomlar, ilk tanı konulduğu anda %70-80 oranında non-invaziv papiller neoplaziler şeklinde kendilerini göstermektedir. Tümör derecesinde artış,

dereceli olarak progresyon oranında artış ve prognozda kötüleşmeyi beraberinde getirmektedir.<sup>12,21,22</sup>



**Şekil 2.2.** Ürotelial Neoplaziler. A. Ürotelial papillom. B. Düşük malignite potansiyelli ürotelial neoplazi (PUNLMP). C. Düşük dereceli ürotelial karsinom. D. Yüksek dereceli ürotelial karsinom.

Düşük dereceli ürotelial neoplaziler, nadiren progresyon göstermelerine ve prognozlarının yüksek dereceli ürotelial neoplazilere kıyasla çok daha olumlu olmasına karşın, oldukça yüksek oranlarda rekürrens göstermektedirler. Yüksek dereceli ürotelial karsinomlar benzer oranlarda rekürrens göstermelerine karşın, progresyon riskleri, düşük dereceli ürotelial neoplazilere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmaktadır. Ürotelial neoplazilerde hastaların sağkalımı ve yaşam kalitesi, neoplazm mesane muskularis propria tabakasına invazyon gösterdiği andan itibaren belirgin şekilde kötüleşmektedir (Tablo 2.4). Bu da, ürotelial karsinom tanısı konulan kişilerin ilk tedavilerinden sonra da yakın takibini ve sık kontrolünü gerekli kılmaktadır.<sup>12,17,20-23</sup>

**Tablo 2.4** Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2004 Sınıflamasının İlk Tanı Evresi, Progresyon ve Prognoz ile İlişkisi.<sup>12, 21, 22</sup>

WHO 2004	Papillom	PUNLMP	Düşük Derece	Yüksek Derece	Toplam
İlk Tanı Evresi					
pTa	%100	%100	%97.6	%50	%73.3
pT1	0	0	%2.4	%50	%26.7
Rekürrens	0	%33-47	%48-71	%56.4	%54.7
Evrede progresyon					
pTa'dan pT1'e	0	0	%2.6	%8.3	%8.6
Kas invazyonu	0	0	%5.3	%6.3	%5.1
Metastaz	0	0	%5.3	%8.3	%6.1
Ölüm	0	0	%5.3	%16.7	%10.2

Mesane karsinomu şüphesi bulunan hastalarda tanıyı kesinleştirmede veya mesane karsinomu hikayesi bulunan kişilerin takibinde ilk kullanılan tanı yöntemi sistoskopi olmuştur.<sup>17,20,21</sup> Sistoskopik inceleme, mesanenin hemen tamamının çıplak gözle değerlendirilebilmesini, şüpheli lezyonların örneklenmesini ve mesane tümörlerinin eksizyonunu mümkün kılmaktadır. Ancak, mesane tümörlerinin tanısında sistoskopinin duyarlılık ve özgüllüğü üzerine yapılan çalışmalar birbirinden oldukça farklı sonuçlar vermektedir.<sup>20</sup> Genel olarak, papiller ürotelial neoplazilerin tanısında sistoskopinin özgüllüğü oldukça yüksek olmasına karşın, özellikle mesane tümörünün çok küçük olduğu durumlarda veya “düz” ürotelial malignitelere duyarlılığı oldukça düşüktür. Bu da, tüm mesane tümörleri göz önüne alındığında, konvansiyonel sistoskopinin duyarlılığının yaklaşık %74-80, özgüllüğünün ise %50'yi aşamamasına sebep olmaktadır.<sup>20,21</sup> Yakın zamanda, konvansiyonel sistoskopi esnasında mesanenin floresan boyalar ile işaretlenip ultraviyole ışık altında incelenmesi esasına dayalı yöntemler geliştirilmiştir, ancak bu yöntemler de özellikle rekürren tümörlerde, cerrahi işlemler veya topikal intravezikal tedavi sonrasında yalancı pozitif sonuçlar verebilmektedir.<sup>24</sup> Duyarlılık ve özgüllükte yaşanan bu sorunlara ek olarak, sistoskopinin maliyetinin ve hastaya verdiği rahatsızlığın da yüksek olması, bu yöntemin mesane karsinomları için tarama testi olarak kullanılmasını güçleştirmektedir. Bu sebeplerden ötürü, mesane kanserinin

tanı ve takibinde sistoskopi ve idrar sitolojisi rutin olarak beraber kullanılmaktadır.<sup>20,21,23,25</sup>

#### 2.4. Mesane Karsinomlarında Sitoloji

Mesane karsinomlarının sitolojik incelenmesinde çok sayıda değişik örnekleme yöntemi kullanılabilir. <sup>23</sup> En kolay elde edilen ve dolayısı ile üroloji kliniği tarafından en sık sitolojik incelemeye gönderilen materyal alışıgeldiğimiz spontan idrar örneği olmaktadır. Bunun dışında, mesane kateterizasyonu, sistoskopi sırasında elde edilen mesane ve üst üriner sistem yıkama sıvıları ve sistektomi sonrası oluşturulan ileal keselerden yapılan yıkamalar da sitolojik incelemeye tabi tutulabilmektedir. Bu örnekleme yöntemleri arasında idrar sitolojisi özellikleri açısından çeşitli farklılıklar bulunmaktadır (Tablo 2.5).<sup>26</sup>

**Tablo 2.5.** Örnekleme yöntemlerine bağlı sitolojik farklar.<sup>26</sup>

	Spontan	Kateterizasyon	Yıkama	İleal Loop
Selülarite	Düşük	Yüksek	En yüksek	Yüksek
Hücresel korunma	Zayıf-orta	Daha iyi	İyi	Dejenere
Pattern	Tek tek hücreler	Hücre grupları	Hücre grupları	Tek hücreler ve hücre grupları
Hücre tipi	Yüzeyel	Yüzeyel, bazal	Yüzeyel, bazal	Enterik, yüzeyel
Avantajlar	Non-invaziv	Daha iyi örnek	En iyi örnek	Yok
Dezavantajlar	Dejenerasyon, düşük selülarite, vajinal kontaminasyon	İnvaziv, infeksiyon	İnvaziv, infeksiyon	Dejenerasyon

Normal ürotelyal hücreler düzenli bir kromatin yapısına, uniform yuvarlak nükleuslara sahiptir. Nükleoller belirsizdir. İyi sınırlı yoğun bir sitoplazmaları vardır. Bazen sitoplazmaları ince vakuoler karakterdedir. Nükleusları genellikle santral bazen eksantrik yerleşimlidir. Boyutları değişkendir, bazal hücreler lenfositten biraz büyük iken, yüzeyel hücreler çok daha büyük olabilir (yaklaşık 10 kat). Şemsiye hücreleri diğer ürotelyal hücelere kıyasla çok daha büyüktür ve bazıları multinükleer olabilir. Bir kısmının belirgin nükleoller mevcuttur. Bazen 50'den çok nükleusu olan dev şemsiye hücreleri görülebilmektedir.<sup>26</sup>

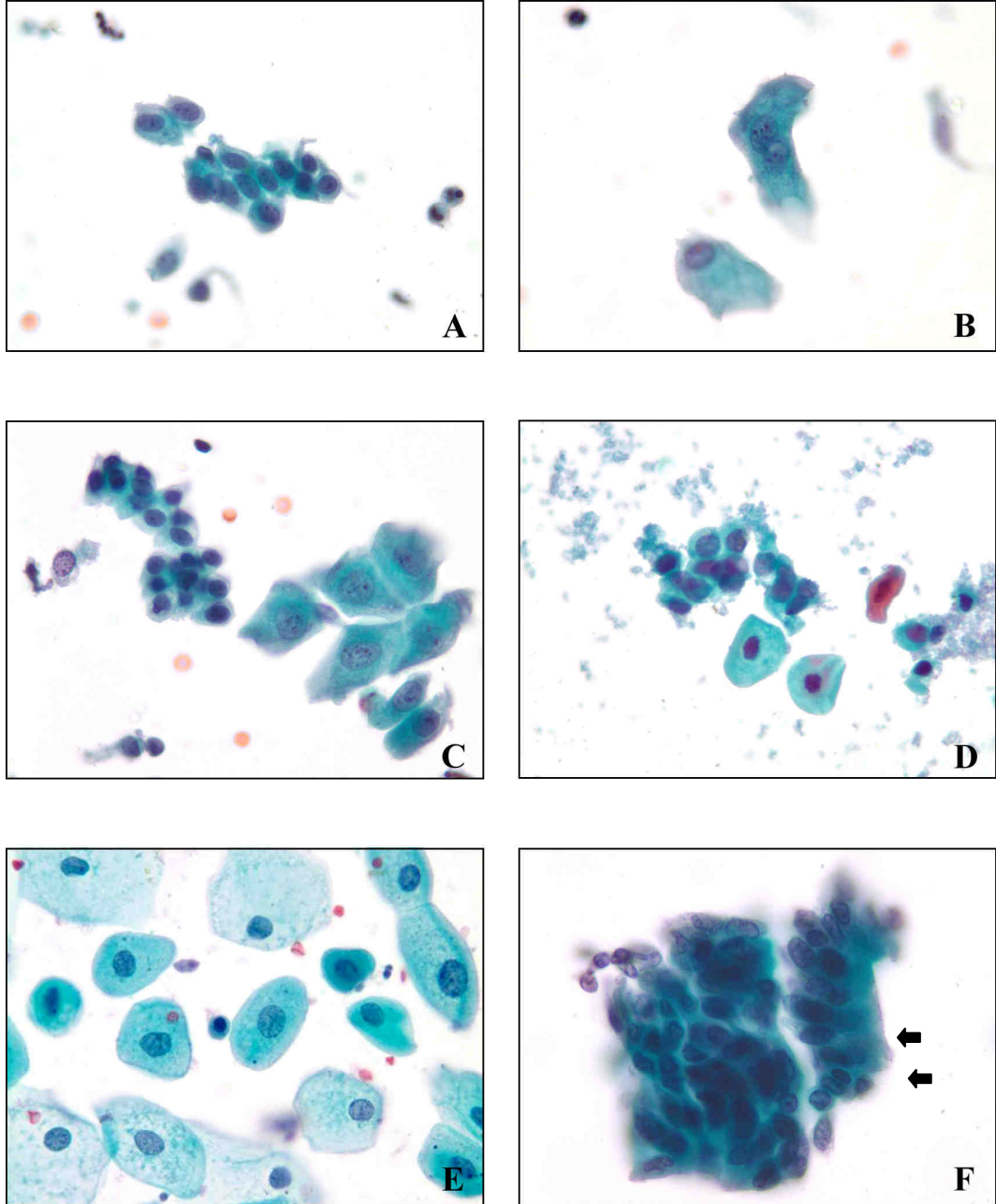
Ürotelyal hücrelerdeki reaktif-inflamatuvar değişiklikler diğer tüm epitel hücrelerinde olduğu gibi, kromatinde hafif kabalaşma, nükleolün belirginleşmesi, kısmen artmış nükleer sitoplazmik oran olarak özetlenebilir. Nükleuslar yuvarlak şekillerini korurlar.

İdrar sitolojisinde nükleer özellikler her zaman neoplazi tanısı için yeterli olmasa da, gelişim patterni önemli bir ipucudur. Ancak pattern analizi yapabilmek için örneğin nasıl alındığının bilinmesi gerekir. Spontan idrarda büyük psödopapiller grupların varlığı neoplazi açısından kuvvetle şüpheli bir bulgudur, bununla birlikte instrumentasyon/kateterizasyon ile alınan bir örnekte benzeri gruplar her zaman bulunur. Spontan idrarda yeterli hücre olmayabilir, kadınlarda vajinal kontaminasyon siktir ve yorum güçlüğü yaratır. Yıkama sıvıları hücreden zengin materyallerdir. Bu örneklerde selülarite ve grupların varlığı bir tanı kriteri olarak kullanılmamalıdır, yıkama ile dökülen normal epitel ile şüpheli grupların karşılaştırılması doğru tanı için önemlidir.<sup>26</sup>

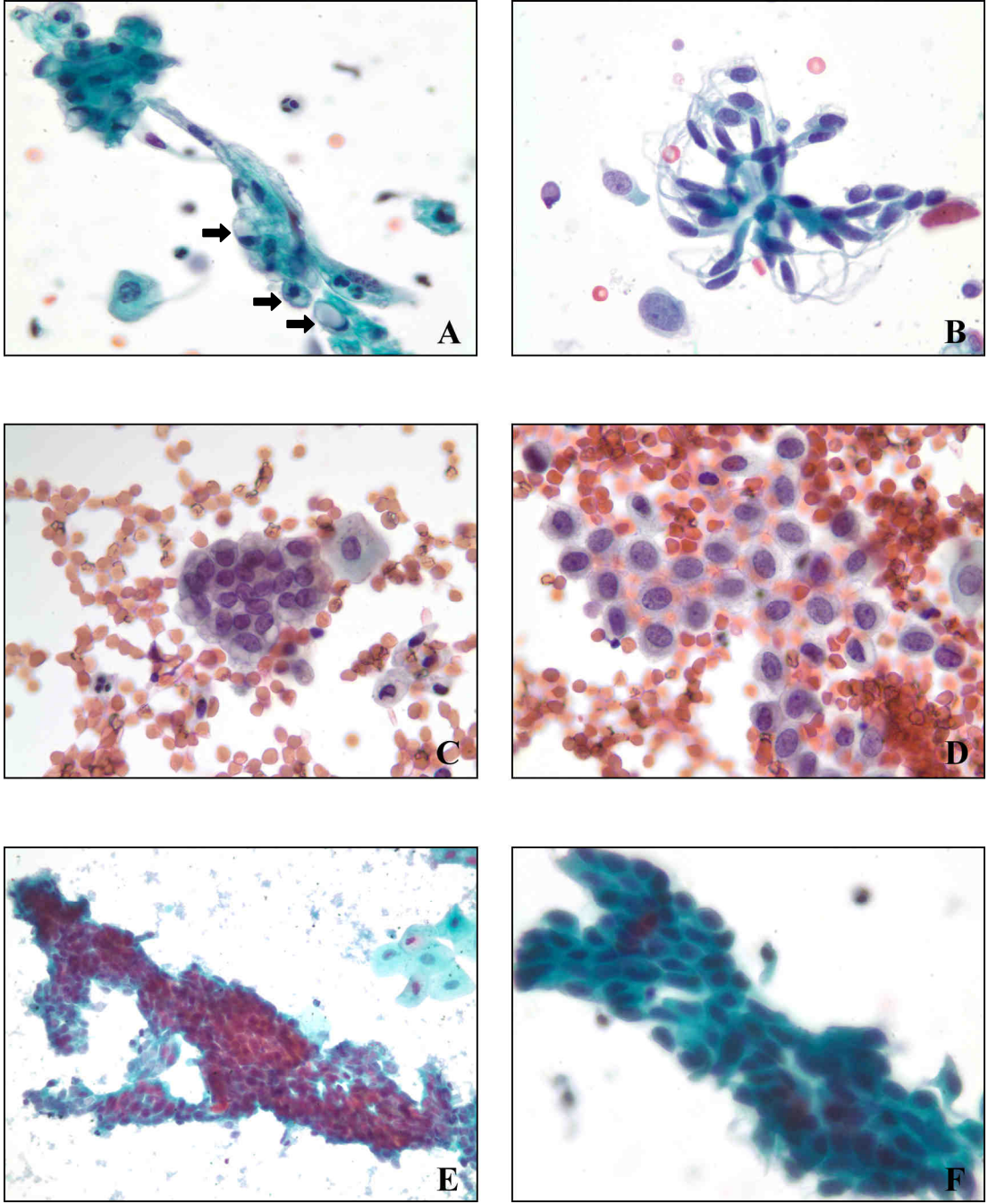
Düşük dereceli ürotelyal neoplazilerin (papilloma, düşük malignite potansiyelili papiller ürotelyal neoplazi) sitolojik olarak tanınmaları oldukça güçtür. Bu olgularda idrara dökülen hücre sayısı çok azdır ve nükleer özellikleri normal mukozadan genellikle farksızdır. Normal ürotelium ya da düşük dereceli ürotelial karsinom özelliklerini sergileyebilirler. Tanıda en önemli kriter nükleer kalabalıklaşmadır.<sup>26</sup>

Düşük dereceli ürotelyal karsinomların sitolojik tanısında artmış nükleer sitoplazmik oran, vakuolsüz homojen sitoplazma, hafif nükleer membran düzensizliği tanıda en yararlı kriterlerdir. Spontan idrarda papiller grupların varlığı büyük önem taşır, ancak kateterizasyon ile alınan örneklerde, hücre grupları normalde de bulunabileceğinden, tek hücre özelliklerine dikkat etmek gerekir. Sitolojik bulguları sistoskopi ile beraber değerlendirmek önemlidir. Üreter ve renal pelvis lezyonlarında daha da dikkatli olmak, olası instrumentasyon artefektlerine bağlı yalancı pozitif tanıların organ kaybına yol açabileceğini unutmamak gerekir.<sup>13,26</sup>

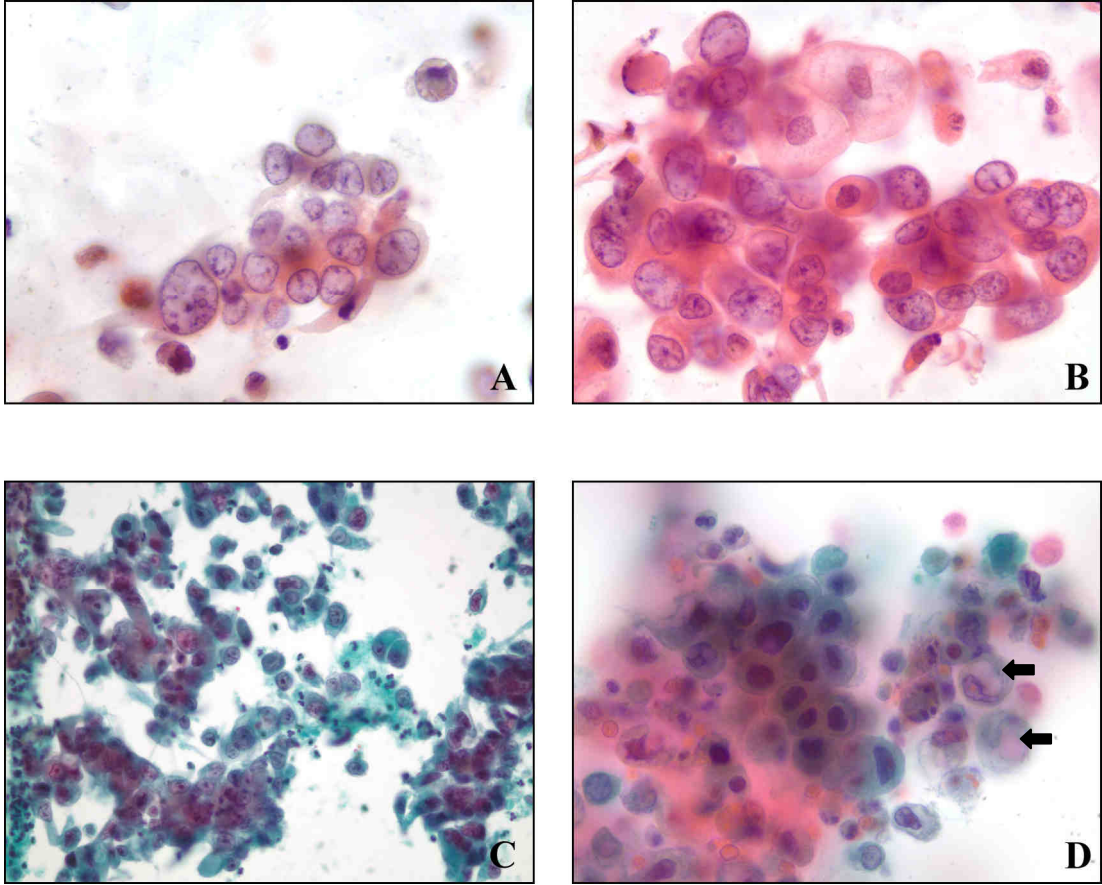
Yüksek dereceli ürotelyal karsinomlarda anaplazi belirgindir, malignitenin tüm kriterleri görülür. Hücreler büyük ve hiperkromatiktir, kromatin kabalaşmış, nükleol belirgin, nükleositoplazmik oran artmıştır. Skuamöz ya da glandüler diferansiasyon bulguları saptanabilir.<sup>13,26</sup>



**Şekil 2.3.** Benign idrar sitolojisi. A. Benign ürotelial hücreler. B. Şemsiye hücreleri. C. Ürotelial hücreler ve şemsiye hücrelerinin boyutça kıyaslanması. D ve E. Ürotelial hücrelerin skuamöz epitel hücreleri ile boyutça kıyaslanması. F. Kolumnar hücre grubu (oklar:silyalar ve terminal bar)



**Şekil 2.4.** Ürotelial hücrelerde karşılaşılan çeşitli benign morfolojiler. A.Reaktif değişiklikler gösteren ürotelial epitel. Hücrelerde çekintilenme ve nükleus kontürlerinde düzensizlik mevcut. Bazı hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon izleniyor (oklar). B.Kateterizasyon ile elde edilen idrar örneği. Hücrelerde çekintilenme mevcut, ancak nükleuslar monomorfik ve düzgün kontürlü. C ve D. İnce bir kromatin yapısı ve düzenli nükleer konturlara sahip benign ürotelyal hücreler. E ve F.Mesane yıkama sıvılarında sıkça görülen kolumnar hücre grupları. Yıkama sıvılarında bu grupların varlığı düşük dereceli ürotelial karsinom tanısını güçleştirmekte.



**Şekil 2.5.** Malign idrar sitolojisi. A ve B. Düşük dereceli ürotelial karsinom. Koheziv gruplar oluşturan hücrelerde nükleositoplazmik oranda artma mevcut. Nükleer pleomorfizm, nükleer kontürlerde hafif şiddette düzensizlik ve granüler kromatin izleniyor. C ve D. Yüksek dereceli ürotelial karsinom. Polimorfonükleer lökositler ve nekrotik debriden zengin zemin üzerinde diskoheziv şekilde yayılan malign hücreler izleniyor. Nükleositoplazmik oranda belirgin artma mevcut. Nükleuslarda şiddetli pleomorfizm ve hiperkromazi, nükleer kontürlerde belirgin düzensizlik ve nükleollerde irileşme dikkati çekiyor. Bazı hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon mevcut (oklar).

İn situ karsinomların sitolojik özellikleri yüksek dereceli ürotelyal karsinomlar ile yüksek benzerlik göstermekte olup, tek tek dağılan iri, kaba kromatinli, düzensiz nükleer konturlu, belirgin nükleollü, dar sitoplazmalı hücreler ile karakterizedir. Yıkama sıvılarında neoplastik hücreler gruplar halinde dökülebilir. İn situ ve invaziv karsinom arasındaki tek belirgin sitolojik fark, ilkinde zeminin temiz olması, diğerinde zeminde inflamatuvar hücrelerin hücre artıklarının görülmesidir, fakat bu ayrımı güvenilir olarak yapmak mümkün değildir. Bilindiği gibi in situ karsinomlarda hücreler arası bağlarda zayıflamaya bağlı olarak biyopsi materyallerinde epitel kolaylıkla dökülebilmekte, bu nedenle de in situ karsinomların

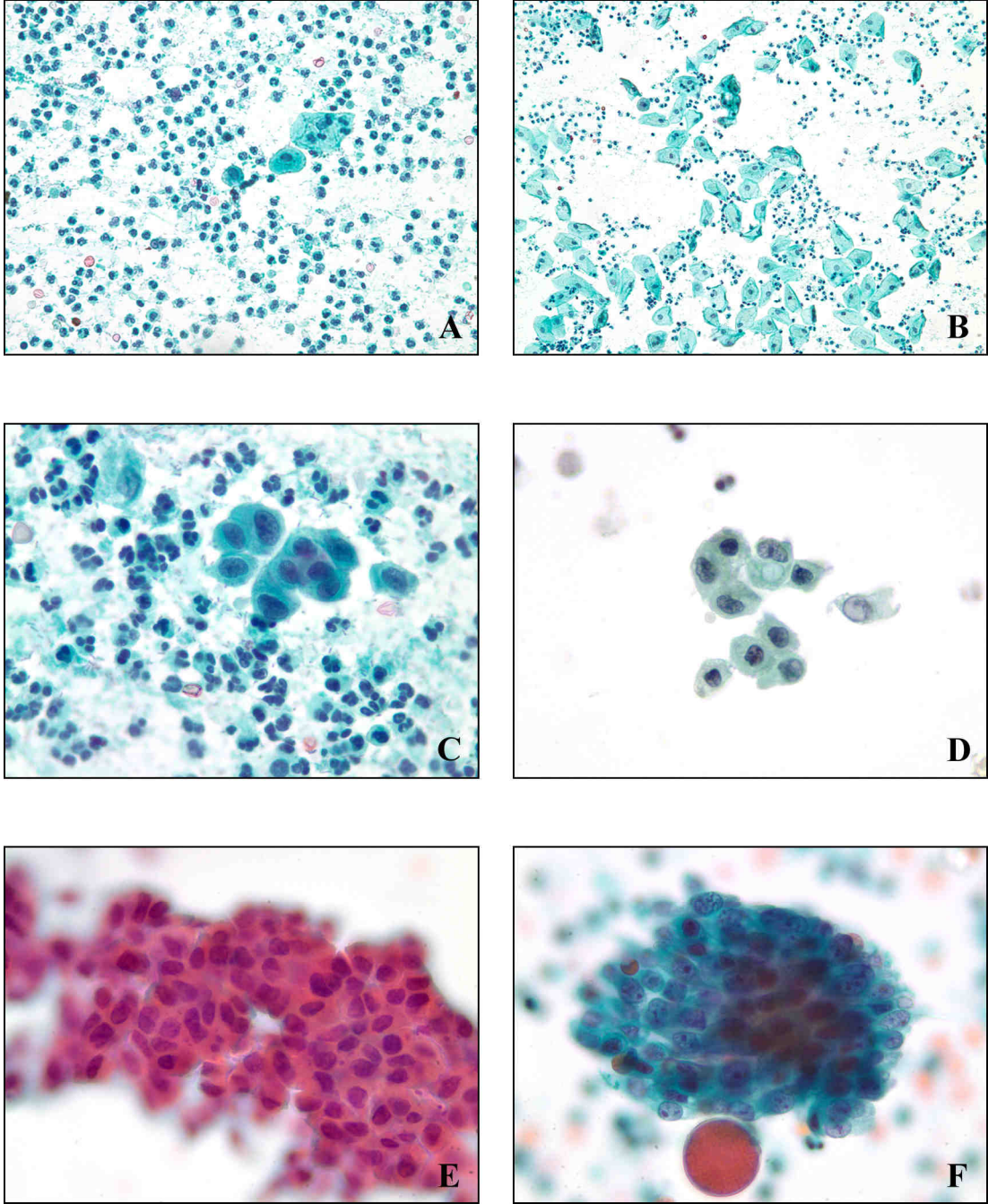
tanısı zorlaşabilmektedir. Bu sebeple, in situ karsinomların saptanmasında idrar sitolojisi büyük önem kazanmaktadır.<sup>26</sup>

**Tablo 2.6.** Reaktif epitel, düşük malignite potansiyelli ürotelial neoplazi (PUNLMP), düşük dereceli ürotelial karsinom, yüksek dereceli ürotelial karsinom ve ürotelial karsinoma in situ (CIS) sitolojik ayırıcı tanısı.<sup>13,25,26</sup>

	Reaktif	PUNLMP	Düşük Derece	Yüksek Derece	CIS
Hücre grupları	Psödopapiller yapılar	Hafif kalabalık hücre kümeleri	Papiller yapılar, gevşek/kalabalık hücre kümeleri	Gevşek hücre kümeleri, tek hücreler	Gevşek hücre kümeleri, tek hücreler
Hücreler	İrileşme, pleomorfizm, az miktarda hücre	İrileşme, hücreler uniform, az miktarda hücre	İrileşme, hücreler göreceli olarak uniform, artmış sayıda hücre	Belirgin irileşme ve pleomorfizm, bol miktarda hücre	Belirgin irileşme ve pleomorfizm, bol miktarda hücre
N/S Oranı	Normal/artmış	Normal	Orta derecede artım	Belirgin artım	Belirgin artım
Nükleus	Merkezi, uniform	Uniform	Egzantrik, irileşmiş, değişken boyut	Egzantrik, pleomorfik	Egzantrik, pleomorfik
Nükleer membran	Düzensiz ve kalın	Düzensiz ve kalın	Hafif düzensiz, ince	Orta/ileri derecede düzensiz, ince	Orta/ileri derecede düzensiz, ince
Kromatin	İnce, homojen	İnce, homojen	Granüler, homojen	Kaba, koyu, irregüler	Kaba, koyu, irregüler
Nükleol	Genelde büyük	Küçük ve belirsiz	Küçük ve belirsiz	Makronükleoller	Makronükleoller
Sitoplazma	Vakuollü	Homojen	Homojen	Vakuollü	Vakuollü
Zemin	İnflamatuar hücreler	Temiz	Temiz	İnflamatuar hücreler ve hücre artıkları	Temiz

İdrar sitolojisinde tanısal doğruluk, tümörün boyutu, konfigürasyonu ve derecesi ile yakın olarak ilişkilidir. Sesil tümörler ve in situ karsinomlarda tanısal doğruluk papiller tümörlere göre daha yüksektir. Sitolojinin duyarlılığı, düşük dereceli tümörlerde %20-%95, yüksek dereceli tümörlerde %44-%99 arasındadır.<sup>13,25,26,29</sup> Sistoskopide tümör saptanmayan ancak sitolojisi pozitif ya da şüpheli olan olguların büyük bir kısmında izlemde karsinom saptanmaktadır. Tüm olgular birarada ele alındığında idrar sitolojisinin duyarlılığı %47-85, özgüllüğü

%74-98 arasında değişmektedir.<sup>13,25-29</sup> Tanısal güvenilirliği belirleyen en önemli faktör tümörün derecesidir.<sup>13,26</sup>



**Şekil 2.6.** İdrar sitolojisinde tanıda sorun yaratan çeşitli faktörler. A. Polimorfonükleer lökositlerden zengin yoğun inflamatuvar zemin epitelial hücreleri örtük değerlendirilmeyi güçleştiriyor. B. Kadın hastada vajinal kontaminasyon. Skuamöz epitel hücreleri arasında az sayıda ürotelial hücreyi bulmak ve değerlendirmek zorlaşıyor. C. ve D. Reaktif zeminde yerleşmiş, göreceli olarak az atipi gösteren koheziv hücre grupları. Reaktif değişiklikler ile düşük dereceli ürotelial karsinom ayırımı oldukça zor. E. ve F. Mesane yıkama sıvısı örneğinde orta şiddette nükleer atipi gösteren koheziv hücre grupları izleniyor. Ayırıcı tanıda kolumnar hücre grupları ve düşük dereceli ürotelial karsinom mevcut.

## 2.5. Mesane Karsinomu Tanısında Kullanılan Ek Yöntemler.

Mesane karsinomu nedeniyle izlenen hastalarda sistoskopi halen altın kriteri oluşturmaktadır, ancak mesane kanserinin tanısında, takibinde ve mesane kanseri için bir tarama testi olarak sitolojinin tanısıl değerini artırmak için bir çok noninvaziv idrar bazlı mesane tümörü testi önerilmektedir (Tablo 7). Bu testler, hastanın idrarında mesane karsinomlarına özgü çeşitli biyokimyasal belirteçlerin tesbiti esasına dayanmaktadır.<sup>30</sup> Başlıca testler arasında Hemoglobin “dipstick” testi, Üriner Nükleer Matriks Protein 22 (NMP22), Mesane Tümör Antijeni (BTA), Fibrin Yıkım Ürünleri ölçümü (FDP), Telomeraz testi, Hyaluronik asit (HA) testi, Hyaluronidaz (Haase) testi, Doku Polipeptid Antijeni (TPA), Mikrosatellit analizi, Mesane Kanseri Antijeni 4(BLCA4) ve idrarda Beta-HCG ölçümü sayılabilir.<sup>1,3,30</sup>

**Tablo 2.7** Çeşitli İdrar Bazlı Mesane Tümör Testlerinin İdrar Sitolojisi ile Karşılaştırmalı Duyarlılık ve Seçicilikleri.<sup>1,30</sup>

Test	Açıklama	Duyarlılık		Seçicilik		Not
		Primer	Rekürren	Primer	Rekürren	
Sitoloji	Referans standardı	48	35	94	94	Yüksek dereceli tümörde duyarlılık daha yüksek
Hgb-Dipstick	İdrar hemoglobin testi	52	40	82	87	
NMP22	Nükleer matriks proteini - ELISA	73	71	80	73	İnflamasyonda yalancı pozitif sonuç
BTA	Kompleman Faktörü H ilişkili protein	69	71	65	66	İnflamasyon ve hematüride yalancı pozitif sonuç
FDP	Fibrin yıkım ürünleri	61	54	79	61	
Telomeraz		75	39	86	-	
HA	Hyaluronik asit	89	-	92	-	
HAase	Hyaluronidaz	82	-	84	-	Çalışma sayısı az
TPS	CK8,18 - ELISA	72	65	78	83	
TPA	CK,18,19 - ELISA	88	-	55	-	
Mikrosatellit	15-20 hedef gende heterozigosite kaybı ölçümü	91	82	94	89	Lökositüride hatalı sonuçlar
BLCA4	Mesane kanseri antijeni - ELISA	96	-	85	-	
Beta-HCG		35	-	99	-	

Genel olarak, bütün bu testlerin duyarlılıkları sitolojiden yüksek, ancak seçicilikleri sitolojiden düşüktür. Mesanenin nonneoplastik diğer patolojileri yalancı pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Noninvaziv idrar testleri sitolojik incelemeye ek olarak kullanıldıklarında mesane kanser tanı duyarlılığı değişen oranlarda yükselmektedir, ancak bu tür testlerin klinik uygulamadaki yeri konusunda henüz ortak bir kanıya ulaşılamamıştır.<sup>1,3,30</sup>

Mesane ürotelial karsinomlarında rekürrens sık olarak görülmekte olup, tümörler mesanenin yalnızca bir bölgesinde yerleşmektense, aynı anda bir çok yerde gelişebilmektedir. Mesane karsinomu görülen kişilerde ürotelial epitel ile örtülü olan üreter ve böbrek pelvisi gibi diğer bölgelerde de yüksek oranda ürotelial karsinoma rastlanmaktadır.<sup>12-14,17,19</sup> Bütün bu bulgular kanserojen ajanların ürotelyumun tümünü aynı anda etkileyerek bir genetik kararsızlığa yol açtığını düşündürmektedir.

Son on yıl içerisinde mesane ürotelial karsinomlarının genetik özellikleri üzerine yapılan araştırmalar, ürotelial karsinomlarda çok sayıda genetik sapma olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu değişiklikler bazı kromozomlarda delesyonlar, bazılarında ise sayıca artım olarak ortaya çıkmaktadır. İnvaziv ürotelial karsinomlarda, noninvaziv ürotelial karsinoma kıyasla çok daha yüksek şiddette kromozomal anomalilere rastlanması, bu iki patolojinin genetik düzeyde birbirinden oldukça farklı iki antiteyi temsil ettiğini düşündürmektedir. İnvaziv ürotelial tümörlerin ve noninvaziv yüksek dereceli ürotelial neoplazmaların bir kısmının genetik olarak “instabil” oldukları ve zamanla genetik değişikliklerin birikerek, tümör evresinde ilerlemeye ve prognozda kötüleşmeye sebep olduğu düşünülmektedir.<sup>12-14</sup>

Mesane ürotelial karsinomlarında görülen kromozomal patolojilerin çok geniş alanları ilgilendiriyor olması, mesane karsinomlarının gelişiminden sorumlu genlerin saptanmasını güçleştirmektedir. Aynı özellik, kromozomal anomalilerin gözlenmesini ve muhtemel bir tanı yöntemi olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır.

## 2.6. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi.

İn situ hibridizasyon yöntemi, hedef materyaldeki DNA veya RNA dizinlerinin belirli bölümlerinin, bu bölümlere spesifik komplementer nükleik asit dizinleri (prob) ve bu dizinlere bağlanan çeşitli işaret molekülleri kullanılarak görünür hale getirilmesi esasına dayanmaktadır.<sup>35</sup> Polimeraz zincir reaksiyonu, southern ve northern blot yöntemlerinden farklı olarak, in situ hibridizasyon yöntemi ile araştırılmak istenen nükleik asit dizininin miktarı, sayısı ve hücredeki üç boyutlu yerleşimi de görüntülenebilmektedir. İn situ hibridizasyon yönteminin ilk geliştirilen formunda, işaretleyici olarak radyoaktif izotoplar kullanılmakta iken,<sup>36</sup> gelişen teknoloji ile prob dizinleri floresans veren moleküller ve hatta çeşitli kromojenik enzimler ile de işaretlenebilir hale gelmiştir. Prob dizinleri direkt veya indirekt olarak işaretlenebilmekte ve sinyal yükseltici moleküller kullanılarak elde edilen ışımının şiddeti arttırılabilmektedir.<sup>35</sup>

Floresan in situ hibridizasyon yönteminde kullanılan işaretleyici moleküller, sadece belirli dar bir dalga boyu aralığındaki ışık ile uyarılarak, daima bu uyarım ışığından daha geniş dalga boyunda, dolayısı ile daha farklı renkte ışımaya vermektedir. Dolayısı ile, floresan ışık mikroskoplarında uygun uyarım ve ışımaya filtre takımları kullanılarak, sadece belli bir probun uyarılması ve yine sadece bu probun yaydığı ışımının görüntülenmesi mümkün olmaktadır.

İn situ hibridizasyon yöntemleri incelenen örneğin özelliklerine göre üç gruba ayrılabilir: Metafaz, İnterfaz ve “Fibre” FISH. Metafaz yönteminde, metafaz dönemindeki hücrelerde belirli DNA dizinlerinin sayısı ve kromozomlardaki yeri incelenebilmekte, kromozomlardaki delesyon, translokasyon ve gen füzyonları ayrıntılı olarak görüntülenebilmektedir. İnterfaz ISH yönteminde DNA dizinlerinin durumu ve kromozomal anomaliler hakkında ayrıntılı bilgi elde edilemese de, bu yöntem incelenmek istenen hücrelerin büyük kısmının interfaz döneminde olduğu patolojik ve sitolojik örnekler üzerinde yapılan araştırma ve tanısal değerlendirmelerde çok kullanışlı olmaktadır. “Fibre” FISH yönteminde hücreler enzimatik yollarla sindirilerek, DNA içerikleri primer iplik haline indirgenmekte ve incelenmek istenen nükleik asit dizinleri çok yüksek çözünürlükle görüntülenebilmektedir.<sup>37</sup>

İn situ hibridizasyon yönteminde kullanılan problemler üç grupta toplanabilir. Kromozom Sayım Problemleri (“Chromosome Enumeration Probe” veya kısaca CEP) kromozom sentromerindeki kromozoma spesifik tekrar dizinlerine yönelik olup, belirli bir kromozomun sentromer bölgesinin işaretlenmesini ve nükleustaki sayısının belirlenmesini mümkün kılmaktadır. “Locus Specific Identifier” problemleri (LSI) belirli bir nükleik asit dizinine spesifik olup, hedef hücredeki genlerin yerinin ve sayısının belirlenmesinde, çeşitli genlerdeki delesyon, füzyon, ve translokasyon olaylarının görüntülenmesinde kullanılmaktadır. Spektral Karyotiplendirme (SKY) yönteminde, belirli floresan in situ hibridizasyon problemleri kullanılarak, metafaz plağında incelenen tüm kromozomlar farklı bir renkle işaretlenebilmekte, bu da hücrelerin karyotiplendirilmesinde ve kromozomal anomalilerin görüntülenmesinde büyük kolaylık sağlamaktadır.<sup>38</sup>

Floresan in situ hibridizasyon yönteminin radyoaktif ve kromojenik in situ hibridizasyon yöntemlerine göre en büyük avantajı; floresan yöntemde göreceli olarak daha kuvvetli sinyallerin elde edilmesi ve floresan yöntem ile bir örneğin aynı anda radyoaktif veya kromojenik yöntemlere kıyasla çok daha fazla sayıda prob ile işaretlenebiliyor olmasıdır. Bu sebeple, incelenmek istenen hedeflerin çok küçük olduğu ve çok dar bir alanda yerleştiği durumlarda, özellikle hücre nükleuslarında belirli kromozomların veya genlerin durumunu araştırmada floresan in situ hibridizasyon yöntemi ideal olmaktadır.<sup>35,37</sup>

Geçtiğimiz yıllar içerisinde ürotelial karsinomlarda görülen kromozomal anomaliler giderek daha kesin olarak tanımlanmıştır. Ürotelial karsinomlarda görülen kromozomal anomaliler, tek bir kromozoma sınırlı olmayıp, genelde birden fazla kromozomda sayıca artım olarak kendini göstermektedir. Özellikle 1, 3, 7, 9, 11 ve 17. kromozomların ürotelial karsinomlarda sıklıkla artmış olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur.<sup>39-41</sup>

Kromozomlarda sayıca artışlara ek olarak, 9. kromozom 21. Bölgesindeki p16 geninin homozigot kaybının da ürotelial karsinomlarda yüksek oranda ve diğer kromozomal anomalilere kıyasla neoplastik sürecin daha erken evrelerinde görüldüğü bildirilmektedir.<sup>42-44</sup>

2000 yılında, Sokolova ve arkadaşları, ürotelial karsinomlarda o güne kadar bildirilen kromozomal anomalileri temel alan, idrar örneklerine uygulanan floresan in situ hibridizasyon esasına dayanan bir tanısal yöntem geliştirdiklerini bildirmişlerdir.<sup>45</sup> İdrar örneklerinden elde edilen hücre yaymalarının her biri ayrı renkte floresan boya ile işaretli CEP 3, 7, 17 ve LSI 9p21 problemleri ile boyanması temelli bu yeni yöntemin, konvansiyonel idrar örneklerinde ürotelial karsinom tanısında %84.2 duyarlılık ve %91.8 seçiciliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Sokolova ve arkadaşlarının geliştirdiği FISH prob karışımı, UroVysion (Abbott Molecular, Illinois, ABD) adı altında ticari olarak sunulmuştur.

UroVysion yönteminin ilk sunumundan bu güne kadar yayınlanmış olan ve yöntemin geçerliliğini araştıran çalışmalar Tablo 2.8'de özetlenmiştir.<sup>6,45-55</sup> Bu yayınlara göre UroVysion yönteminin duyarlılığı ortalama %76.32 (%100-39.1, median %78) ve seçiciliği ortalama %84.56 (%100-65, median %88) olarak bulunmaktadır. Aynı yayınlarda, idrar sitolojisinin duyarlılığı ortalama %42.36 (%74-24.1, median %38), seçiciliği ise %85.52 (%100-50, median %90) olarak bildirilmektedir.

**Tablo 2.8** 2000-2007 yılları arasında yayınlanan bazı araştırmalarda FISH ve İdrar sitolojisi yöntemlerinin duyarlılık ve seçiciliğinin karşılaştırılması.

Referans	Yıl	Örnek sayısı	UroVysion (%)		Sitoloji(%)	
			Duyarlılık	Seçicilik	Duyarlılık	Seçicilik
Sokolova ve ark. <sup>45</sup>	2000	179	84.2	91.8		
Halling ve ark. <sup>6</sup>	2000	265	81	96	58	98
Dalquen ve ark. <sup>46</sup>	2002	51	79	70	35	94
Sarosdy ve ark. <sup>47</sup>	2002	146	71	66	26	80
Bubendorf ve ark. <sup>48</sup>	2004	72	83	96	30	95
Laudadio ve ark. <sup>49</sup>	2005	521	73	65	48	50
Daniely ve ark. <sup>50</sup>	2005	41	100	100	61.9	100
Sarosdy ve ark. <sup>51</sup>	2006	497	68.6	77.7	26	80
Junker ve ark. <sup>52</sup>	2006	141	60	82.6	24.1	90.5
Moonen ve ark. <sup>53</sup>	2007	105	39.1	89.7	40.6	89.7
Bergman ve ark. <sup>54</sup>	2007	41	77	93	74	78
Riesz ve ark. <sup>55</sup>	2007	55	100	87		

UroVysion yöntemi ile idrar örneği pozitifitesinin mesane karsinomlarında prognoz ve rekürrens ile ilişkisi üzerine sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır. Zellweger ve arkadaşları, 138 hastanın mesane yıkama sıvıları üzerinde yaptıkları

rekürrens araştırmasında, FISH pozitif hastaların %39'unda, FISH negatif hastaların ise %21'inde rekürrens bildirmişlerdir.<sup>56</sup> 2007 yılında Yoder ve arkadaşlarının mesane tümörü takibindeki 211 hastanın konvansiyonel idrar örnekleri üzerinde yaptıkları araştırma, FISH pozitif 81 hastanın %74'ünde, FISH negatif 169 hastanın ise %13'ünde rekürrens tariflemiş, sistoskopide mesane tümörü rekürrensi şüphesi bulunmayan hastaların %27'sinde FISH ile pozitif sonuç elde edildiğini bildirmiştir. İdrar örneklerinde FISH yöntemi ile pozitiflik saptanan bu hasta grubunun %65'inde 29 ay içerisinde rekürrens geliştiği izlenmiştir.<sup>57</sup>

Bütün bu bulgular göz önüne alındığında, ürotelial karsinomların erken tanısı ve operasyon sonrası rekürrens takibinde, mesane yıkama sıvılarına uygulanan FISH tekniğinin duyarlılık ve seçiciliğini araştırmak ve tanısal güvenilirliğini idrar sitolojisi ile karşılaştırmak; ürotelyal karsinomların sitomorfolojik özelliklerini gözden geçirmek; çok renkli çok problu FISH yönteminin kendi laboratuvarımız için pozitif tanı kriterlerini- ideal kesim noktalarını belirlemek amacı ile prospektif bir çalışma planlandı.

## MATERYAL VE METOD

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda mesane ürotelyal karsinomu şüphesi ya da izlemi nedeniyle sistoskopiye alınan 34 hasta ve klinik olarak mesane karsinomu şüphesi olmayan, taş, prostat hiperplazisi, üretral darlık gibi nedenlerle sistoskopi yapılan 20 hasta çalışma grubunu oluşturmaktadır.

Sistoskopi uygulanan toplam 54 hastaya ait idrar örnekleri sitolojik olarak değerlendirildi ve bu örnekler "çok problu çok renkli floresan in situ hibridizasyon" (FISH) testi uygulandı. Hastaların büyük çoğunluğunda sitolojik inceleme ve FISH analizi, mesane yıkama sıvılarında yapıldı; yalnızca, sitoloji için 4, FISH için 2 hastada spontan idrar kullanıldı. Sistoskopi sırasında saptanan ve eksize edilen tüm lezyonlar histopatolojik olarak incelendi; idrar sitolojisi ve çok problu çok renkli FISH tekniğinin tanısal doğruluğu araştırılırken, klinik ve histopatolojik izlem altın kriter kabul edildi.

### 3.1. Örnek toplama.

Araştırmaya dahil edilmesi düşünülen kişilerle sistoskopi öncesi konuşuldu, araştırmanın amaçları, kapsamı, riskleri, kendilerinden beklenenler anlatıldı, varsa soruları yanıtlandı ve şahit huzurunda imzalı aydınlatılmış onamları alındı. Buradan ameliyathaneye alınan ve genel anestezi uygulanan hastaların mesaneleri, sistoskopi girişiminin hemen başlangıcında sistoskop ile yaklaşık 250ml %0,9 izotonik sodyum klorür solüsyonu ile yıkandı. Steril plastik kaplarda toplanan yıkama solüsyonu gün bitimine kadar +4°C ısıda saklandı.

### 3.2. Örnek fiksasyon işlemleri.

Örnek hazırlama işlemleri firma önerileri doğrultusunda planlandı. Hastadan alınan mesane yıkama sıvısı örneğinden 30 ml rutin sitolojik tetkik için ayrıldı. Bu materyal önce 1670 devirde 5dk santrifüj edildi, ardından elde edilen pelet, üzerine 1-2 damla “Cytospin Collection Fluid” eklenip Shandon Cytospin cihazında (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) 5 dk süreyle 1500 rpm'de santrifüj edilerek her olgu için ikişer adet sitosantrifüj preparatı hazırlandı. Preparatlar Papanicolaou boyası ile boyandı.

Geri kalan örnek 50ml'lik Falkon tüplerine bölüştürüldü ve oda ısısında 600g'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatant, pelete 1-2 ml kalana kadar atıldı. Peletler falkon tüpleri içerisinde kalan süpernatant içinde tekrar çözüldü ve bütün tüplerdeki çözeltiler 15ml'lik falkon tüpünde birleştirildi. 50ml'lik falkon tüpleri 10ml PBS (fosfat tamponlu salin) ile peş peşe yıkandı ve bu yıkama sıvısı da pelet çözeltilerinin birleştirildiği 15ml'lik falkon tüpüne eklendi. Çözelti tekrar oda ısısında 600g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant pelete 0,5 ml kalana kadar atıldı ve pelet, kalan 0,5 ml'lik süpernatant içerisinde tekrar çözüldü. Çözelti üzerine 5 ml Carnoy fiksatif (3:1, Metil Alkol:Glasial Asetik Asit) eklenerek vortekslendi. Bu süspansiyon -20°C'de 3 saat bekletilerek örneğin fiksasyonu sağlandı. İşlemin devamı aynı gün içinde tamamlanamayacak ise, örnekler fiksasyon aşamasında -20°C'de bekletildi. Fikse örnek oda ısısında 600g'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant tamamen atıldı. Pelet 5 ml taze Carnoy fiksatif içinde tekrar çözüldü ve bu çözelti tekrar oda ısısında 600g'de 5 dakika santrifüjlendi. Bu yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı.

### 3.3. Preparat hazırlama işlemleri.

Son santrifüj işleminden sonra, elde edilen pelet 1ml Carnoy fiksatif içerisinde tekrar çözüldü. Pozitif yüklü cam preparatlar (marka) distile su ile yıkandı ve kurulandı. İnce uçlu cam pastör pipetine alınan 0,5 ml süspansiyon preparat 45° açı ile tutulurken preparat üzerine damla damla düşürüldü. Preparat havada kurutuldu

ve ışık mikroskopu ile (kondansör ayarı değiştirilip, hücrelerin boyanmadan da ışığı çift kırarak görünmesi sağlanarak) incelemeye alındı. Bu aşamada 200 büyütme alanına 100 ila 200 hücre düşürülmesi hedeflendi. Hedef hücre miktarından daha az hücre gözlenen preparatlara geri kalan 0,5 ml'lik süspansiyonun tümü tekrar düşürüldü. Preparatta hedeflenenden daha fazla hücrenin gözleendiği durumlarda ise geri kalan 0,5 ml'lik süspansiyonun üzerine duruma göre 0,5 ila 3 ml kadar daha carnoy fiksatif eklenerek süspansiyonun seyrelmesi sağlandı. Seyreltilen hücre süspansiyonundan 0,5 ml yeni bir preparata düşürülerek tekrar ışık mikroskopunda hücre yoğunluğu kontrol edildi.

#### **3.4. FISH Probu.**

Floresan in situ hibridizasyon işlemi için Vysis UroVysion idrar FISH kiti (Abbott Molecular, Illinois, ABD) kullanıldı.

#### **3.5. FISH öncesi preparat ön hazırlık işlemleri.**

Preparatlar oda ısısında havada tamamen kurutulduktan sonra,  $73\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklığında 2X SSC (salin sodyum sitrat) içinde 2 dk tutuldu, buradan sonra  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklığında 0.05mg/ml Pepsin çözeltisi içinde 10dk bekletildi. Proteaz sindirim işleminden sonra oda sıcaklığında 1X PBS ile 5 dk yıkanan preparatlar, %1 Formalin çözeltisi içerisinde 5 dk fikse edildi. 1X PBS ile tekrar yıkanan preparatlar, sırası ile %70, %85 ve %100'lük etil alkol çözeltileri içerisinde 1'er dakika bekletilerek dehidrate edildi. Dehidratasyon işlemi sonrası preparatlar havada kurutuldu.

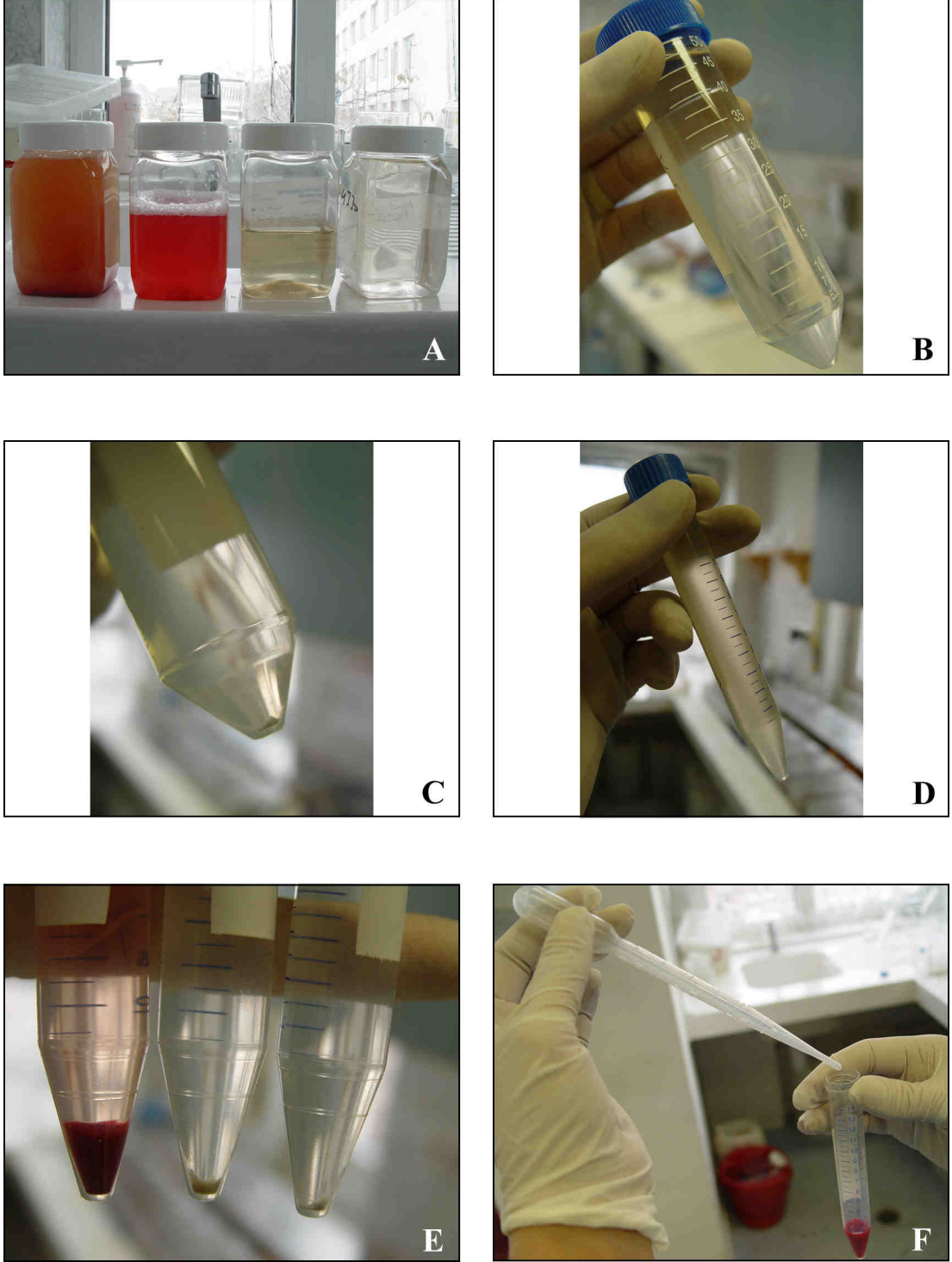
#### **3.6. FISH işlemleri.**

UroVysion prob karışımı  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den alınarak oda ısısına getirildikten sonra vortekslenerek karıştırıldı. Preparatlar tekrar faz kontrast mikroskopunda incelendi, hibridizasyon için belirlenen uygun alan elmas uçlu cam kalem ile preparatın arka yüzünde işaretlendi. Bu alana 3µl prob karışımı damlatıldı ve üzeri hemen

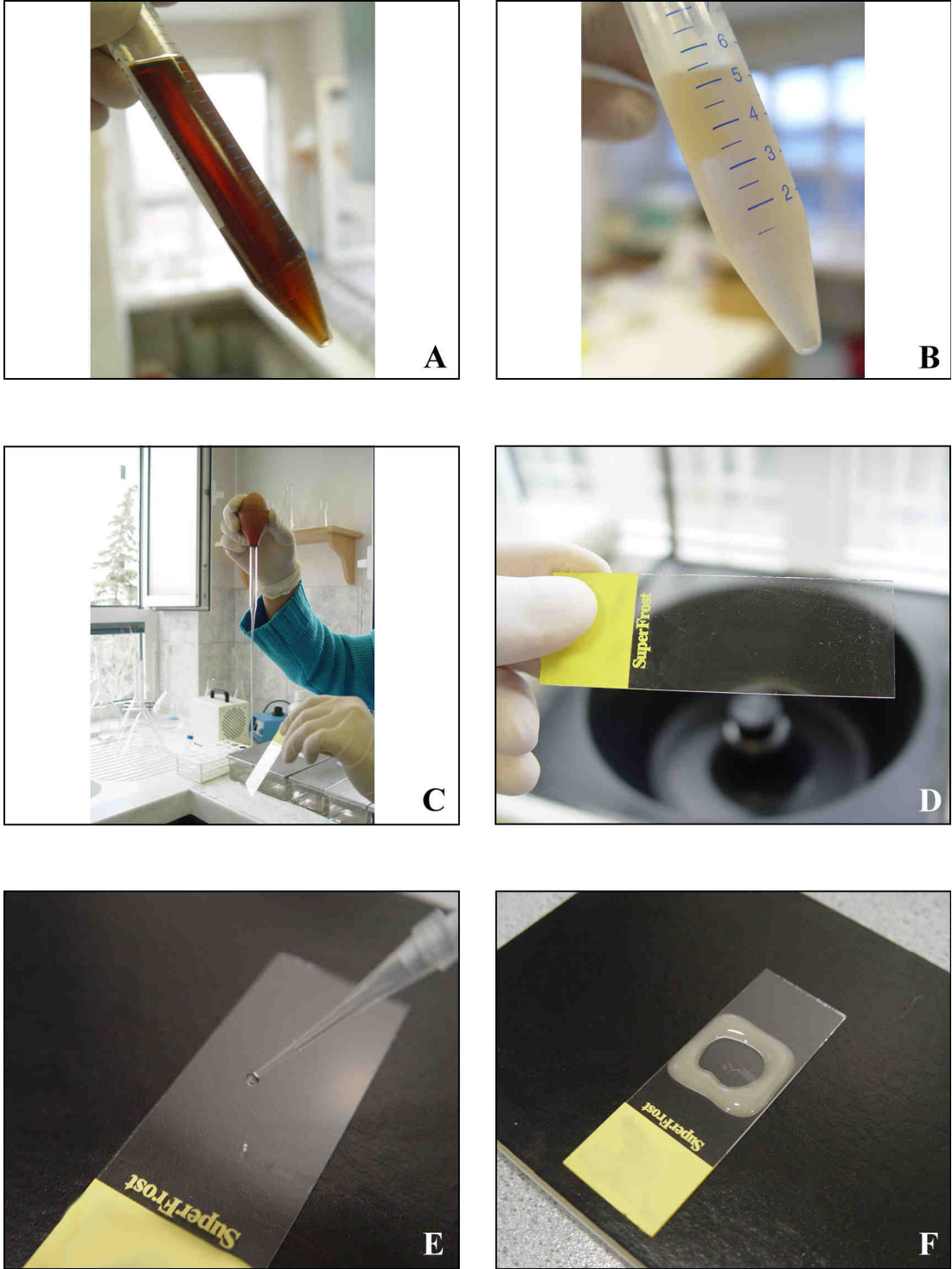
12x12mm'lik cam lamel ile kapatıldı. Lamel kenarları yapıştırıcı ile kapatıldı. StatSpin Thermobrite otomatik hibridizasyon cihazı (Iris International Inc., Chatsworth, California, ABD) denatürasyon 73°C'de 2 dakika, hibridizasyon 39°C'de 16 saat olacak şekilde programlandı. Preparatlar otomatik hibridizasyon cihazı içine yerleştirildi ve hibridizasyon programı başlatıldı.

### **3.7. Hibridizasyon sonrası yıkama.**

Program bitiminde, lamel üzerindeki yapıştırıcı elle söküldü, lamel açıldı ve preparat hemen 73°C'de 0.4X SSC / %0.3 NP-40 (Nonidet P-40) çözeltisine alındı. Preparatlar bu çözelti içerisinde 2 dakika bekletildikten sonra oda ısısında 2X SSC / %0.1 NP-40 çözeltisine alınıp, 5sn-1dk boyunca yıkandı. Yıkama solüsyonundan çıkarılan preparatlar karanlık ortamda oda ısısında havada tamamen kurutuldu. Preparat üzerindeki hedef bölgeye 15µl DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) çözeltisi eklendi ve preparat 22x40mm'lik lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar -20°C'de saklandı.



**Şekil 3.1.** İdrar örneğinin toplanmasından FISH boyanmasına kadar sırası ile geçirdiği işlemler. A. Değişik şiddette hematüri gösteren idrar örnekleri. B. Santrifüleme öncesi idrar örneği. C. Santrifüleme sonrası hücre pelleti. D. Vakaya ait tüm örnekler 15ml'lik santrifüj tüpünde birleştiriliyor. E. Santrifüj sonrası örnekten elde edilen hücre pelleti. Hematüri gösteren idrar örneğinde pellet kırmızı kan hücreleri altında görülemez halde. F. Tekrar çözölen pelletin Carnoy fiksatifisi ile fikse edilmesi.



**Şekil 3.2.** İdrar örneğinin toplanmasından FISH boyanmasına kadar sırası ile geçirdiği işlemler. A. Carnoy fiksatif ile fiksasyondan sonra hematurili idrar örneğinde izlenen hemoliz. Örneğin berraklaştığı izleniyor. B. Carnoy fiksatif ile üç defa yıkanmadan sonra örneğin son hali. C. Damlatma yöntemi ile örneğin preparata yayılması. D. Preparata fikse olan örnek materyali. E. FISH prob karışımının preparata eklenmesi. F. Prob karışımı üzeri cam lamel ile örtülmesi ve kenarlarının yapıştırıcı ile kapatılmasından sonra preparatın son hali.

### 3.8. Preparatların incelenmesi.

İnceleme öncesi, -20°C’de bekletilen preparatlar oda ısısına getirildi. İnceleme için uygun filtre takımları (Applied Imaging Co., San Jose, Kaliforniya, A.B.D.) kurulu Olympus BX-51 floresan mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) kullanıldı. Görüntü analizi için CytoVision görüntü analizi programına (Applied Imaging Co., San Jose, Kaliforniya, A.B.D.) başvuruldu. DAPI filtresi ile hücre nükleus morfolojisi, “Spectrum Red” filtre takımı ile 3. kromozom CEP probu, “Spectrum Green” filtre takımı ile 7. kromozom CEP probu, “Spectrum Aqua” filtre takımı ile 17. Kromozom CEP probu ve “Spectrum Gold” filtre takımı ile 3. Kromozom CEP probu görüntülenerek hedef hücrelerdeki kromozom sinyalleri incelendi.

Çok renkli çok problu floresan in situ hibridizasyon yöntemi ile bir idrar örneğine tanı konulması süreci, hücre bazında ve örnek bazında olmak üzere iki ana aşamaya ayrılabilir. İlk olarak FISH uygulanan ürotelial epitel hücrelerinin kromozom sayıları belirlenerek her hücrenin anormal veya normal olduğuna karar verilmekte, sonra örnekteki anormal hücre sayısı belirlenen bir kesim değeri ile karşılaştırılarak örneğe tanı konulmaktadır.

Araştırmamız dahilindeki örneklerde FISH analizi ilk olarak UroVysion kiti için firma tarafından önerilen kriterler doğrultusunda yapıldı. Buna göre, preparatta FISH probu uygulanan bölgenin tümü DAPI filtresi ile taranarak, nükleer boyutlarda artım, veya kromatin dağılımında düzensizlik izlenen 20 hücredeki FISH sinyalleri sayıldı . Hücre bazında 3, 7 veya 17. kromozomlardan iki veya daha fazlasında sayıca artım gösteren veya 9p21 lokusunda homozigot kayıp bulunan hücreler anormal kabul edildi. 3, 7 ve 17. kromozomlarda artım gösteren 4 veya daha fazla hücre, ya da 9p21 lokusunda homozigot delesyon gösteren 12’den fazla hücre içeren örneklere “pozitif” sonuç verildi.

Çok renkli çok problu floresan in situ hibridizasyon yönteminin bölümümüzde uygulamaya geçirilmesi sürecinde, UroVysion yönteminin geçerliliğinin değerlendirilmesi yanısıra, bölümümüze ait FISH tanı kriterlerinin geliştirilmesi planlandı. Ürotelyal neoplazisi olan hastaları, kontrol grubundan

ayırmada, bu çalışma kapsamında ortaya çıkan ideal kesim noktalarının belirlenmesi yoluna gidildi. Buna ek olarak, Sokolova ve arkadaşlarının çok renkli çok problu floresan in situ hibridizasyonu yöntemi ile mesane tümörlerine tanı konulması üzerine yayınlanmış araştırmasından<sup>45</sup> yola çıkılarak, örnek preparatlardaki hücrelerin sayılması aşamasında, “Sayım Yöntemi” ve “Tarama Yöntemi” olarak adlandırılabilir iki yöntem denendi.

*Sayım yöntemi:* Preparat üzerinde peş peşe 100 epitelyal hücre nükleusu içerisinde izlenen FISH sinyalleri, morfoloji gözetilmeden sayıldı.

*Tarama yöntemi:* Preparat, önce DAPI filtresi ile taranarak epitelyal hücrelerin nükleer morfolojileri incelendi. Morfolojik olarak atipi gösteren 20 nükleusda izlenen sinyaller sayıldı.

Her iki yöntemle de değerlendirme esnasında, 3, 7, 17. kromozom santromeri ve 9p21 LSI sinyalleri 4'er adet sayılan hücreler tetraploid kabul edilerek, bu hücreler idrar örneklerinde UroVysion FISH yönteminin uygulanması konusunda yayımlanan makalelere<sup>56,58,59,60</sup> uyumlu olarak anormal hücre sınıflandırmasına dahil edilmedi. Preparatlar bir araştırmacı (BG) tarafından iki ayrı yöntem ile değerlendirildi ve sonuçlar her iki yöntem için ayrı ayrı hazırlanmış formlara kaydedildi (Bkz. Ek 1 ve 2).

### **3.9. Bulguların değerlendirilmesi ve istatistik analizler.**

Sitoloji ve “multiprobe multicolor FISH” testinin tanısallı doğruluğunu araştırmak, her iki tekniğin duyarlılık ve seçiciliklerini belirlemek amacı ile sitolojik incelemelerden sonraki 1 ay içerisinde histopatolojik olarak mesane ürotelyal karsinomu gösterilmiş hastalar ve klinik olarak mesane karsinomu şüphesi olmayan ve izleminde de karsinom saptanmamış hastalardan oluşan bir grup seçildi, mesane karsinomu öyküsü olan ancak sistoskopi sonrası rekürrens saptanmamış olgular bu analizlerin dışında bırakıldı.

Patoloji Anabilim Dalı Sitoloji Ünitesi rutin çalışmaları sırasında farklı patolojiler tarafından rapor edilmiş olan sitolojik preparatlar, iki araştırmacı (BG, PF) tarafından, klinik-histopatolojik veriler ve FISH sonuçları bilinmeksizin tekrar değerlendirildi. Sitolojik tanımlar, benign, atipik ve malign olmak üzere üç grupta toplandı. “Çok problu çok renkli FISH” testi sonuçları, üretici firmanın önerdiği kriterler doğrultusunda negatif ve pozitif olmak üzere iki gruba ayrıldı: Bu ayırım için önerilen kriter/kesim noktası “dört veya daha çok hücrede 3, 7, 17. kromozomlardan en az ikisinde anöploidi ya da 12 veya daha çok hücrede 9p21 lokusunda homozigot kayıp” olarak tanımlanmaktadır.

Sitolojik inceleme ve “çok problu çok renkli FISH” testinin, mesane ürotelyal karsinomlarının tanısındaki güvenilirliği, duyarlılık ve seçicilik hesaplanarak belirlendi; her iki test için elde edilen değerler Mc-Nemar testi kullanılarak karşılaştırıldı.

“Çok problu çok renkli FISH” testinin kapsamında bulunan CEP3, CEP7, CEP17 ve 9p21 lokus spesifik probun, tek başlarına, karsinom olgularını saptamadaki değeri ROC (Receiver Operating Characteristic) analizi ile araştırıldı. Her bir kromozom için ideal kesim noktaları belirlendi.

ROC analizinde, belirli kesim noktalarında elde edilen duyarlılık ve seçicilik değerlerinin oluşturduğu bir eğri çizilip grafik üzerinde gösterilmekte ve bu grafiğe göre mümkün olan en yüksek duyarlılık ve seçicilik değerlerini veren kesim noktası belirlenmektedir. ROC analizi ile, farklı testler/yöntemler için oluşan eğriler altında kalan alanlar karşılaştırılarak, birden çok testin/yöntemin etkinlikleri arasındaki fark değerlendirilebilmektedir.

Sayma ve tarama yöntemleri ile elde edilen FISH sonuçlarının, güvenilirlik ve tanısal doğruluğa etkisini saptamak amacıyla her iki yöntemin ROC eğrileri karşılaştırıldı.

Kromozomlar için tek tek yapılan analiz sonrasında, kombine CEP3, CEP7, CEP17 poliploidisinin mesane ürotelyal karsinomlarının tanısındaki güvenilirliği ROC analizi ile değerlendirildi. Kombine poliploidi için ideal kesim noktası bulunup,

9p21 lokusundaki homozigot kayıp için belirlenmiş olan kesim noktası ile birleştirilerek, “multiprobe multicolor FISH” testi için laboratuvarımızın pozitif tanı kriteri belirlendi.

Bu çalışma 25.10.2007 tarihinde 2007/11 LUT 07/6 numara ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı.

## BULGULAR

Çalışma grubunu oluşturan 54 hastanın 48'i erkek, 6'sı kadın olup, yaşları 27-83 arasında değişmekte idi. Ortalama yaş 54.66 ve median yaş 55.5 olarak bulundu. Mesane karsinomu şüphesi ya da izlemi nedeniyle sistoskopiye alınan 34 hastadan 20'sinde ürotelyal karsinom saptandı, 7'sinde alınan biyopsi örneklerinde inflamatuvar değişiklikler görüldü, 7'sinde sistoskopik olarak herhangi bir lezyon saptanmadı ve biyopsi alınmadı. Mesane karsinomu şüphesi ile sistoskopi uygulanan hastalardan ikisinde bu şüphe, hematüri etyolojisi araştırılırken idrar sitolojisinde görülen atipik ürotelyal hücrelere dayanmakta idi, ancak bu hastalarda sistoskopi sırasında ya da sonraki klinik izlemde karsinom görülmedi, atipinin bir olguda üreter taşı diğerinde sistite ikincil olduğu düşünüldü. Biyopsi materyallerinde ürotelyal karsinom saptanan iki hasta ile polipid sistit saptanan bir hastada, örneklerde polimorfonükleer lokositlerin çok yoğun olması ya da yeterli hücre bulunmaması nedeniyle FISH ile inceleme yapılamadı ve bu olgular çalışma dışında bırakıldı.

İdrar sitolojisi ve çok problu çok renkli FISH testinin tanısal değerini araştırmak, FISH testi için ideal kesim noktasını saptamak amacıyla, klinik ve histopatolojik bulgularına göre olgular üç gruba ayrıldı:

- 1- Ürotelyal neoplazi saptanan 18 olgu (hasta grubu);
- 2- Nonneoplastik süreç tanısı alan, öyküsünde mesane karsinomu olmayan 22 olgu (kontrol);
- 3- Mesane karsinomu ile izlenen, çalışmaya dahil edildikleri tarihte sistoskopik ve histopatolojik olarak rekürrens göstermeyen 11 olgu (izlem grubu).

Her iki inceleme yönteminin duyarlılık ve seçiciliklerini saptamak, FISH testinin- kombine ve her bir kromozom için ayrı ayrı olmak üzere- ideal kesim noktalarını belirlemek için yapılan istatistiksel analizlerde 1. ve 2. grupta yer alan

olgular kullanıldı; 3. grupta yer alan hastalarda sitoloji ve FISH sonuçlarının, ulaşılabilen uzun süreli izlem bulguları ile ilişkisi değerlendirildi.

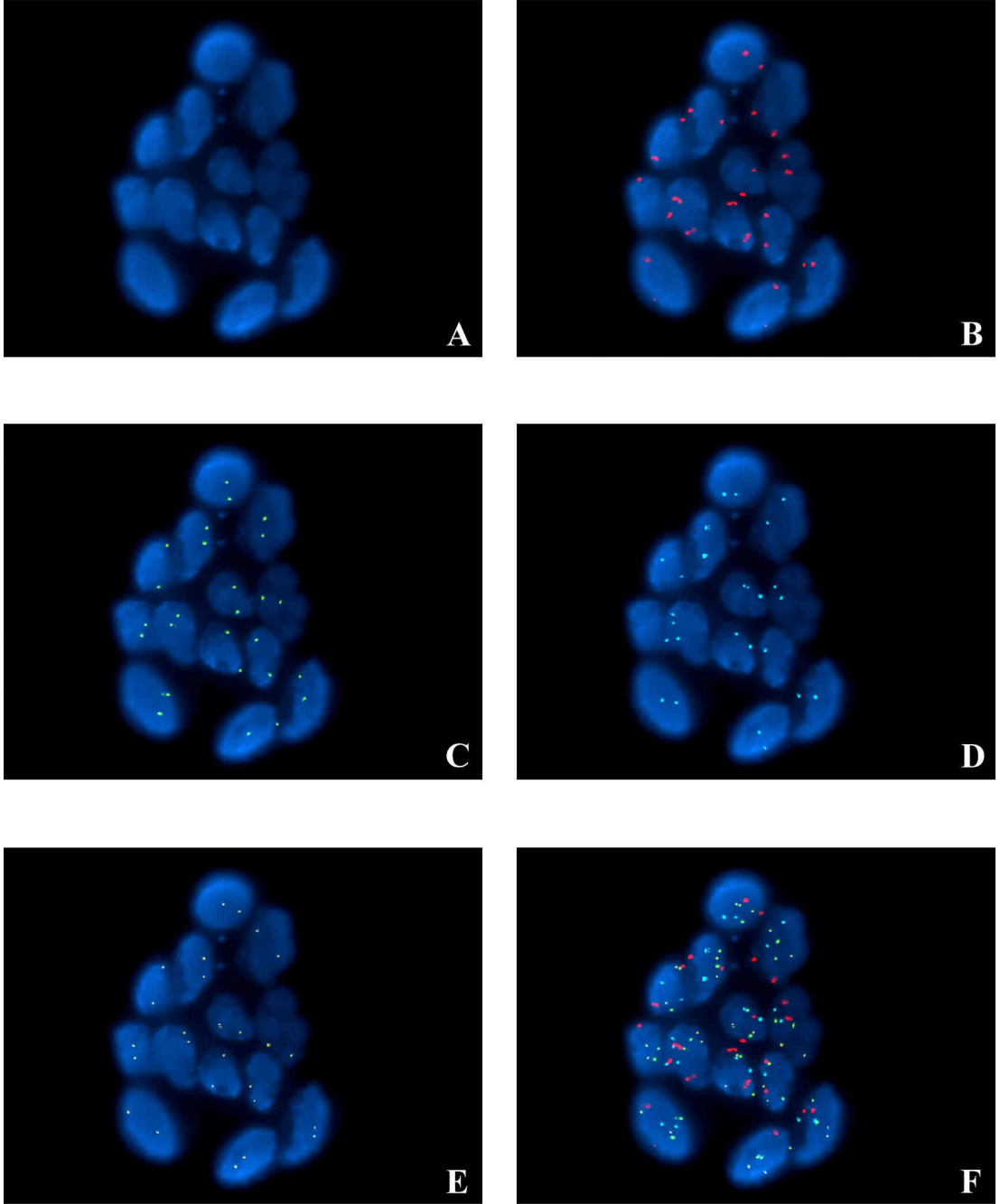
Olguların klinik verileri, sitolojik ve histopatolojik tanıları, “çok problu çok renkli FISH” sonuçları ve izlem bulguları için Ek 3’e bakınız.

Ürotelyal neoplazi saptanan hasta grubu ile non-neoplastik süreç olarak değerlendirilen kontrol grubuna sitolojik inceleme sonucunda verilen tanıları Tablo 4.1 de görülmektedir. Olguların %22.5’i benign veya malign olarak sınıflanamayarak “atipik” tanısı almıştır.

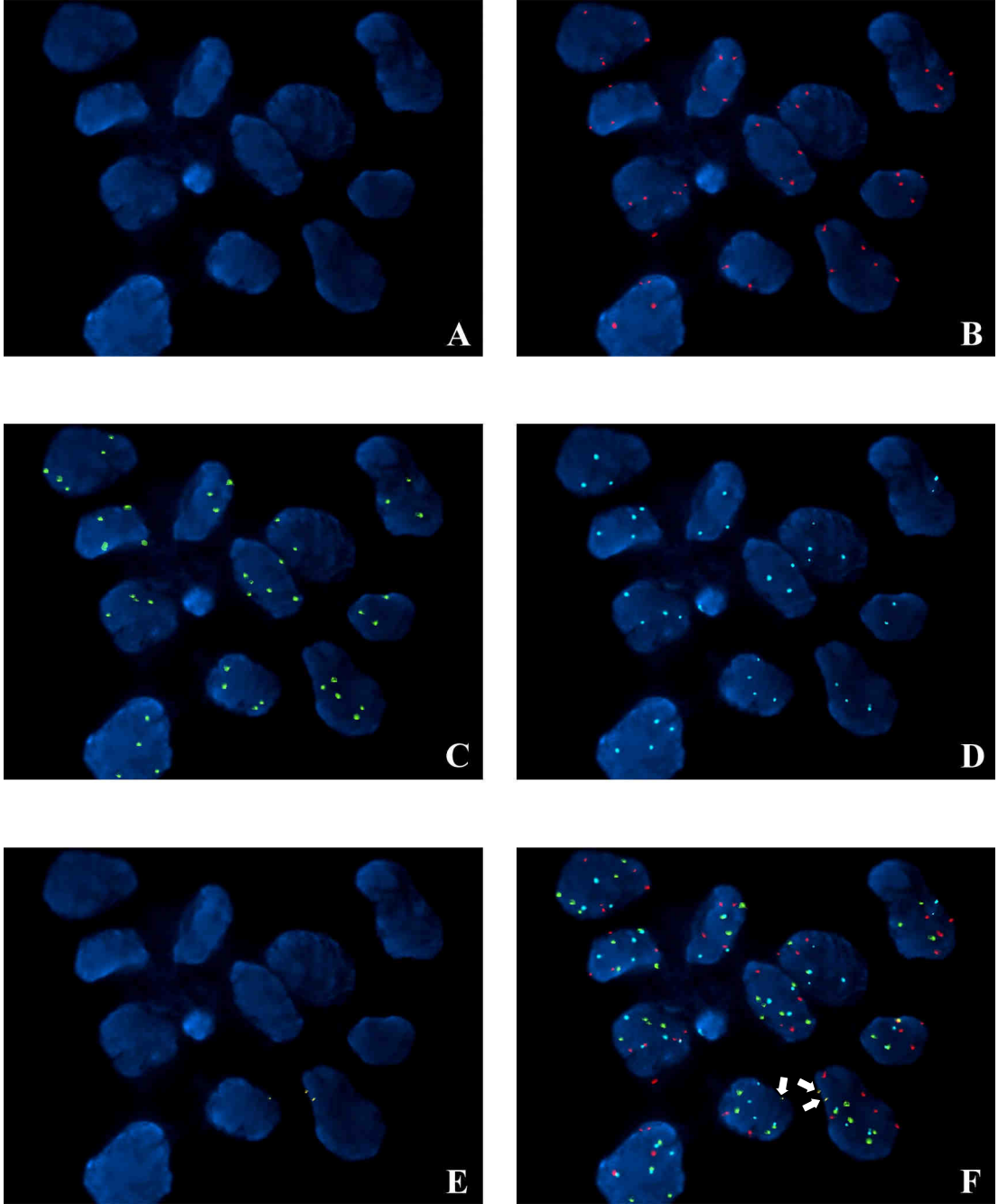
**Tablo 4.1.** Sitolojik tanıların histopatolojik tanıları ve klinik veriler ile karşılaştırılması.

Sitolojik Tanı	Histopatolojik ve Klinik Tanı	
	Nonneoplastik Süreç	Ürotelyal Neoplazi
<b>Benign</b>	18	6
<b>Atipik</b>	4	5
<b>Malign</b>	0	7
<b>Toplam</b>	22	18

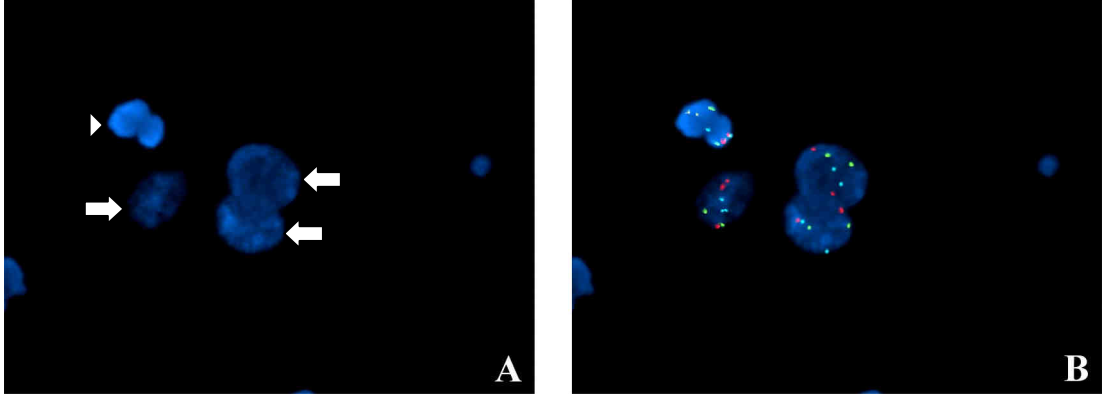
Araştırmamız dahilindeki örneklere floresan in situ yöntemi ile tanı koymak için ilk olarak Urovysion kiti için firma tarafından önerilen kriterler doğrultusunda, preparatta FISH probu uygulanan bölgenin tümü DAPI filtresi ile taranarak, nükleer boyutlarda artım, veya kromatin dağılımında düzensizlik izlenen hücrelerdeki FISH sinyalleri sayıldı (Şekil 4.1). Hücre bazında 3, 7 veya 17. kromozomlardan iki veya daha fazlasında sayıca artım gösteren veya 9p21 lokusunda homozigot kayıp bulunan hücreler anormal olarak kabul edildi. Örnek bazında tanı konulurken, 3, 7 ve 17. kromozomlarda artım gösteren 4 veya daha fazla hücre, veya 9p21 lokusunda homozigot delesyon gösteren 12’den fazla hücre içeren örneklere pozitif/malign tanısı konuldu (Şekil 4.2 ve 4.3).



**Şekil 4.1.** Normal bir ürotelial hücre grubunun FISH mikroskopunda çeşitli filtreler ile değerlendirilmesi. A. DAPI filtresi ile hücre nükleuslarının morfolojisi ve kromatin dağılımı. Hücreler oval-yuvarlak şekilli ve minimal pleomorfizm izleniyor. Kromatin dağılımı homojen. B. Spectrum Red filtresi ile 3. kromozom santromerleri, C. Spectrum Green filtresi ile 7. kromozom santromerleri, D. Spectrum Aqua filtresi ile 17. kromozom santromerleri ve E. Spectrum Gold filtresi ile 9. kromozom p21 lokusu izlenebiliyor. F. Her bir filtre ile elde edilen görüntülerin bilgisayar ortamında üst üste bindirilmesi ile elde edilen görüntü. Her hücrede bütün FISH sinyallerinden ikişer adet mevcut.



**Şekil 4.2.** Malign hücrelerin FISH mikroskopunda incelenmesi. A. Şekildeki yüksek dereceli ürotelial karsinom hücrelerinde DAPI filtresi ile şiddetli pleomorfizm ve nükleer kontürlerde belirgin düzensizlik izlenmekte. Kromatin dağılımı heterojen. B, C, D ve E. Aynı hücrelerin Spectrum Red, Green, Aqua ve Gold filtreleri ile görüntüsü. F. Elde edilen birleşik görüntüde malign hücrelerde 3, 7, ve 17. kromozom sentromer sinyallerinde izlenen belirgin artım. Sinyal sayıları hücreden hücreye de değişiklik gösteriyor. 9p21 lokusuna ait sinyaller nadiren izlenebiliyor (oklar).



**Şekil 4.3.** Sadece p16 delesyonu gösteren malign hücreler. A. Şekildeki düşük dereceli ürotelial karsinom hücrelerinde DAPI filtresi ile minimal pleomorfizm izleniyor (büyük oklar: malign hücreler, küçük ok: polimorfonükleer lökosit). B. 3, 7 ve 17. kromozom sinyalleri diploid, ancak 9p21 sinyalinde homozigot kayıp mevcut.

Ürotelyal neoplazi ve nonneoplastik süreç tanısı almış hastalara verilen “multiprobe multicolor FISH” sonuçları Tablo 4.2 de görülmektedir.

**Tablo 4.2.** Çok problu çok renkli FISH testi sonuçlarının histopatolojik tanıları ve klinik verileri ile karşılaştırılması.

FISH Tanısı	Histopatolojik ve Klinik Tanı	
	Nonneoplastik Süreç	Ürotelyal Neoplazi
<b>Negatif</b>	22	4
<b>Pozitif</b>	0	14
<b>Toplam</b>	22	18

Firma kriterleri kullanılarak yapılan bu değerlendirmede çok problu çok renkli FISH (Urovysion) testinin duyarlılığı %77.7, seçiciliği %100 olarak bulundu.

İdrar sitolojisinin duyarlılık ve seçiciliği ise iki şekilde hesaplanabilir:

1-Atipik tanısı alan olgulara karsinom tanısı verilmemiş olduğundan, atipik sitoloji “negatif” sonuç olarak kabul edildiğinde, idrar sitolojisinin duyarlılığı %38.8, seçiciliği %100 olmaktadır.

2- Atipik tanısı alan olgular, karsinom şüphesi nedeniyle sistoskopi v.b. yöntemlerle daha ileri araştırmaya alındığından, sitoloji sonucu “pozitif” kabul edildiğinde duyarlılığın %66.6, seçiciliğin %81.8 olduğu görülmektedir.

İdrar sitolojisi ile çok renkli çok problu FISH (Urovysion) testinin mesane karsinomlarının saptanmasındaki duyarlılık ve seçicilikleri karşılaştırıldı:

Atipik sitoloji sonucu negatif kabul edilerek yapılan hesaplamalarda, FISH testinin anlamlı olarak daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu görüldü ( $p=0,0082$ ). Her iki test için de 100 olan seçicilikler arasında fark yoktu.

Atipik sitoloji sonucu pozitif kabul edilerek yapılan analizde, her iki testin duyarlılıkları arasında fark yok iken ( $p=0.4142$ ), FISH testinin anlamlı olarak daha yüksek seçicilik gösterdiği saptandı ( $p=0,045$ ).

Sitolojide atipik olarak değerlendirilen 9 olgudan 7si FISH ile doğru sınıflandı, yalnızca 2 düşük dereceli karsinom olgusunda FISH ile yalancı negatif sonuç alındı.

İdrar sitolojisi ve FISH testinin düşük dereceli ve yüksek dereceli ürotelyal neoplazi tanısı verilen hastalara dağılımı Tablo 4.3 ve Tablo 4.4 de görülmektedir.

**Tablo 4.3.** Düşük dereceli ve yüksek dereceli ürotelyal neoplazilere idrar sitolojisi ile verilen tanıları.

Sitolojik Tanı	Histopatolojik Tanılar		
	PUNLMP	Düşük Dereceli Ürotelyal Karsinom	Yüksek Dereceli Ürotelyal Karsinom
<b>Benign</b>	2	3	1
<b>Atipik</b>	0	3	2
<b>Malign</b>	0	1	6
<b>Toplam</b>	2	7	9

**Tablo 4.4.** Düşük dereceli ve yüksek dereceli ürotelyal neoplazilerde çok renkli çok problu FISH sonuçları.

FISH Tanısı	Histopatolojik Tanılar		
	PUNLMP	Düşük Dereceli Ürotelyal Karsinom	Yüksek Dereceli Ürotelyal Karsinom
<b>Negatif</b>	2	2	
<b>Pozitif</b>	0	5	9
<b>Toplam</b>	2	7	9

Yüksek dereceli ürotelyal karsinom saptanan 9 hastadan 6 sına (%66.6) idrar sitolojisi ile malign tanısı verilirken, düşük dereceli ürotelyal karsinom saptanan 7 olgudan yalnızca birine (%14.2) bu tanı verilebildi, PUNLMP tanısı alan olguların ikisi de sitolojide benign olarak değerlendirildi.

Yüksek dereceli karsinomların tümünde çok renkli çok problu FISH-Urovysion testi ile pozitif sonuç alınırken, düşük dereceli karsinom saptanan 7 olgudan 5 inde (%71.4) test sonucunun pozitif olduğu görüldü. PUNLMP tanısı alan 2 olguda FISH sonucu negatif idi.

Bu grupta, duyarlılık ve seçicilik hesaplamaları, her iki inceleme yöntemi için bu değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması, alt gruplarda yer alan olgu sayılarının çok az olması nedeniyle yapılamadı. Bununla birlikte, her iki inceleme yönteminin de yüksek dereceli neoplazileri saptamada düşük dereceli neoplazilere göre daha duyarlı olduğu dikkati çekti. Düşük dereceli neoplazilerde daha belirgin olmak üzere, her iki grupta da FISH testinin sitolojiye göre daha çok olguda pozitif sonuç verdiği görüldü.

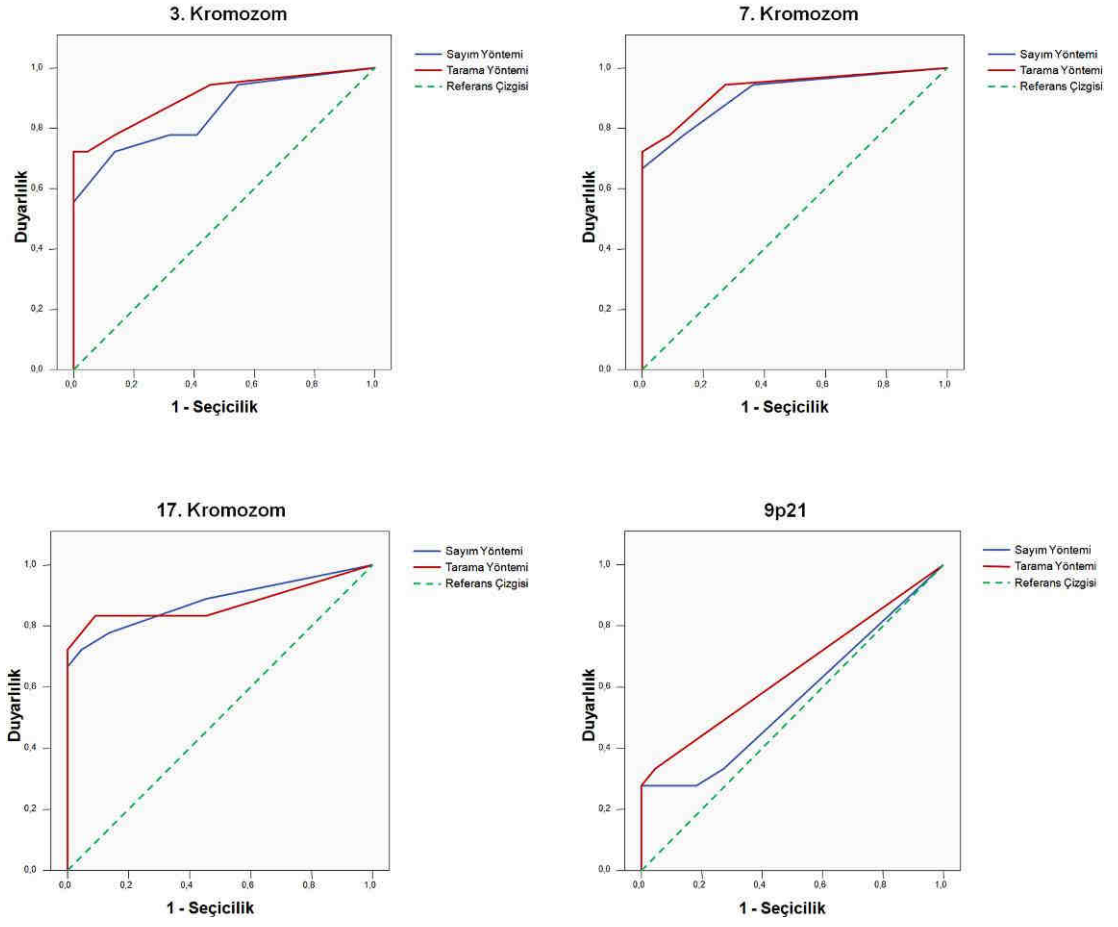
Çok renkli çok problu floresan in situ hibridizasyon yönteminin kapsamında bulunan CEP3, CEP7, CEP17 ve 9p21 LSI ile saptanan kazanım ve kayıpların olgulara dağılımı, her bir prob için benign-malign hasta gruplarını ayırmada ideal kesim noktaları ve bu kesim noktalarında elde edilen duyarlılık ve seçicilikler belirlendi. Preparatlardaki hücrelerin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan, "Sayma Yöntemi" ve "Tarama Yöntemi" nin sonuçlara etkisi araştırıldı. Tablo 4.5

ütrotelyal neoplazi saptanan ve nonneoplastik süreç tanısı alan hastalarda tarama ve sayma yöntemleri ile bulunan ortalama anormal hücre sayılarını göstermektedir.

**Tablo 4.5.** Benign ve malign hasta gruplarında tarama ve sayma yöntemi ile bulunan ortalama anormal hücre sayılarının incelenen kromozomlara göre dökümü.

Nonneoplastik süreç	Ortalama	Standart			
		Sapma	Minimum	Maksimum	
CEP3	sayma	1.54	1.89	0	7
	tarama	0.63	0.84	0	3
CEP7	sayma	0.5	0.74	0	2
	tarama	0.36	0.65	0	2
CEP17	sayma	0.63	0.84	0	3
	tarama	0.54	0.67	0	2
9p21	sayma	0.54	1.05	0	4
	tarama	0.04	0.21	0	1
<b>Ürotelyal neoplazi</b>					
CEP3	sayma	16.66	21.86	0	68
	tarama	7.22	5.83	0	20
CEP7	sayma	15.61	23.63	0	77
	tarama	7.38	6.23	0	20
CEP17	sayma	14.55	22.26	0	69
	tarama	6.83	6.08	0	20
9p21	sayma	14.11	25.45	0	73
	tarama	4.11	7.19	0	19

Tarama ve sayma yöntemlerinde elde edilen FISH verileri, her bir kromozom için ayrı ayrı ROC analizi ile incelendi ve ideal kesim noktaları belirlendi (Şekil 4.3). Her iki yöntem için ideal kesim noktalarında elde edilen duyarlılık ve seçicilikler Tablo 4.6'da görülmektedir. Seçicilikler arasında belirgin bir fark yok iken, CEP3, CEP7, CEP17 poliploidilerinin-aralarında belirgin fark olmaksızın- 9p21 LSI kaybına göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu dikkati çekti.



Şekil 4.4. Her bir kromozom için elde edilen ROC eğrileri.

**Tablo 4.6** ROC analizi yöntemi ile elde edilen kesim noktalarına göre hesaplanan duyarlılık ve seçicilik değerlerinin incelenen kromozomlara göre dökümü.

		<b>ROC Analizi Yöntemi</b>		
		<b>Kesim Noktaları</b>	<b>Duyarlılık (%)</b>	<b>Seçicilik (%)</b>
<b>CEP3</b>	<b>sayma</b>	4	72.2	86.3
	<b>tarama</b>	4	72.2	100
<b>CEP7</b>	<b>sayma</b>	3	66.6	100
	<b>tarama</b>	3	72.2	100
<b>CEP17</b>	<b>sayma</b>	3	72.2	95.4
	<b>tarama</b>	2	83.3	90.9
<b>9p21</b>	<b>sayma</b>	6	27.8	100
	<b>tarama</b>	1	33.3	95.4

CEP3, CEP7 ve 9p21 lokus spesifik prob için, tarama yöntemi ile elde edilen eğri altında kalan alanlar, sayma yönteminde elde edilenlerden daha yüksek olup, tarama yöntemi daha etkin görünmekte idi. Bununla birlikte bu iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırası ile  $p=0,382$ ,  $p=0,688$ ,  $p=0,293$ ).

Ürotelyal neoplazi saptanan (malign) ve nonneoplastik süreç tanısı alan (benign) olgularda, CEP3, CEP7, CEP17 poliploidisi ve 9p21 lokusunda homozigot kayıp gösteren toplam hücre sayıları Tablo 4.7 de görülmektedir. ROC analizinin gösterdiği ideal kesim noktalarının üzerinde ve altında kalan değerler farklı renkler ile işaretlenmiştir.

**Tablo 4.7** Benign (kontrol) ve malign (hasta) hasta gruplarında, her örnekte saptanan anöplöidi gösteren hücre sayısı ve ROC analizine göre her kromozom için ayrı olarak belirlenen kesim noktalarına göre duyarlılık ve seçicilik değerleri. Benign grupta kesim noktasını aşan değerler kırmızı, malign grupta kesim noktasını aşan değerler yeşil renkle işaretlenmiştir.

	Kesim Noktası (ROC analizine Göre)	Sayma Yöntemi				Tarama Yöntemi			
		CEP3	CEP7	CEP17	9p21	CEP3	CEP7	CEP17	9p21
		4	3	3	13	4	3	2	6
Kontrol Grubu	K1	7	1	3	1	0	1	1	0
	K2	4	2	0	2	2	2	0	0
	K3	3	0	2	0	0	0	1	0
	K4	4	1	1	0	3	2	2	0
	K5	2	0	0	0	1	0	0	0
	K6	1	2	1	0	0	0	0	0
	K7	3	1	2	0	2	0	0	0
	K8	0	0	1	0	0	0	0	0
	K9	1	0	1	0	0	0	0	0
	K10	0	0	0	0	0	0	0	0
	K11	0	2	0	0	0	0	1	0
	K12	1	0	0	0	0	0	0	0
	K13	0	0	1	0	1	0	1	0
	K14	0	0	0	1	0	0	0	0
	K15	0	0	0	2	0	0	0	1
	K16	0	0	1	0	1	0	0	0
	K17	0	0	0	4	0	0	0	0
	K18	2	1	0	2	1	1	1	0
	K19	3	0	0	0	0	0	1	0
	K20	0	0	0	0	1	1	1	0
	K21	3	1	1	0	1	0	2	0
	K22	0	0	0	0	1	1	1	0
Hasta grubu	H1	19	12	9	73	6	5	5	19
	H2	4	3	4	0	6	7	6	0
	H3	64	77	65	40	16	18	15	6
	H4	15	12	10	0	11	12	14	1
	H5	55	46	51	51	15	17	17	13
	H6	7	1	3	68	1	3	2	16
	H7	8	3	2	0	4	1	2	0
	H8	1	1	0	21	1	1	0	19
	H9	11	7	5	0	13	12	10	0
	H10	11	11	9	0	5	5	4	0
	H11	12	12	10	0	7	7	7	0
	H12	68	70	69	0	20	20	20	0
	H13	3	2	1	1	9	9	6	0
	H14	4	4	5	0	4	4	4	0
	H15	1	1	0	0	1	1	0	0
	H16	16	17	14	0	9	9	8	0
	H17	0	2	4	0	0	2	3	0
	H18	1	0	1	0	2	0	0	0
	Prob Duyarlılığı (%)	72.22	66.67	72.22	27.78	72.22	72.22	83.33	27.78
	Prob Seçiciliği (%)	86.33	100	95.45	100	100	100	90.91	100

Her bir kromozom için ayrı ayrı kesim noktası, duyarlılık ve seçiciliğin saptanmasından sonra, idrar sitolojisi tanısında birden fazla kromozom sinyalinin beraber kullanılmasının duyarlılık ve seçiciliğe katkısı araştırıldı. Bunun için, yine ROC analizi ile, kromozom 3, kromozom 7 ve kromozom 17'den en az birinde (Kriter 1), en az ikisinde (Kriter 2) ve üçünde birden (Kriter 3) poliploidi gösteren hücre varlığının benign ve malign gruba ayırmadaki etkinliği belirlendi (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8** Tanıda etkinliği araştırılan malignite kriterleri.

Kriter 1	Herhangi bir CEP sinyalinden yalnızca birinde artım gösteren hücreler
Kriter 2	Herhangi iki CEP sinyalinde artım gösteren hücreler
Kriter 3	Her üç CEP sinyalinde de artım gösteren hücreler
Kriter 4	9p21 LSI sinyalinde homozigot kayıp gösteren hücreler

Örneklerin Tablo 4.8 deki gruplara göre içerdiği anormal hücre sayıları belirlendi, bu sayıların ürotelyal neoplazileri saptamadaki duyarlılık ve seçicilikleri, ideal kesim noktaları saptandı (Tablo 4.9). Tek başına 9p21 LSI sinyalindeki homozigot kayıp ile oldukça düşük bir duyarlılık elde edildiği, ancak bu kriter kullanılarak, diğer üç kriter ile tanısı konamayan vakalardan ikisine tanı konulabildiği gözlemlendi. Bunun üzerine, 4. Kriter, ilk üç kritere ayrı ayrı eklenerek, duyarlılık ve seçicilikler tekrar hesaplandı (Tablo 4.10).

**Tablo 4.9.** Benign (kontrol) ve malign (hasta) hasta gruplarında, her örnekte izlenen Tablo 4.8 deki kriterlere göre tanımlanmış anormal hücre sayıları, ROC analizine göre her bir kriter için belirlenen kesim noktalarına ve buna göre duyarlılık ve seçicilik değerleri. Yalancı pozitiflik turuncu, gerçek pozitiflik yeşil renkle, sadece 4. Kriter ile tanı konulabilen malign örnekler mavi ile işaretlenmiştir.

	Kesim Noktası (ROC analizine göre)	Sayma Yöntemi				Tarama Yöntemi			
		K1	K2	K3	K4	K1	K2	K3	K4
		4	3	2	13	3	2	2	6
Kontrol Grubu	K1	9	2	0	1	2	0	0	0
	K2	7	0	0	2	5	1	0	0
	K3	4	1	0	0	1	0	0	0
	K4	6	0	0	0	3	3	1	0
	K5	2	0	0	0	1	0	0	0
	K6	3	1	0	0	0	0	0	0
	K7	3	2	1	0	2	0	0	0
	K8	1	0	0	0	0	0	0	0
	K9	2	0	0	0	0	0	0	0
	K10	0	0	0	0	0	0	0	0
	K11	2	0	0	0	1	0	0	0
	K12	1	1	0	0	0	0	0	0
	K13	2	0	0	0	2	0	0	0
	K14	0	0	0	0	0	0	0	0
	K15	0	0	0	3	0	0	0	1
	K16	1	0	0	0	0	0	0	0
	K17	0	0	0	3	0	0	0	0
	K18	3	0	0	2	1	1	1	0
	K19	3	0	0	0	1	0	0	0
	K20	0	0	0	0	1	1	1	0
	K21	3	1	1	0	2	1	0	0
	K22	1	0	0	1	1	1	1	0
Hasta Grubu	H1	22	10	7	72	6	5	5	19
	H2	11	0	0	0	8	6	5	0
	H3	84	69	54	40	18	16	15	6
	H4	20	12	5	0	14	13	10	1
	H5	59	53	36	49	19	18	13	13
	H6	9	0	0	69	3	2	1	16
	H7	10	3	0	0	5	1	1	0
	H8	0	0	0	22	1	1	0	19
	H9	13	7	3	0	13	13	9	0
	H10	11	11	9	0	5	5	4	0
	H11	13	13	8	0	8	8	5	0
	H12	70	69	68	0	20	20	20	0
	H13	4	3	1	1	9	9	6	0
	H14	6	5	2	0	5	5	2	0
	H15	2	0	0	0	2	0	0	0
	H16	19	17	11	0	10	9	7	0
	H17	5	1	0	0	3	1	0	0
	H18	2	0	0	0	2	0	0	0
	Duyarlılık(%)	83.33	66.67	55.56	27.78	77.78	72.22	66.67	27.78
	Seçicilik(%)	81.81	100	100	100	90.91	95.45	100	100

**Tablo 4.10.** FISH malignite kriterlerinin ROC analizi ile hesaplanan kesim noktalarına göre duyarlılık ve seçicilikleri. UroVysion tanı kriterine karşılık gelen kriter mavi renk ile işaretli.

	Duyarlılık (%)		Seçicilik (%)	
	Sayma	Tarama	Sayma	Tarama
<b>Kriter 1</b>	83.33	77.78	81.81	90.91
<b>Kriter 1 +4</b>	88.89	83.33	81.82	90.91
<b>Kriter 2</b>	66.67	72.22	100	95.45
<b>Kriter 2+4</b>	77.78	77.78	100	95.45
<b>Kriter 3</b>	55.56	66.67	100	100
<b>Kriter 3+4</b>	66.67	77.78	100	100
<b>Kriter 4</b>	27.78	27.78	100	100

İki kromozomda (CEP3, CEP7 veya CEP17) poliploidi diğer bir söyleyişle kriter 2 için kesim noktası sayma yönteminde 3, tarama yönteminde 2 hücre ve bu değerlere göre duyarlılık %66.6 ve %72.2, seçicilik %100 ve %95.45 olarak bulundu. Üç kromozomda birden poliploidi (Kriter 3) için kesim noktası 2, duyarlılık %55.56, seçicilik %100 olarak hesaplandı. 9p21 LSI sinyalinde homozigot kayıp, kombine poliploidi ile birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık oranlarının yükseldiği ve her iki kombinasyonda da (kriter 2+4 ve kriter 3+4) benzer olduğu görüldü.

Firma önerisinde olduğu gibi kriter 2+4 kullanıldığında tarama ve sayma yöntemlerinin her ikisinde de yüksek duyarlılık ve seçiciliğe ulaşıldığı görüldü. Önerilen orijinal kesim noktası, poliploidi gösteren hücreler için 4, 9p21 kaybı gösteren hücreler için 12 iken, bu çalışma grubunda sayma yönteminde 3 ve 13, tarama yönteminde 2 ve 6 olarak bulundu. Gerek bu çalışmada ortaya çıkan FISH tanı kriterlerine, gerekse orijinal UroVysion kriterlerine göre duyarlılık ve seçiciliğin benzer olduğu gözlemlendi: Duyarlılık %77.7, seçicilik %95.45-100. Sayma ve tarama yöntemlerine ait ROC eğrileri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı, kesim noktaları değişmekle birlikte eşdeğer etkinliğe sahip oldukları görüldü.

Mesane ürotelyal neoplazmı ile izlemde olan 11 hastadan rutin kontrol sistoskopi sırasında alınan idrar örneklerine çok renkli çok problu FISH testi uygulandı. Bu hastaların 2'si PUNLMP, 3'ü düşük dereceli ürotelyal karsinom ve 6'sı yüksek dereceli ürotelyal karsinom ile izlemde idi. Bir düşük dereceli, bir yüksek

dereceli karsinom olgusu, eş zamanlı yapılmış olan idrar sitolojisi ve FISH testinden sonra, sırası ile 6 ay ve 4 ay sonra rekürrens gösterdi. İlk olguda her iki inceleme yöntemi de negatif sonuç vermiş iken, ikinci olguda sitolojik tanı atipik, FISH sonucu ise negatif idi. Sitoskopik ve histopatolojik olarak karsinom rekürrensi 15 aylık izlem sonucunda gösterilememiş olan bir yüksek dereceli ürotelyal karsinom olgusunda, sistoskopi sırasında alınan idrar örneğine malign tanısı verildi, ancak aynı örneğin FISH sonucu negatif idi. Bu olgunun sitolojik preparatlarında çok az sayıda, yüksek dereceli karsinom morfolojisinde ürotelyal hücre mevcuttu ve olgu klinik veriler eşliğinde in situ karsinom olarak kabul edildi. FISH sonucunun hücre sayısındaki azlık nedeniyle negatif olabileceği düşünüldü. FISH ile elde edilen verilerin bu grupta rekürrens ön görmede bir değeri olmadığı görüldü.

## TARTIŞMA

İdrar sitolojisi, üroloji kliniğine hematüri şikayeti ile başvuran hastaların ayırıcı tanısında, mesane kanseri hikayesi bulunan hastaların takibinde ve sistoskopinin tanı koymada yetersiz kaldığı “flat” karsinoma in situ vakalarının ve üst üriner sistem ürotelial malignitelerinin ortaya çıkarılmasında hızlı, ucuz ve hastaya minimal rahatsızlık veren bir tanı yönemi olarak, değerli bir tanı aracıdır. Yüksek dereceli ürotelial malignitelerin tanısında yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olan idrar sitolojisi, düşük dereceli malignitelerin tanısında ne yazık ki yeterli duyarlılığa ve seçiciliğe ulaşmamaktadır.<sup>1,13,20,21,23,25,26</sup>

Mesane yıkama yöntemi ile, konvansiyonel idrara göre, daha bol miktarda ve morfolojik olarak daha az dejenerasyon bulguları gösteren hücreler elde edilmektedir. Bunun yanı sıra, mesanede sistoskopi ile şüpheli lezyon görülmediği, ancak malignite şüphesinin devam ettiği durumlarda, mesane yıkaması ile hızlı ve güvenilir örnekleme sağlanmaktadır. Üst üriner sistem neoplazilerinin saptanmasında da yıkama sıvılarının önemli bir yeri vardır.

İdrar örneklerinde FISH tekniğinin kullanılması üzerine yapılan araştırmalarda, bu yöntemin konvansiyonel sitolojik incelemeye göre daha yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip olduğu görülmektedir.<sup>54,56,58,61</sup> UroVysion yönteminin ilk sunumundan bu güne kadar yayınlanmış olan ve yöntemin geçerliliğini araştıran çalışmalar Tablo 2.8'de özetlenmiştir (Bakınız sayfa 21).<sup>6,45-55</sup> Bu yayınlara göre UroVysion yönteminin duyarlılığı ortalama %76.32 (%100-39.1, median %78) ve seçiciliği ortalama %84.56'dır (%100-65, median %88). Aynı yayınlarda, idrar sitolojisinin duyarlılığı ortalama %42.36 (%74-24.1, median %38), seçiciliği ise %85.52 (%100-50, median %90) olarak bildirilmektedir.

Çalışmamızda çok renkli çok problu FISH (Urovysion) testinin duyarlılığı %77.7, seçiciliği %100 olarak bulunmuştur. İdrar sitolojisi ile karşılaştırıldığında, FISH yönteminin duyarlılık ve seçiciliğinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu

görülmüştür ( $p<0.05$ ). İdrar sitolojisinin duyarlılığı, “atipik” tanısı verilen olgular negatif kabul edilerek hesaplandığında %38.8, pozitif kabul edilerek hesaplandığında %66.6 bulunmuş, seçicilik ise sırasıyla %100 ve %81.8 olarak saptanmıştır.

Araştırmaya dahil edilen 7 düşük dereceli karsinom olgusunun sadece birine (%14.2) sitolojik olarak malign tanısı konabilmiş, 2 PUNLMP olgusu da benign tanı almıştır. Buna karşın, pozitif kontrol grubundaki 9 adet yüksek dereceli ürotelial karsinom olgusunun 6'sına (%66.6) idrar sitolojisi ile malign tanısı verilmiştir. Yüksek dereceli karsinomların tümünde çok renkli çok problu FISH- Urovysion testi ile pozitif sonuç alınırken, düşük dereceli karsinom saptanan 7 olgudan 5'inde (%71.4) test sonucunun pozitif olduğu görülmüştür. PUNLMP tanısı alan 2 olguda FISH sonucu negatiftir. Düşük dereceli neoplazilerde daha belirgin olmak üzere, her iki grupta da FISH testinin sitolojiye göre daha çok olguda pozitif sonuç verdiği görülmüştür.

İdrar örneklerinde sitoloji ve FISH yöntemlerinin karşılaştırıldığı daha önceki çalışmalarda da idrar sitolojisinin özellikle düşük dereceli ürotelial neoplazilerde benzer şekilde FISH yöntemine göre daha düşük duyarlılığa sahip olduğu tarif edilmektedir (Tablo 5.1) . Laudadio ve ark.nın serisinde, ürotelyal neoplaziler sınıflanırken çalışmamızda olduğu gibi WHO 2004 kriterleri kullanılmış ve UroVysion testinin duyarlılığı, düşük dereceli ürotelyal karsinomlarda %56, yüksek dereceli ürotelyal karsinomlarda %95 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda bu oranlar sırası ile %71 ve %100'dür; çok renkli çok problu FISH testinden yüksek verim elde edilmiştir. Bu sonucun daha güvenilir olabilmesi için, testin etkinliğinin özellikle ürotelyal karsinom ile izlemde olan hastaları da kapsayan daha geniş serilerde araştırılması gerekmektedir.

**Tablo 5.1.** UroVysion yöntemi ve idrar sitolojisinin karşılaştırıldığı yayınlarda ürotelial neoplazinin derecesine göre duyarlılıklar.

Referans	1. Derece		2. Derece		3. Derece			
	UroVysion	Sitoloji	UroVysion	Sitoloji	UroVysion	Sitoloji		
Halling ve ark. <sup>6</sup>	36	27	76	54	97	71		
Bubendorf ve ark. <sup>48</sup>	71	14	86	41	94	76		
Sarosdy ve ark. <sup>47</sup>	55	18	78	44	94	41		
Sarosdy ve ark. <sup>51</sup>	48	24	70	30	88	53		
Junker ve ark. <sup>52</sup>	37	14	65	40	92	50		
Moonen ve ark. <sup>53</sup>	22	22	37	26	67	83		
Laudadio ve ark. <sup>49*</sup>	UroVysion		Sitoloji		UroVysion		Sitoloji	
	56		32		95		41	

\*Laudadio ve arkadaşlarının makalesinde ürotelial neoplazilerin derecelendirilmesinde WHO 2004 kriterleri, diğerlerinde WHO 1978 kriterleri kullanılmıştır.

Sitolojik incelemenin düşük dereceli ürotelial neoplazilerin tanısında karşılaştığı sorunların başında, neoplastik hücrelerinin çoğu zaman morfolojik olarak normal ürotelial hücrelere benzer olması, minimal atipi göstermeleri ve düşük dereceli ürotelyal neoplazi hücrelerini, benign hücrelerden ayırmada güvenilir morfolojik kriterlerin bulunmaması gelmektedir. Reaktif ve inflamatuvar süreçler de benign ürotelial hücrelerin, malign epitelial hücrelerden ayırılmasını zorlaştıran morfolojik değişikliklere sebep olmaktadır. Mesanedeki neoplastik gelişime yoğun inflamatuvar reaksiyonun eşlik ettiği durumlarda, gerek spontan idrar gerekse yıkama sıvısında, bol miktarda görülen inflamatuvar hücreler arasından neoplastik hücreleri bulup seçmek kimi zaman mümkün olmamaktadır.

Çok problu çok renkli FISH-UroVysion yönteminin duyarlılığı, özellikle düşük dereceli ürotelial neoplazilerde idrar sitolojisine göre belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Yine de, UroVysion yöntemi ile yalancı negatif tanı alan dört ürotelyal neoplazi olgusundan ikisinin PUNLMP, ikisinin de düşük dereceli karsinom olması, bu yöntemin de düşük dereceli ürotelial neoplazilerin tanısında sınırlamaları olduğunu göstermektedir. Düşük dereceli neoplazilerde kromozom anomalilerine daha az rastlanması negatif sonucun en önemli nedenidir.<sup>6,53</sup> Buna ek olarak, mesane yıkama sıvılarında yoğun hücre kümelerinin sıkışık halde, üst üste binmiş olarak

preparata dökülmelerinin de FISH yöntemi ile değerlendirmeyi güçleştiren ve yalancı negatif sonuçlara yol açabilecek bir faktör olduğu düşünülmüştür.

Spontan idrarda, düşük dereceli ürotelyal neoplaziler için bir tanı kriteri olan papiller grupların varlığı, mesane yıkama sıvılarında normalde de görülen bir bulgudur. Çalışmamızda bu grupların sıklıkla kolumnar bir morfoloji sergilediği dikkati çekmiştir. Büyük grupların varlığına, reaktif atipi de eklendiğinde, özellikle mesane yıkama sıvılarında düşük dereceli neoplazilerin ekarte edilmesi güçleşmektedir. Bu seride atipik sitoloji oranının yüksek bulunması (%22.5), yıkama sıvılarında çalışılmış olmasına, bu örneklerde kateterizasyon nedeniyle ortaya çıkan, düşük dereceli neoplazileri taklit eden grupların sık görülmesine ve bu bulgunun yorum güçlüğü yaratmasına bağlı olabilir. Yıkama sıvılarını değerlendirmede deneyimimiz attıkça atipik sitoloji oranının azalacağı düşünülmektedir. Sitolojide atipik olarak değerlendirilen 9 olgudan 7si FISH ile doğru olarak sınıflanmış, yalnızca 2 düşük dereceli karsinom olgusunda FISH ile yalancı negatif sonuç alınmıştır.

Çok renkli çok problu FISH testinin, idrar sitolojisinden daha yüksek bir seçiciliğe sahip olması önemli bir üstünlüğüdür. Çalışmamızda bu yöntemin seçiciliği %100 bulunmuş, hiçbir olgu yalancı pozitif tanı almamıştır. Mesane yıkama sıvılarında güvenilirliği görülen bu testin, özellikle klinik ve patolojik açıdan tanısı önemli güçlükler gösteren üst üriner sistem karsinomlarının saptanmasında çok etkili olabileceği düşünülmektedir. İdrar sitolojisi yeterince duyarlı olmamak yanısıra, kateterizasyon nedeniyle ortaya çıkan atipik sitolojik bulgular sonucunda, özellikle yıkama sıvılarında yeterince seçici de olamamaktadır. Doku örneklemesinden çok yıkama sıvıları ile saptanabilecek olan üst üriner sistem karsinomlarının tanısında, yüksek seçicilik değerine sahip olan çok renkli çok problu FISH analizinden güvenle yararlanılabilir.

Araştırmamızda sayma ve tarama yöntemlerinden elde edilen verilere göre CEP3, CEP7, CEP17 ve 9p21 LSI problemlerinin duyarlılık ve seçiciliklerinin, Sokolova ve arkadaşlarının elde ettiği değerler ile <sup>6,45-55</sup> oldukça benzer olduğu görülmüştür (Tablo 5.2).

**Tablo 5.2** Araştırmamızda uygulanan sayma ve tarama yöntemlerin duyarlılığının Sokolova ve arkadaşlarının<sup>45</sup> elde ettiği orijinal değerler ile karşılaştırılması.

	Duyarlılık %		
	Sokolova ve ark.	Bu çalışma	
		Sayma Yöntemi	Tarama Yöntemi
<b>CEP3</b>	14/19 (73.7)	13/18 (72.22)	13/18 (72.22)
<b>CEP7</b>	16/21 (76.2)	12/18 (66.67)	13/18 (72.22)
<b>CEP17</b>	13/21 (61.9)	13/18 (72.22)	15/18 (83.33)
<b>9p21</b>	6/21 (28.6)	5/18 (27.78)	5/18 (27.78)

UroVysion yönteminde kullanılan problemlerin duyarlılık ve güvenilirlikleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde, 3, 7, ve 17. kromozom CEP problemlerinin tanısal değerlerinin birbirine yakın olduğu ve bu problemler kullanılarak tanı konulan vakaların birbiri ile büyük oranda örtüştüğü gözlenmiştir. Bu problemlerin duyarlılık ve seçiciliklerinde büyük bir fark olmamakla birlikte, bu çalışmada tek başına kullanıldığında CEP17'nin en yüksek duyarlılık ve seçiciliğe (%72,22 %95,45) sahip olduğu görülmüştür. Çok problemler bir kit kullanılmadığı durumlarda, CEP3, CEP7 ve CEP17 tek başlarına da mesane karsinomunu tanısında güvenilir bir ek test olarak kullanılabilir. Bu 3 problem, Sokolova ve arkadaşlarının çalışmasında karşılaştırılan 10 adet problem arasında en yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahip olduklarından, ve birbirlerinden farklı vakaları saptayarak, beraber kullanıldıklarında FISH ile tanı yönteminin duyarlılık ve seçiciliğini yükseltmelerinden ötürü UroVysion testine dahil edilmişlerdir<sup>45</sup>.

9p21 LSI probleminin duyarlılık ve seçiciliği, daha önceki yayınlara da uygun olarak, CEP problemlerinden oldukça düşük bulunmuştur. Ancak bu problemin asıl değeri, CEP problemleri ile tanı konamayan bazı vakaların bu problem ile tanınabiliyor olmasından gelmektedir. Önceki yayınlarda, 9p21 homozigot delesyonunun diğer 3 kromozomda artıma göre neoplastik sürecin daha erken evrelerinde görüldüğü ve özellikle düşük dereceli ürotelial neoplazilerde tanısal değere sahip olduğu bildirilmektedir.<sup>6,49,50</sup> Çalışmamızda 9p21 lokusunda homozigot delesyon izlenen 5 ürotelial karsinom vakasının 2'sinin yüksek dereceli, 3'ünün ise düşük dereceli olduğu görülmüştür.

Phillips ve arkadaşları, yüksek dereceli tümörlerde görülen poliploidizasyonun ve dolayısı ile 9. kromozomdaki sayıca artışın, ileri dereceli ürotelial karsinomlarda 9p21 heterozigot delesyonlarının maskelenmesinde etkili olabileceğini öne sürmektedir.<sup>44</sup>

FISH uygulanan preparatların değerlendirilmesinde kullandığımız tarama ve sayma yöntemleri karşılaştırıldığında, problemlerin ayrı ayrı değerlendirilmesinde, tarama yönteminin duyarlılık ve seçiciliğinin sayma yöntemine göre daha yüksek olduğu görülmüş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sayma yönteminde preparatın tamamının incelenmiyor olmasının, bu yöntemin duyarlılığının düşük bulunmasında ana etken olduğu; tarama yönteminde ise preparatın tamamının inceleniyor olmasının, bu yöntemin tanısal değerini arttırdığı düşünülmüştür. Tarama yönteminde bir vakanın analizi daha kısa sürede tamamlanabilmekte; ancak bu yöntemde, sadece morfolojik olarak atipik hücrelerin inceleniyor olması, benign morfolojik özelliklere sahip anormal hücrelerin saptanmasını güçleştirmektedir.

FISH analizi için çalışma sonunda ulaşılan ideal kesim noktaları, firma önerisinden daha düşük bulunmuş, ancak bu değerler ile elde edilen duyarlılık ve seçiciliğin, daha yüksek olan orijinal (UroVysion kiti tanı kriteri) kesim noktalarında elde edilen duyarlılık ve seçicilik ile eşdeğer olduğu görülmüştür. Bu nedenle, geniş bir seride kapsamlı bir araştırma sonucunda<sup>45</sup> saptanmış olan orijinal kesim noktalarının değiştirilmeden kullanılmasının uygun ve daha güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır.

FISH yönteminin mesane ürotelial neoplazilerinin tanısında ve takibinde kullanılmasının yanı sıra, bu yöntemin mesane tümörlerinin prognoz ve rekürrens olasılığının belirlenmesinde de değerli olabileceğini öngören çalışmalar mevcuttur.<sup>44,56,57,59,62</sup> Zellweger ve arkadaşlarının, 138 hastanın mesane yıkama sıvıları üzerinde yaptıkları rekürrens araştırmasında, FISH pozitif hastaların %39'unda, FISH negatif hastaların ise %21'inde rekürrens bildirilmiştir.<sup>56</sup> Yoder ve arkadaşlarının 2007 yılında mesane tümörü takibindeki 211 hasta üzerinde yaptıkları araştırmada, FISH pozitif 81 hastanın %74'ünde, FISH negatif 169 hastanın ise

%13'ünde rekürrens tariflenmiş, sistoskopide mesane tümörü rekürrensi şüphesi bulunmayan hastaların %27'sinde FISH ile pozitif sonuç elde edildiği bildirilmiştir. FISH yöntemi ile idrar örneklerinde pozitiflik saptanan bu hasta grubunun %65'inde 29 ay içerisinde rekürrens geliştiği izlenmiştir.<sup>57</sup>

Bizim çalışmamızda, yalnızca 11 izlem hastası değerlendirilebilmiştir ve bu grupta FISH testi pozitif bir hasta olmamasına karşın, iki hastada rekürrens saptanmış, rekürrens öngörmede FISH sonuçlarından yarar sağlanamamıştır. Ancak, eldeki veriler, FISH yönteminin progresyon veya rekürrens ile ilişkisini belirlemek için yeterli değildir.

Maliyeti, gerektirdiği laboratuvar altyapısı ve hazırlık işlemlerinin göreceli olarak uzun ve zahmetli olması, ürotelial karsinomların tanısında yüksek duyarlılık ve seçicilik sağlayan FISH yönteminin rutin tarama testi olarak kullanılmasını güçleştiren dezavantajlarıdır.

Sonuç olarak, çok problu çok renkli FISH yöntemi, ürotelial karsinomların tanısı ve izleminde idrar sitolojisinden daha üstün, yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip, güvenilir bir tanı yöntemidir. Özellikle tanı güçlüğü yaratan olgularda etkin olarak kullanılabilir.

## SONUÇLAR

1. Ürotelyal karsinomların tanısında, çok renkli çok problu FISH testinin duyarlılık ve seçiciliğinin idrar sitolojisine göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur.
2. Her iki yöntemin de yüksek dereceli karsinomların tanısında daha etkin olduğu görülmüş, FISH tekniğinin özellikle düşük dereceli ürotelyal karsinomların saptanmasında idrar sitolojisine kıyasla daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu gözlenmiştir.
3. Mesane karsinomlarının tanısı ve takibinde FISH-UroVysion için elde edilen seçicilik ve duyarlılık değerlerinin, hem tek tek prob bazında, hem de prob kombinasyonları bazında bu yöntem üzerine yapılmış önceki araştırmalarla benzer olduğu görülmüştür.
4. UroVysion FISH testinde kullanılan proplar ayrı ayrı değerlendirildiğinde, CEP propları arasında duyarlılık ve seçicilik açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu da, çok problu bir kit kullanılmadığı durumlarda, CEP3, CEP7 ve CEP17 proplarının tek başlarına da mesane karsinomunun tanısında kullanılabileceğini düşündürmektedir.
5. 9p21 LSI probunun seçiciliğinin oldukça düşük bulunmasına karşılık, bu prob ile diğer CEP propları ile tanı konulamayan vakalara tanı konulabildiği ve bu probun CEP propları ile beraber kullanımının FISH yönteminin duyarlılığını anlamlı şekilde arttırdığı izlenmiştir.
6. FISH ile elde edilen verileri değerlendirmede denenen kombine anomali kriterlerini karşılaştırıldığında, hesaplanan kesim noktalarına uyulduğu takdirde, her üç “CEP poliploidisi-9p21 kaybı” kombinasyonunun eşit

güvenilirlikte olduğu görülmüştür. Ulaşılan ideal kesim noktaları, firma önerisinden daha düşük bulunmuş, ancak bu değerler ile elde edilen duyarlılık ve seçiciliğin, daha yüksek olan orijinal (UroVysion kiti tanı kriteri) kesim noktalarında elde edilen duyarlılık ve seçicilik ile eşdeğer olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, geniş bir seride kapsamlı bir araştırma sonucunda saptanmış olan orijinal kesim noktalarının değiştirilmeden kullanılmasının uygun ve güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır.

7. FISH boyalı preparatların incelenmesinde karşılaştırılan sayma ve tarama yöntemleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak, tarama yönteminde hücrelerin nükleer morfolojilerinin de değerlendirmeye alınıyor ve preparatın tamamının inceleniyor olması, patolog ve sitologların bu yöneme daha fazla güven duyacağını düşündürmektedir.
8. Araştırmamızdan elde edilen veriler, FISH yönteminin mesane ürotelyal karsinomlarının progresyonu veya rekürrensi ile ilişkisini belirlemek için yeterli olmamıştır. Daha büyük bir hasta grubunun, daha uzun süre ile takip edilmesi gerekmektedir.
9. Bugüne dek daha çok spontan idrar örneklerinde denenmiş olan çok problu çok renkli FISH yönteminin, mesane yıkama sıvılarında da güvenilir olduğu görülmüştür. Özellikle klinik ve patolojik açıdan tanısı önemli güçlükler gösteren üst üriner sistem karsinomlarının saptanmasında bu yöntemin çok etkili olabileceği düşünülmektedir.
10. Maliyeti, gerektirdiği laboratuvar altyapısı ve hazırlık işlemlerinin göreceli olarak uzun ve zahmetli olması, mesane ürotelyal karsinomları için FISH yönteminin rutin tarama testi olarak kullanılmasını güçleştiren dezavantajlarıdır.
11. Sonuç olarak, çok problu çok renkli FISH yöntemi, ürotelial karsinomların tanısı ve izleminde idrar sitolojisinden daha üstün, yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip , güvenilir bir tanı yöntemidir.

## KAYNAKLAR

1. O'Donnell MA. Advances in the management of superficial bladder cancer. *Semin Oncol* 2007; 34:85-97
2. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 1983;130: 1083–1086
3. Sözen S, Eskiçorabçı S, Özen H. Urinary markers for urothelial cancer. *BJU International* 2003; 92: 531-533
4. Halling KC, King W, Sokolova IA. A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection urothelial carcinoma in urine. *J Urol* 2002; 167:2001-2006
5. Sanchez-Carbayo M. Recent advances in bladder cancer diagnostics. *J Clin Biochem* 2004; 37:562-571
6. Halling KC, King W, Sokolova IA. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridisation for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol* 2000;164:1768–75
7. World Cancer Report, World Health Organization International Agency for Research on Cancer. IARCPress, Lyon, 2003
8. Jemal A, Siegel R, Ward, E. Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43–66
9. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481–488

10. T.C. Sağlık Bakanlığı. Erkeklerde en çok görülen on kanser türü,1999.
11. Parkin DM, Bray F, Ferlay J ve Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55:74-108
12. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press, Lyon, 2004.
13. DeMay RM. The Art and Science of Cytopathology. American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1996.
14. Tadao K. Development and progression of urothelial carcinoma. Cancer Sci 2006; Vol. 97, No.9, pp 821-828
15. Brennan P, Bogillot O, Cordier S. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. Int J Cancer 2000; 86: 289-294
16. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Press: Lyon, 2004.
17. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. Cancer Pract 2002;10: 311-322
18. Greene LF, Page DL, Fleming D, Firtz A, Batch M, Haller DG, Morrow M (2002). American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual. 6th Edition. Springer-Verlag: New York.
19. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder.

- Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22:1435-1448
20. Oosterlinck W, Solsona E, Akaza H, Busch C, Goebell PJ, Malmström PU, Özen H, Sved P. Low-grade Ta(noninvasive) urothelial carcinoma of the bladder. *Urology* 2005; 66: 75-89
  21. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005; 66: 4-34
  22. Desai S, Lim SD, Jimenez RE, Chun T, Keane TE, McKenney JK, Zavala-Pompa A, Cohen C, Young RH, Amin MB. Relationship of cytokeratin 20 and CD44 protein expression with WHO/ISUP grade in pTa and pT1 papillary urothelial neoplasia. *Mod Pathol* 2000;13:1315-23.
  23. Herr HW, Donat SM, Reuter VE. Management of low grade papillary bladder tumors. *J Urol.* 2007;178:1201-1205.
  24. Jocham S, Witjes F, Wagner S. Improved detection and treatment of bladder cancer using hexaminolevulinate imaging: A prospective, phase III multicenter study. *J Urol* 2005; 174:862-866
  25. Murphy WM, Soloway MS, Jukkola AF. Urinary Cytology and Bladder Cancer: The Cellular Features of Transitional Cell Neoplasms. *Cancer* 1984; 53:1555-1565
  26. Rosenthal D, Raab SS. *Cytologic Detection of Urothelial Lesions, Essentials in Cytopathology*, Springer, China, 2006.
  27. Zein TA, Milad MF. Urine Cytology in Bladder Tumours. *Int Surg* 1991; 76:52-54

28. Brown FM. Urine Cytology: Is it still the gold standard for screening? *Urol Clin North Am* 2000; 27: 25-37
29. Garbar C, Mascaux C, Wespes E. Is urinary tract cytology still useful for diagnosis of bladder carcinomas? A large series of 592 bladder washings using a five-category classification of different cytological diagnoses. *Cytopathology* 2007; 18:79-83
30. Lotan Y, Roehrborn C. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: Results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 2003; 61: 109-118
31. Mayfield MP, Whelan P. Bladder tumors detected on screening: results at 7 years. *Br J Urol.* 1998; 82:825-828
32. Messing EM, Young TB, Hunt VB. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology* 1995; 45:387-396
33. Mohr DN, Offord KP, Owen RA. Asymptomatic microhematuria and urologic disease: a population-based study. *JAMA* 1986; 256:224-229
34. Golin AL, Howard RS. Asymptomatic microscopic hematuria. *J Urol.* 1980; 124:389-391
35. Heng HH, Spyropoulos B, Moens PB. FISH technology in chromosome and genome research. *Bioessays.* 1997; 19:75-84
36. Gall, J. G., Pardue, M. L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1969; 63: 378-383

37. Luke S, Shepelsky M. FISH: recent advances and diagnostic aspects. *Cell Vis.* 1998; 5:49-53
38. Chang SS, Mark HF. Emerging molecular cytogenetic technologies. *Cytobios.* 1997; 90:7-22
39. Sandberg AA, Berger CS. Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol* 1994; 151:545-560
40. Knowles MA. Molecular genetics of bladder cancer. *Br J Urol* 1995; 75 suppl 1:57-66
41. Sidransky D, Messing E. Molecular genetics and biochemical mechanisms in bladder cancer. Oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. *Urol Clin N Am* 1992; 19:629-639
42. Cairns P, Shaw ME, Knowles MA. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumor-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene* 1993; 8:1083-1085
43. Özen H. Bladder cancer. *Curr Opin Oncol.* 1998; 10:273-278
44. Phillips JL, Richardson IC. Aneuploidy in bladder cancers: the utility of fluorescent in situ hybridization in clinical practice. *BJU Int.* 2006; 98:33-7
45. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, King W. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn.* 2000; 2:116-23.

46. Dalquen P, Kleiber B, Grilli B, Herzog M, Bubendorf L, Oberholzer M. DNA image cytometry and fluorescence in situ hybridization for noninvasive detection of urothelial tumors in voided urine. *Cancer*. 2002; 96:374-9
47. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, Kahn P, Chao R, Yore L, Zadra J, Burzon D, Osher G, Bridge JA, Anderson S, Johansson SL, Lieber M, Soloway M, Flom K. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol*. 2002; 168:1950-4
48. Bubendorf L, Grilli B. UroVysion multiprobe FISH in urinary cytology. *Methods Mol Med*. 2004; 97:117-31
49. Laudadio J, Keane TE, Reeves HM, Savage SJ, Hoda RS, Lage JM, Wolff DJ. Fluorescence in situ hybridization for detecting transitional cell carcinoma: implications for clinical practice. *BJU Int*. 2005; 96:1280-5
50. Daniely M, Rona R, Kaplan T, Olsfanger S, Elboim L, Zilberstien Y, Friberger A, Kidron D, Kaplan E, Lew S, Leibovitch I. Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization significantly increases accuracy of bladder cancer detection in voided urine samples. *Urology*. 2005 Dec;66(6):1354-9
51. Sarosdy MF, Kahn PR, Ziffer MD, Love WR, Barkin J, Abara EO, Jansz K, Bridge JA, Johansson SL, Persons DL, Gibson JS. Use of a multitarget fluorescence in situ hybridization assay to diagnose bladder cancer in patients with hematuria. *J Urol*. 2006; 176:44-7
52. Junker K, Fritsch T, Hartmann A, Schulze W, Schubert J. Multicolor fluorescence in situ hybridization (M-FISH) on cells from urine for the detection of bladder cancer. *Cytogenet Genome Res*. 2006; 114:279-83
53. Moonen PM, Merckx GF, Peelen P, Karthaus HF, Smeets DF, Witjes JA. UroVysion compared with cytology and quantitative cytology in the

- surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2007; 51:1275-80
54. Bergman J, Reznicek RC, Rajfer J. Surveillance of patients with bladder carcinoma using fluorescent in-situ hybridization on bladder washings. *BJU Int.* 2008; 101:26-29
55. Riesz P, Lotz G, Páska C, Szendrői A, Majoros A, Németh Z, Törzsök P, Szarvas T, Kovalszky I, Schaff Z, Romics I, Kiss A. Detection of Bladder Cancer from the Urine using Fluorescence in situ Hybridization Technique. *Pathol Oncol Res.* 2007; 13:187-94
56. Zellweger T, Benz G, Cathomas G, Mihatsch MJ, Sulser T, Gasser TC, Bubendorf L. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. *Int J Cancer.* 2006; 119:1660-5
57. Yoder BJ, Skacel M, Hedgepeth R, Babineau D, Ulchaker JC, Liou LS, Brainard JA, Biscotti CV, Jones JS, Tubbs RR. Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127:295-301
58. Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC, Dalquen P. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol.* 2001; 116:79-86
59. Bollmann M, Heller H, Bánkfalvi A, Griefingholt H, Bollmann R. Quantitative molecular urinary cytology by fluorescence in situ hybridization: a tool for tailoring surveillance of patients with superficial bladder cancer? *BJU Int.* 2005; 95:1219-25

60. Mezzelani A, Dagrada G, Alasio L, Sozzi G, Pilotti S. Detection of bladder cancer by multitarget multicolour FISH: comparative analysis on archival cytology and paraffin-embedded tissue. *Cytopathology*. 2002; 13:317-25
61. Degtyar P, Neulander E, Zirkin H, Yusim I, Douvdevani A, Mermershtain W, Kaneti J, Manor E. Fluorescence in situ hybridization performed on exfoliated urothelial cells in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2004; 63:398-401
62. Pycha A, Lodde M, Comploj E, Negri G, Egarter-Vigl E, Vittadello F, Lusuardi L, Palermo S, Mian C. Intermediate-risk urothelial carcinoma: an unresolved problem? *Urology*. 2004; 63:472-5

## EKLER

Ek 1. Tarama yöntemi için kullanılan form.

Hasta adı, soyadı	Dosya no	Tarih	3	7	17	9p21
1.						
2.						
3.						
4.						
5.						
6.						
7.						
8.						
9.						
10.						
11.						
12.						
13.						
14.						
15.						
16.						
17.						
18.						
19.						
20.						
21.						
22.						
23.						
24.						
25.						
26.						
27.						
28.						
29.						
30.						
31.						
32.						
33.						
34.						
35.						
36.						
37.						
38.						
39.						
40.						
41.						
42.						
43.						
44.						
45.						
46.						
47.						
48.						
49.						
50.						
51.						
52.						
53.						
54.						
55.						
56.						
57.						
58.						
59.						
60.						
61.						
62.						
63.						
64.						
65.						
66.						
67.						
68.						
69.						
70.						
71.						
72.						
73.						
74.						
75.						
76.						
77.						
78.						
79.						
80.						
81.						
82.						
83.						
84.						
85.						
86.						
87.						
88.						
89.						
90.						
91.						
92.						
93.						
94.						
95.						
96.						
97.						
98.						
99.						
100.						

Ek 2. Sayma yöntemi için kullanılan form.

Hasta adı, soyadı :  
Dosya no :  
Tarih :

	3	7	17	9p21
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				
13.				
14.				
15.				
16.				
17.				
18.				
19.				
20.				

**Ek 3. Araştırmaya dahil edilen hastalar. PUNLMP:Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelial neoplazi. Ca:Karsinom**

Denek	Yaş	Cinsiyet	Sistoskopi	Sitoloji	UroVysion	Patoloji	Klinik	Grup
K1	62	Erkek	Benign	Benign	Benign	Benign	Benign	Kontrol
K2	41	Erkek	Benign	Benign	Benign	Benign	Benign	Kontrol
K3	34	Kadın	Benign	Benign	Benign	Benign	Benign	Kontrol
K4	55	Erkek	Benign	Benign	Benign	Benign	Benign	Kontrol
K5	29	Kadın	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K6	44	Erkek	Benign	Atipik	Benign	Benign	Benign	Kontrol
K7	42	Erkek	Benign	Atipik	Benign	Benign	Benign	Kontrol
K8	47	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K9	46	Erkek	Benign	Atipik	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K10	34	Erkek	Benign	Atipik	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K11	52	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K12	32	Kadın	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K13	47	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K14	39	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K15	57	Kadın	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K16	56	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K17	59	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K18	44	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K19	47	Erkek	Benign	Atipik	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K20	27	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K21	55	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
K22	29	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	Benign	Kontrol
H1	47	Kadın	Malign	malign	Malign	İnvaziv, Yüksek Dereceli	ilk tanı	Neoplazi
H2	76	Erkek	Malign	atipik	Malign	İnvaziv, Yüksek Dereceli	ilk tanı	Neoplazi
H3	62	Erkek	Malign	malign	Malign	İnvaziv, Düşük Dereceli	ilk tanı	Neoplazi
H4	65	Erkek	Benign	malign	Malign	İnvaziv, Yüksek Dereceli	üreter tm, ilk tanı	Neoplazi
H5	53	Erkek	Malign	malign	Malign	İnvaziv, Yüksek Dereceli	rekürrens	Neoplazi
H6	66	Erkek	Malign	Benign	Malign	Noninvaziv, Düşük Dereceli	rekürrens	Neoplazi
H7	51	Erkek	Malign	atipik	Malign	Noninvaziv, Düşük Dereceli	rekürrens	Neoplazi
H8	64	Erkek	Malign	Benign	Malign	Noninvaziv, Düşük Dereceli	ilk tanı	Neoplazi
H9	78	Erkek	Malign	Benign	Malign	Noninvaziv, Yüksek Dereceli	rekürrens	Neoplazi
H10	74	Erkek	Malign	malign	Malign	Noninvaziv, Yüksek Dereceli	renal pelvis tm, ilk tanı	Neoplazi
H11	57	Erkek	Malign	atipik	Malign	Noninvaziv, Düşük Dereceli	ilk tanı	Neoplazi
H12	70	Erkek	Malign	malign	Malign	İnvaziv, Yüksek Dereceli	rekürrens	Neoplazi
H13	50	Erkek	Malign	malign	Malign	İnvaziv, Yüksek Dereceli	ilk tanı	Neoplazi
H14	58	Erkek	Malign	Benign	Malign	Noninvaziv, Düşük Dereceli	ilk tanı	Neoplazi
H15	71	Erkek	Malign	Atipik	Benign	Noninvaziv, Düşük Dereceli	ilk tanı	Neoplazi
H16	60	Erkek	Malign	Atipik	Malign	İnvaziv, Yüksek Dereceli	rekürrens	Neoplazi
H17	62	Erkek	Malign	Benign	Benign	PUNLMP	ilk tanı	Neoplazi
H18	45	Erkek	Benign	Benign	Benign	PUNLMP	rekürrens	Neoplazi
I1	75	Erkek	Benign	atipik	Benign	Benign	Mesane Ca şüphesi	İzlem
I2	71	Erkek	Benign	atipik,	Benign	Benign	Mesane Ca şüphesi	İzlem
I3	83	Erkek	Benign	Atipik,	Şüpheli	Yok	İzlemde mesane Ca	İzlem
I4	58	Erkek	Benign	Benign	Malign	Yok	İzlemde mesane Ca	İzlem
I5	56	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	İzlemde mesane Ca	İzlem
I6	52	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	İzlemde mesane Ca	İzlem
I7	63	Erkek	Benign	Benign	Benign	Yok	İzlemde mesane Ca	İzlem
I8	52	Erkek	Malign	malign	Benign	Benign	İzlemde mesane Ca	İzlem
I9	67	Erkek	Malign	atipik	Benign	Hiperplazi	İzlemde mesane Ca	İzlem
I10	49	Erkek	Malign	Benign	Benign	Hiperplazi	İzlemde mesane Ca	İzlem
I11	68	Erkek	Malign	Benign	Benign	Benign	İzlemde mesane Ca	İzlem
N1	58	Erkek	Yok	Benign	Non diagnostik	PUNLMP	İzlemde mesane Ca	Non diagnostik
N2	73	Erkek	Malign	Yüksek Dereceli	Non diagnostik	İnvaziv, Yüksek Dereceli	Mesane Ca şüphesi	Non diagnostik
N3	40	Erkek	Yok	Düşük Dereceli	Non diagnostik	Benign	Mesane Ca şüphesi	Non diagnostik