

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

88274

**MESANENİN DEĞİŞİCİ EPİTEL HÜCRELİ
KARSİNOMALARINDA NÜKLEER MORFOMETRİK
PARAMETRELERİN VE DNA İÇERİĞİNİN KLASİK
PROGNOSTİK FAKTÖRLER İLE KARŐILAŐTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

T 88274

Önder ÖNGÜRÜ
Tbp. Kd. Ütğm.

**T.C. YÖKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMENTASYON MERKEZİ**

Ankara - 1999

ÖNSÖZ

Bu tez konusu Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 1 Temmuz 1997 tarih ve 0530-319-97 sayılı emri ile verilmiş ve tez çalışmasına başlanmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı, mesanenin değişici epitel hücreli karsinomalarının DNA ploidi ve nükleer morfolojik özelliklerinin, görüntü analiziyle incelenmesi ve klasik prognostik faktörlerle ilişkisinin araştırılmasıdır.

Uzmanlık eğitimim sırasında, mesleğimi en iyi şekilde öğrenebilmemde engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Rıfki Finci'ye, her konuda desteğini her zaman yanımda hissettiğim, gerek bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde, gerekse eğitimimin her aşamasında değerli yardım ve katkılarını esirgemeyen Sn. Prof. Dr. Ömer Günhan'a, bu araştırmayı tez konusu olarak öneren ve çalışmanın her aşamasında büyük çaba sarfeden, bizlere daha iyi eğitim verebilmek için hiçbir özveriden kaçınmayan, yanında çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Sn. Doç. Dr. Bülent Celasun'a, ayrıca eğitimim ve çalışmam sırasında her bakımdan bana destek olan Doç. Dr. Murat Demiriz'e, Yrd. Doç. Dr. Cevat Can'a ve Yrd. Doç. Dr. Mükerrrem Safalı'ya en içten şükran ve minnet duygularımı sunarım.

Birlikte çalıştığım uzmanlara, uzmanlık öğrencisi arkadaşlarıma ve emeği geçen tüm Patoloji Anabilim Dalı personeline teşekkür ederim.

Önder ÖNGÜRÜ

Tbp. Kd. Ütgm.

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
A. EMBRİYOLOJİ VE HİSTOLOJİ	3
B. MESANE KANSERİ	5
1.İnsidans ve epidemiyoloji	5
2.Genel ve klinik özellikler	5
3.Etiyoloji ve risk faktörleri	8
4.Sınıflandırma	9
5.Tanı	10
6.Histolojik dereceleme	12
7.Tedavi	13
8.Prognostik faktörler	14
III. GEREÇ VE YÖNTEM	17
IV. BULGULAR	24
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
VI. ÖZET	55
VII. İNGİLİZCE ÖZET	56
VIII. KAYNAKLAR	57

GİRİŞ

Mesane tümörleri, tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen morbidite ve mortalite yönünden önemli bir problem oluşturmaya devam etmektedir. Mesane tümörlerinin %90 kadarını değişici epitel hücreli karsinomalar oluşturmaktadır (27,31).

Yüzeyel mesane kanserlerinin klinik davranışının belirlenmesi üroloji pratiğinde önemli bir sorundur. Transüretal rezeksiyona rağmen yüzeyel mesane kanserlerinin önemli bir kısmında nüks gelişmekte ve sonuçta olguların %15-20'si kasa invazyon gösteren yüksek dereceli kanserlere dönüşmektedir. Bu olguların erken dönemde tanınması daha uygun tedavilerin yapılmasını sağlayacaktır.

Tümör çapı, birden çok odak bulunması, nekroz, histolojik derece ve invazyon derecesi gibi konvansiyonel klinikopatolojik özellikler, nüks olasılığı hakkında prognostik bilgi vermektedir. Ancak, bu özelliklerin prognoz yönünden belirleyicilikleri sınırlıdır. Bu nedenle, nükse eğilimli primer mesane tümörleri için prognoza etkili başka faktörler araştırılmıştır. İmmünohistokimyasal yöntemlerle ABH kan grubu antijenleri, T-antijeni, karsinoembriyonik antijen , Ki-67, p57 antijenleri değerlendirilmiş, hücre zarındaki ultrastrüktürel değişiklikler incelenerek kromozom analizi ve DNA sitofotometri çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar, komplike yöntemler gerektirmesi ya da yinelenebilirliğin düşük olması gibi nedenlerle genellikle rutin pratikte yer almamaktadır.

Son yıllarda mesane karsinomalarının incelenmesinde nükleer morfolometri objektif ve pratik bir yöntem olarak görülmekte (4,6,7,21,35, 50,58)

ve özellikle büyük atipik hücrelerin ölçümünün prognostik önemi olduğundan sözedilmektedir (6). Görüntü analizi yöntemiyle tümörün DNA ploidi hızlı ve güvenilir bir şekilde gösterilebilmektedir. Mesane karsinomalarında DNA ploidisinin tümörün histolojik derecesi ve evresi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (4,35,61).

Bu tez çalışmasında, objektif ve yinelenebilir bir yöntem olan görüntü analizi kullanılarak, mesanenin değişici epitel hücreli karsinomalarının nükleer morfolometrik özellikleri ve DNA ploidi incelenmiş ve bunların klasik prognostik faktörler ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu nükleer morfolometrik özellikler ile nüks olasılığı arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

EMBRİYOLOJİ VE HİSTOLOJİ

Mesane gestasyonun 12nci haftasında ürogenital sinüsün rostral kısmından gelişir (47).

Mesane; çok katlı değişici epitel tabakasıyla örtülü, damardan zengin bir lamina propria ve bunun altında kalın kas demetlerinden oluşan bir organdır. Lamina propria, içinde az sayıda lenfosit bulunan ince duvarlı damarlardan zengin gevşek bağ dokusundan oluşmaktadır. Bu damarlardan bazıları epitele çok yakın olduğundan ülserasyon halinde kolaylıkla kanayabilmektedir. İnsanların %5'inden azında mesanenin lamina propriasında düzensiz ince kas lifleri halinde muskularis mukoza bulunabilir (47).

Mesane örtücü epitelinin yüzeyel hücrelerine, yassılaştırmış ve genişlemiş görünümeleri nedeni ile değişici (transizyonel) epitel adı verilmiştir (15). Ancak, "ürotelyum" da bu mukoza için kullanılan bir terimdir. İnsandaki normal mesane ürotelyumundaki tabaka sayısı, mesanenin distansiyon derecesine bağılı olarak 3 ile 7 arasında değişmektedir (47).

Ürotelyal hücreler yüzeyel ve onun altında intermediyer - bazal hücreler olmak üzere iki tiptir. Yüzeyel hücreler dışındaki diğer hücreler küçük ve uniform hücrelerdir. Amfofilik sitoplazmaları glikojenden zengin olduğundan yer yer berrak görünümündedirler. Bu hücreler arasında mesane distansiyonu sırasında hücrelerin birbiri üzerinde kaymasını ve yassılaşmasını sağlayan gevşek desmozomlar mevcuttur. Yüzeyel hücrelerde kan grubu antijenleri ve keratinler (molekül ağırlığı 40-70 dalton) bulunur

(51,62). Epidermal büyüme faktörü reseptörleri epitelin alt tabakalarındaki hücrelerin yüzeyinde bulunurlar (19,48). Kesitlerde, intermediate ve bazal hücreler, uzun eksenleri yüzeye dik oval nükleuslu hücreler olarak görülürler. Nükleusların ince granüler kromatini, düzgün nükleer sınırları ve formalin ile tespitli dokularda belirgin olmayan küçük nükleoller mevcuttur. Normal ürotelyumun "turnover" zamanı 1 yıl olduğundan, mitoz son derece nadirdir.

Ürotelyumun yüzeyel hücreleri terminal diferansiyasyon gösteren özelleşmiş hücrelerdir. Yüzeyel hücreler alttaki diğer hücrelerden daha geniş olduğundan ve lokalizasyonundan dolayı "şemsiye" (umbrella) hücreleri olarak adlandırılırlar. Yüzeyel hücrelerin sitoplazması asidofilik olup az miktarda nötral münin içerir. Bu hücreler genişleme ve kontraksiyon sırasında mukozanın bütünlüğünün korunmasını sağlar ve subepitelyal alana idrar geçişini önlerler. Yüzey membranlarının sert olması döküldükten sonra da bu hücrelerin şeklini korumasını sağlar. Yüzeyel hücrelerde kan grubu antijenleri bulunur, fakat büyüme faktörü reseptörleri yoktur. Bazıları binükleerdir. Nükleo-sitoplazmik oranları küçük olarak görünürse de aslında nükleusları büyüktür. Epitelyal savunmanın ilk basamağı olarak yüzeyel hücreler çeşitli zararlı etkenlere maruz kalır. Bu nedenle sıklıkla reaktif görünümündedirler. Böyle durumlarda nükleuslar büyür ve kromatinleri kabalaşır, nükleoller belirginleşir. En şiddetli uyarılarda dahi yüzeyel hücrelerde mitoz nadirdir. Genelde yüzeyel hücrelerin varlığı normal gelişme ve farklılaşmanın göstergesidir.

Deneyisel çalışmalarda ürotelyal hücrelerin membranlarında glikoprotein reseptörlerin bulunduğu ve hücrelerin çevreyle bu reseptörler yardımıyla ilişki kurdukları belirlenmiştir (33,57). Bu reseptörlerden en iyi

tanımlananı, kan grubu antijenleridir. Bazı durumlarda yüzey reseptörleri “transducer” olarak davranan gen ürünleriyle ilişkilidir. Bunların çoğunun fonksiyonu tam belirlenememiştir (57).

MESANE KANSERİ

İnsidans ve Epidemiyoloji : Mesane kanseri Almanyada anilin boyaları üreten boya fabrikası işçilerinde saptanmış olup endüstrileşme ile ilgili gösterilen ilk kanserdir. (27). Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yaklaşık 50 bin yeni olguya tanı konmakta ve kansere bağlı ölümlerin % 3-5 ini bu tümörler oluşturmaktadır (19,27). İdrar yollarının tümörleri tüm kanserlerin % 4-10 unu meydana getirmektedir (47). Belirgin olarak, erkeklerde daha sıktır (erkek/kadın oranı 2.7)(27). Ailesel predispozisyon tanımlanmamıştır. Mesane tümörleri 50-70 yaşları arasında (ortalama 68) sıktır (47). Gençlerde düşük dereceli, noninvaziv değişici epitel hücreli karsinomalar daha sık olarak görülür (18).

Genel ve klinik özellikler : Ürotelyuma benzer farklılaşma gösteren mesane tümörleri değişici epitel hücreli karsinoma (DEHK) olarak adlandırılırlar. Benign olan tümörlerin hücreleri morfolojik olarak normal ürotelyuma çok benzer ve bu tümörler çıkarıldığında hastaların %90-95'i tam olarak tedavi olurlar (29,32).

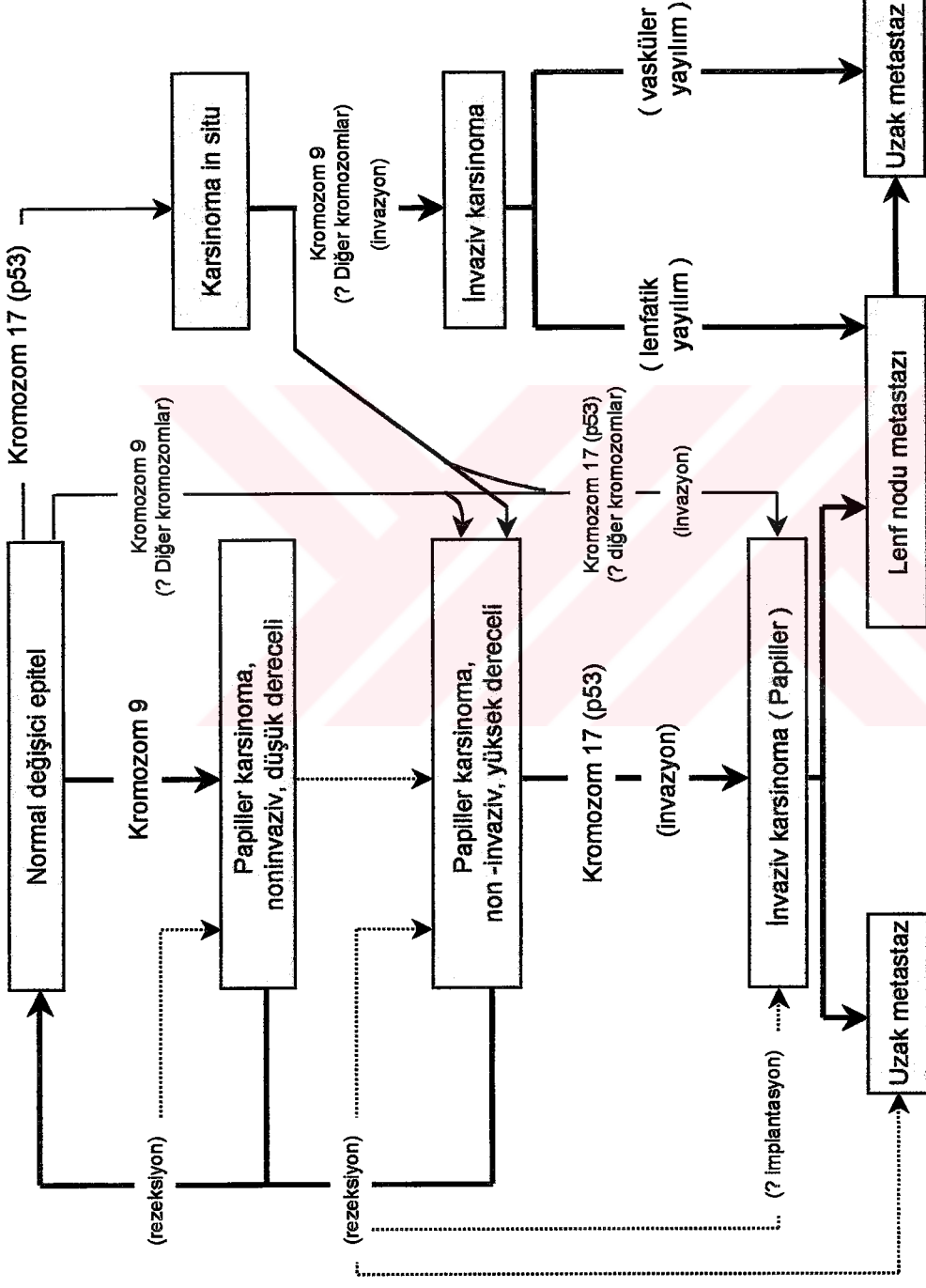
Mesane tümörleri içinde sadece DEHK da histolojik dereceleme yapılır. Tümörler, histolojik derece bakımından farklı sınıflandırmalara göre 3, 4 ve 5 gruba ayrılmaktadır. Tablo-1'de bu farklı histolojik dereceleme sistemleri birbiriyle karşılaştırılmıştır. Glandüler ve yassı epitel hücreli karsinomalar az diferansiye olarak kabul edilirler ve agresif davranış gösterirler. Karsinoma in

situ belirgin anaplazi gösteren hücrelerden oluşan non-invaziv bir ürotelyal lezyondur (47).

Tablo-1 : DEHK ların histolojik derecelemesinde kullanılan sistemler (47)

Ash	Mostofi / WHO	Bergkvist	Broders	Murphy
DEHK, grade I	Papilloma	0	I	Papilloma
		I		
II	I	II	II	düşük dereceli
III	II	III	III	yüksek dereceli
IV	III	IV	IV	

DEHK lar düşük dereceli yüzeyel karsinomalar ve yüksek dereceli invaziv karsinomalar olmak üzere farklı biyolojik davranış gösteren iki gruba ayrılmaktadır (19,66). Düşük ve orta dereceli yüzeyel karsinomalar sıklıkla nüks ederler, nadiren invazyon gösterirler (19). Bunlar DEHK ların %80 kadarını oluştururlar ve genellikle transüretral rezeksiyon (TUR) ile tedavi edilirler. Diğer grubu oluşturan yüksek dereceli lezyonlar ise tanı konduğunda, çoğunlukla kasa invaze olup prognozları kötüdür. Bunlar, DEHK ların %15-20 sini oluştururlar ve daha agresif tedavi edilirler (31,32). Yüzeyel papiller ve non-papiller invaziv karsinomalar genetik ve kromozomal olarak da farklılıklar göstermektedirler. İnvaziv karsinomaların 17nci kromozomda P53 geninde anormallik oluşturan defekt ile birlikte oldukları bildirilmiştir (19,27,11). Yüzeyel papiller karsinomalarda ise 9ncu kromozomda değişiklikler saptanmıştır (27). Mesane kanserinin gelişimindeki genetik değişiklikler şekil-1’de gösterilmiştir (28).



Şekil-1 : Mesane kanseri gelişiminde genetik değişiklikler (28)

Bazı DEHK olgularında, uzun zaman içinde mesanenin farklı alanlarında yeni tümör odakları ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeninin değişik alanların endojen ve ekzojen karsinojenlere maruz kalması olduğu düşünülmüştür. Ancak, moleküler genetik çalışmalar buna alternatif olarak klonal migrasyon/reimplantasyon ve mutant kanser hücrelerinin proliferasyonu gibi olasılıkları da gündeme getirmiştir (19,28)(Şekil-1).

Mesane tümörlerinin belirtileri spesifik değildir. Hastalarda makroskopik yada mikroskopik hematüri olabilir. İntraepitelyal lezyonu bulunan hastalar dizüri, sık idrara çıkma ve suprapubik ağrıdan şikayet edebilirler. Mesane tümörlerinin en sık yerleşim yeri mesane boynudur. Primer lezyonların % 60 kadarı tek lezyondur (24).

Tüm tümörlerin % 72 kadarı tanı konulduğunda mesaneye lokalizedir (24). Tümörlerin yarıdan fazlasının çapı 2.5 cm. den küçüktür. Hastaların %5 inden azında tanı sırasında metastaz vardır. Primer tümörlerin lokalizasyonunun aksine, yineleyen tümörler mesane kubbesi gibi diğer alanlarda ortaya çıkar (47).

Mesane tümörünün histolojik tipi ile prognozu arasında ilişki bulunmaktadır. DEHK dışındaki karsinomalar daha kötü gidişlidir. DEHK ların belirgin sitolojik atipisi bulunan yüksek dereceli tiplerinin prognozu da kötüdür. Düşük dereceli tümörlerin bazılarının yineleme eğilimleri olsa da, bunlarda kötü bir gidiş beklenmez (9).

Etiyoloji ve risk faktörleri : İdrar için rezervuar oluşturması nedeniyle mesane konsantre kimyasal maddelere maruz kalır. Çoğu çalışmacı mesane tümörlerinin primer olarak çevresel faktörler nedeniyle oluştuğunu düşünmektedir (Tablo-2)(43). Petrokimya ürünleri, sigara, arilaminler,

nitrozaminler, benzidin, auramin, fenasetin, siklofosfamid mesane tümörü riskini arttıran karsinojen maddelerdir (24,27). Sakkarinin de ko-karsinojen fonksiyonu vardır (27,47). Schistosoma hematobium enfeksiyonunun yaygın olduğu bölgelerde mesanenin yassı epitel hücreli kanseri sıktır (27). Mesane tümörünün oluşma mekanizmasında çevresel faktörlere aşırı maruz kalmanın yanı sıra konakçı direncinde defektlerin bulunması önemlidir (47).

Tablo-2: Mesane kanserlerinde etyolojik faktörler (27)

Meslek ile ilgili	Meslek dışı
• 2-Naftilamin • 4-Aminobifenil • Benzidin • 4, 4' Metilenbis (2-kloranilin) • 4 Kloranilin • O-Toluidin • Benzidin türevi azo boyaları	• Sigara • Klorpromazin • Fenasetin içeren analjezikler • Siklofosfamid • Thiotepa • Melfalan • Radyoterapi • Balkan nefropatisi • Arsenik • Ürolithiazis

Sınıflandırma : Mesane tümörlerinin % 95'i epitelyal tümörlerdir. Bunların % 75-90 kadarını DEHK lar oluşturmaktadır. Geri kalan % 2-15'ini yassı epitel hücreli karsinoma, %4-6'sını mikst karsinoma, % 2'den azını adenokarsinoma oluşturur (31,47).

Mesane tümörlerinin sınıflandırması aşağıda gösterilmiştir (14,31,67):

Epitelyal tümörler

a) Değişici epitel hücreli neoplazmlar

- Papilloma
- Karsinoma in situ
- Karsinoma
 - tipik
 - papiller

- düz ("flat")

varyantlar

- skuamoz ve glandüler diferansiyasyon gösterenler
- mikropapiller tip
- küçük hücreli
- aldatıcı benign özellikler taşıyanlar ("nested" patern, tubuloglandüler patern, mikrokistik patern, inverted patern)
- sarkomatoid tip
- sinsityotrofoblastlar ile birlikte olan tip
- plazmositoid tip
- anormal stromal reaksiyonla birlikte olanlar (psödosarkomatoz karsinoma, stromal osseöz veya kartilaginöz metaplazi, osteoklast tipi dev hücreler, belirgin lenfoid infiltrat)

b) Yassı epitel hücreli karsinoma (varyantlar : verrüköz karsinoma, sarkomatoid tip)

c) Mikst karsinoma

d) Adenokarsinoma (varyantlar : intestinal tip, müsinöz, yüzük hücreli ve berrak hücreli)

e) Az diferansiye karsinoma

f) Nadir neoplazmlar (karsinosarkoma, karsinoid tümör, melanoma, lenfoepitelyal karsinoma, plazmasitoid karsinoma, dev hücreli karsinoma)

Nonepitelyal tümörler

- Mezenkimal tümörler
- Feokromositoma
- Lenfoma
- Plazmasitoma
- Germ hücreli tümör

Tanı : Mesane tümörleri sistoskopi, sitoloji ve histoloji kombine edilerek saptanır ve takip edilir. Akım sitometrisi ve görüntü analizi ile total nükleer DNA ölçümü standart olmamakla birlikte sıklıkla uygulanmaktadır. Bu yöntemlerin hiçbirisi tümörü her zaman saptayamadığından, tek başına kullanımları sınırlıdır.

Sistoskopi, özellikle mesane tümörünün lokalizasyonunun belirlenmesinde ve düşük dereceli papiller lezyonların saptanmasında yararlıdır. Ancak mesane mukozasının tamamının görülmesi zordur. Bazı

tümörler çok küçük olduğundan görülemeyeceği gibi intraepitelyal lezyonlar tam olarak saptanamayabilir. Ayrıca, topikal kemoterapi sonrası ürotelyumun sistoskopik değerlendirilmesi güvenilir değildir. Sistoskopi ile tümörün histolojik derecesi ve invazyon derinliği belirlenemez.

Mesane tümörlerinin kesin tanısı, histolojik inceleme ile konur. Böylece tümörün tipi, histolojik derecesi ve invazyon derinliği de belirlenir. Doku takibi, "intra-" ve "inter-observer variability" ve örnekleme ile ilgili sorunlar histolojik incelemenin değerini azaltabilmektedir. Sistoskopik olarak görülen tümörler bazen yeterli örneklenememektedir. Bazen de doku küçük olabilmekte ve intraepitelyal lezyonlar biyopside gösterilememektedir (8). Histolojik inceleme sırasında yapılan dereceleme subjektif olduğundan, hem aynı patoloğun tekrarlayan derecelemelerinde (intraobserver), hem de farklı patoloğlar arasındaki histolojik derecelemelerde (interobserver) uyumsuzluk ortaya çıkabilmektedir. Bu uyumsuzluklar, hastaların izlenme ve tedavilerini olumsuz etkileyebilmektedir(8).

Üriner sitolojinin de tümörün tanı ve takibine dahil edilmesi yararlı olabilir (46,47). Sitoloji için herhangi bir hazırlık yapılmaksızın hastadan alınan idrar örnekleri yeterlidir. Ancak, hastaya başka bir amaçla kateter takılmışsa mesane yıkama sıvısı tercih edilmelidir. Örnekler buzdolabında (donmadan) ya da dilue alkol solüsyonunda korunabilir. Sitosantrifüj sonrası Papanicolaou ile boyanan preparatlarda nükleer detaylar iyi değerlendirilmektedir. Yeterli preparatlar kullanılarak gerçek mesane tümörlerinin tümü ve nonepitelyal neoplazmlar saptanabilmektedir (2,46,47). Topikal ilaçlar ile tedavi edilen olguların takibinde ve karsinoma in sitularda da sitolojik inceleme yararlıdır. Topikal tedavi sonrası pozitif

sitolojisi bulunan olgular yüksek riskli gruba girmektedir. Çok düşük dereceli tümörleri sitoloji ile saptamak zor olabilmektedir. İdrar sitolojisindeki hücreler, tümörün parafin kesitlerindeki histolojik derecesini her zaman yansıtmayabilir (46,47).

Histolojik dereceleme : Sitolojik görünümü ön planda tutan birçok histolojik dereceleme sistemi vardır. Bunlardan en sık kullanılanı Ash histolojik dereceleme sistemidir. Bu sisteme göre çok iyi diferansiyasyon gösteren papiller tümörler bile karsinoma olarak adlandırılırlar. Çünkü bu tümörler lokal olarak nüks edebilmektedirler. Ash histolojik dereceleme sistemine göre tümörler 4 gruba ayrılmaktadır (56).

1) Grade I : Fibrovasküler bir sap etrafındaki değişici epitel hücrelerinin meydana getirdiği bir neoplazmdır. Değişici epitel hücreli tümörlerin % 25 kadarını oluşturur. Hücreleri tamamıyla normal ürotelyuma benzerdir. WHO ya da Mostofi'ye göre papilloma olarak tanımlanan tümörlere, Ash histolojik dereceleme sisteminde iyi diferansiye papiller tümör (grade I) adı verilmiştir (56).

Bu tümörlerin hücrelerinin kromozom yapısı normal olup, diploid hücrelerdir. Grade I DEHK ların % 80'inden fazlasında normal ABH kan grubu antijeni ekspresyonu mevcuttur. Proliferatif aktivite normal sınırlardadır. Grade I DEHK larda, atipi belirgin olmadığından lezyonun idrar örneklerinde saptanması zordur. Kas tabakasını infiltre etmezler ve metastaz yapmazlar. Bu lezyonlar yineleyebildikleri ve karsinomaların sellüler özellikleriyle ilişkili olduklarından neoplastik olarak kabul edilirler.

Histolojik preparatlarda grade I karsinomalar ince fibrovasküler sap etrafında çok sıralı dizilim gösteren ve yüzeyel hücre tabakasını koruyan

değişici epitel hücrelerinden oluşur. Hücreler sap etrafında düzenli dağılım gösterirler. Nükleolusları oval veya yuvarlak olup yüzeye ya da lamina propriaya dik yerleşim gösterirler. Nükleoller küçük ya da yoktur. Kromatin dağılımı düzenlidir. Mitoz çok seyrek olarak bulunabilir.

2) Grade II : Bu tümörler saplı veya sapsız olabilirler. Nekroz nadirdir. Grade I tümörlere göre daha solid görünümlüdürler. Mikroskopik olarak; papiller yapılar oluşturan tümörde fibrovasküler sap etrafında tabaka sayısının arttığı, hücrelerin kalabalıklaştığı ve nükleusların hiperkromatik olduğu, mitozun arttığı görülür.

3) Grade III : Çoğu sapsız olup, karnıbahar görünümünde tümörlerdir. Nekroz ve ülserasyon sıktır. Mikroskopik olarak, bazı alanlarda düzensiz dağılım gösteren papiller yapılar ve küçük gruplar oluşturan tümörde mitoz histolojik olarak kolaylıkla bulunabilmektedir.

4) Grade IV : Makroskopik olarak sapsız, ülser ve nekrotik görünümde olup karnıbahar şeklinde tümörlerdir. Papiller alanlar yoktur ya da ender olarak görülebilir. Sellüler atipi ve pleomorfizm çok belirgin olup, tümörün değişici epitel farklılaşması seçilemeyebilir. Mitoz sık ve çoğunlukla atipiktir. Bu tümörlerin çoğu invazivdir.

Ash sisteminden başka American Bladder Tumor Registry ve WHO tarafından kabul edilen Mostofi dereceleme sistemi ile Bergkvist, Broders ve Murphy dereceleme sistemleri mevcuttur (53)(Tablo-1).

Tedavi : Kas invazyonu bulunmayan Grade I ve II DEHK ları başlangıçta TUR ile tedavi edilir (23). Yüzeyel DEHK larında intravezikal BCG uygulaması nüksleri belirgin olarak azaltmaktadır (24). Birden çok tümörü bulunan ve yineleyen olgularda gerekirse intravezikal kemoterapi ve

radyoterapi eklenebilir. Grade III ve IV DEHK, kas invazyonu bulunan tümörler ve konservatif tedaviye dirençli olgular radikal sistektomiyle tedavi edilir.

Prognostik Faktörler : Mesane kanserlerinde prognoza etkili faktörler tablo-3'de gösterilmiştir.

Tablo-3 : Mesane kanserinde prognostik faktörlerin sınıflandırması

A. Literatürde iyi tanımlanmış olan ve tedavide kullanılanlar	B. Biyolojik ve klinik çalışmalar
- Histolojik tip - Histolojik derece - Tümör çapı - İnvazyonun derecesi - Multisentrisite - Karsinoma in situ ile birliktelik - Lenfatik / vasküler invazyon	- Kan grubu antijenlerinin kaybı - Muskularis mukozaya invazyonu da değerlendiren ayrıntılı evreleme - T antijeni analizi - Proliferasyon göstergeleri • DNA miktarı ve S fazı fraksiyonu • Proliferasyon belirleyicileri : Ki-67 ve PCNA - Moleküler genetik belirleyiciler • 9 nolu kromozomun kısmi kaybı • 11 nolu kromozomda delesyon • H-ras, c-erbB-1 ve c-erbB-2 proto-onkogenlerin aktivasyonu • 17 nolu kromozomda genetik materyal kaybı, mutant p53 geniyle birliktelik • Retinoblastoma geni kaybı

1) Evre: En önemli prognostik faktördür (31,52,64,66). Evreleme için Jewett sistemi ve onun modifikasyonları ile American Joint Committee for Cancer (AJCC) ' nin önerdiği TNM sistemi kullanılmaktadır (Tablo-3)(32). Kas invazyonu olan olgularda hastaların yaşam süresi belirgin olarak azalmaktadır (29).

Tablo-4 : DEHK için evreleme sistemleri (32,23)

JSM	AJCC	
-	Tx	Primer tümör değerlendirilememiştir
-	T ₀	Primer tümör yok
0	T _{is}	Karsinoma in situ
0	T _a	Papiller non-invaziv karsinoma
A	T ₁	Tümör subepitelyal bağ dokusuna infiltre
B ₁	T ₂	Tümör yüzeysel kas tabakasına infiltre
B ₂	T ₃	Tümör derin kas tabakasına veya perivezikal yağ dokusuna infiltre
B ₂	T _{3a}	Tümör derin kas tabakasına infiltre
C	T _{3b}	Tümör perivezikal yağ dokusuna infiltre
D ₁	T ₄	Prostat, uterus, vagina, pelvik veya abdominal duvar invazyonu
D ₁	T _{4a}	Prostat, uterus veya vaginaya invazyon
	T _{4b}	Pelvik veya abdominal duvar invazyonu

JSM : Jewett-Strong (Marshall modifikasyonu), AJCC : American Joint Committee for Cancer

2) Histolojik Derece: Genellikle evreyle yakından ilişkilidir (29,52,66). Aynı evredeki tümörlerde histolojik derece bağımsız prognostik faktör olarak değerlendirilir (29).

3) Lenf nodu tutulumu : Lenf nodu tutulumu bulunan olguların uzun süreli yaşam oranı sıfıra yakındır (66).

4) Yerleşim yeri : Mesane boynunda yerleşen tümörlerin prognozu daha kötüdür (60).

5) Hastanın yaşı : İlk 2 dekatta ortaya çıkan çok az sayıda tümör mevcuttur. Bunlar genellikle iyi diferansiye ve invaziv olmayan tümörlerdir (18,64).

6) Mesane mukozasının diğer alanları : Asıl tümörden bağımsız küçük tümörlerin ve displastik değişikliklerin bulunması durumunda tümörün yinleme riski yüksektir (52,64).

7) Vasküler invazyon : Evre T1 DEHK larda lenfatik veya kan damarı invazyonu saptanması yaşam süresini azaltmaktadır. Tümör etrafındaki retraksiyon artefaktı yanıltıcı olabileceğinden gerekirse immünohistokimyasal olarak endotelial belirleyiciler (faktör VIII, Ulex Europeus ve CD 31) kullanılmalıdır (32).

8) Tümörü infiltre eden lenfositler : Tümör progresyonu ve yinleme olmadan geçen yaşam süresi ile ilişkilidir (41).

9) Kan grubu antijenleri : ABH ve Lewis antijenlerinin ekspresyonunun azalmasının agresif klinik gidiş ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (33,59). Ancak bireyler arasında kalıtsal heterojenite nedeniyle kan grubu antijeni ekspresyonu konusu fazla taraftar toplamamıştır (32). Thomsen-Friedenreich antijeni ekspresyonu düşük derece ve evredeki tümörlerin progresyonu ile ilişkili görünümde (32).

10) DNA ploidi ve sitomorfometrik parametreler: Akım sitometrisi ve statik yöntemlerle yapılan çalışmalarda özellikle grade II DEHK larda bağımsız bir prognostik faktör olduğu görülmektedir (4). Klinik gidiş ve mikroskopik derece ile DNA ploidi arasında yakın bir ilişki mevcuttur (4,13,35,61,64). Çok değişkenli analizler ile DEHK'larda nükleer alanın yaşam süresi ile ilişkili olduğu ve histolojik derecelemeden daha anlamlı bir prognostik gösterge olduğu gösterilmiştir (4,36,42).

11) Hücre proliferasyonu : Yüksek mitotik aktivite ve S fazı fraksiyonu bağımsız prognostik faktördür (13,40,42). Benzer sonuçlar grade II tümörlerde immünohistokimyasal olarak Ki-67 çalışmasıyla da gösterilmiştir (30).

12) P53 : Mutasyon göstergesi olan nükleer P53 ekspresyonu immünohistokimyasal olarak artmış olması hem histolojik derece hem de evre ile ilişkilidir (16). DEHK larda immünohistokimyasal olarak nükleuslarda P53 birikiminin saptanması, yineleme ve yaşam süresi açısından tümörün evre, histolojik derece ve lenf nodu durumundan bağımsız, kötü bir prognostik göstergedir (17). Glick ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, kas invazyonu bulunan DEHK larda P53 ekspresyonunun prognostik öneminin olmadığı saptanmıştır (22).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma GATA Patoloji AD.nda 1995-1998 yıllarında “değişici epitel hücreli karsinoma” tanısı almış, arşivde parafin blokları ve preparatları bulunan toplam 139 olgu üzerinde yapılmıştır. Olguların GATA Patoloji AD. arşivinde bulunan preparatları çıkarılmış ve yeniden incelenerek Ash sistemine göre histolojik derecelemesi ve Jewett sistemine göre evrelemesi yapılmıştır (Tablo-6,7,8,9). Belirgin koter artefaktı, doku takip ve tespit sorunu, dokunun çok küçük olması ve yetersiz arşiv bilgisi gibi nedenlerden dolayı 53 olgu çalışma dışı bırakılmış ve çalışılan olgu sayısı 86’ya inmiştir. Orijinal grup ile çalışılmaya alınan grup arasında yaş, cinsiyet, tümör derece ve evresi bakımından fark bulunmamaktadır. Çalışılan 86 olgunun tamamı transüretal rezeksiyon (TUR) materyalinden oluşmaktadır.

Transüretal rezeksiyon materyallerinin miktarı tümör hacmine bağlı olarak 0.2 ml. ile 15 ml. arasında değişmektedir. Buna göre, her bir olgu için 1 ile 17 arasında değişen sayıda parafin blok bulunmaktadır. Histolojik inceleme için hematoksilin-eozin (H-E) ile boyanmış 5-µm. kalınlığında kesitler değerlendirilmiştir.

Klinik özellikler : 86 olgunun 75’i erkek, 11’i kadın hastadan oluşmaktadır. Kadın/erkek oranı 6.8/1’dir. Hastaların yaşı 35-82 arasında değişmekte olup ortalama 61’dir. Üç olguya TUR sonrası sistoprostatektomi yapılmıştır.

Nükleus Süspansiyonu Hazırlanması Ve Özel Boya İşlemleri

Morfometrik ölçümler; akım sitometrisi için parafin bloklardan nükleus süspansiyonu hazırlanması yöntemi modifiye edilerek elde edilen nükleus

preparatlarında yapılmıştır (26,45). Olguların H-E boyalı preparatları tekrar incelenirken tümörü en iyi temsil eden (en az diferansiye alanlar bulunan) bir preparat seçilerek parafin bloğu morfometrik ölçüm için arşivden çıkarılmıştır. Multipl tümörler için histolojik derecesi en yüksek olan örnek seçilmiştir. Bu preparatların bloklarından biri 30 mikron, diğeri 5 mikron kalınlığında iki kesit yapılmıştır. Otuz mikron kalınlığındaki kesit, daha sonra aşağıda belirtilen işlemlerden geçirilerek nükleus süspansiyonu haline getirilmiştir (Resim1).

Parafin bloklardan nükleus süspansiyonu elde etme yöntemi (26.45) :

1. Parafin kesitler tüplere konur.
2. Tüp içine ksilol konarak beş dakika çalkalanır, sonra 5 dakika tüp hareketsiz bekletilir. Tüpün dip kısmına dokular çöker. Üstte kalan ksilol dökülür. Tüpe tekrar ksilol konarak aynı işlem tekrar edilir.
3. Bu kez tüpe % 95'lik etil alkol konarak 5 dakika çalkalanır, sonra 5 dakika hareketsiz bırakılır ve üstte kalan kısım dökülür. Bu işlem iki kez % 95'lik etil alkol ile tekrar edildikten sonra %50'lik etil alkol ile yapılır.
4. Tamponlu fosfat solüsyonunda (PBS) 30 dakika bekletilir.
5. Sıcaklığı 37°C olan etüvde 1ml. %0.5'lik pepsin solüsyonunda 30 dakika bekletilir.
6. Bu süre sonunda, dokunun parçalanmasının tam olması için en az 15 kere şırınga ile solüsyon aspire edilerek tüpün içine püskürtülür.
7. Pepsinin aktivitesini durdurmak için 30 dakika sonra 1ml. PBS eklenir.
8. Süspansiyonlar, 5 dakika süresince (1000 devir/dakika) sitospin ile santrifüje edilir. Sitospin işleminde poly-L-lysine ile kaplanmış yapışkanlı lamalar kullanılır.

9. Nükleus süspansiyonu yayıldıktan sonra üzerlerine %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonu damlatılır ve lamaların kuruması beklenir.

Nükleus süspansiyonu hazırlanması sırasında kullanılan solüsyonların hazırlanışı şöyledir:

Pepsin solüsyonu : 100 ml. serum fizyolojik içine 0.5 gr. pepsin katılarak hidroklorik asitle pH değeri 1.5 olacak şekilde tamponlanır.

Tamponlu fosfat solüsyonu :	Dibazik sodyum fosfat	1.48 gr.
	Monobazik sodyum fosfat	0.43 gr.
	Sodyum klorür	7.2 gr.
	Distile su	1000 ml.

Hazırlanan nükleus süspansiyonu preparatları daha sonra aşağıda açıklanan Feulgen yöntemiyle boyanmıştır.

Feulgen yöntemi

1. Preparatlar bir saat Metanol-Formol-Asetik asit solusyonunda bekletilir.
2. Bir saatlik postfiksasyonu takiben örnekler çeşme suyunda beş dakika yıkanır.
3. Sıcaklık $22 \text{ C} \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de sabit olacak şekilde, 5N HCl solusyonunda 1 saat bekletilir.
4. Çeşme suyunda beş dakika yıkanır.
5. Sıcaklık $22 \text{ C} \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de sabit olacak şekilde, Schiff solüsyonunda 1 saat bekletilir.
6. Çeşme suyunda beş dakika yıkanır.
7. Potasyum metabisülfid solüsyonunda üç kez onar dakika tutularak yıkanır.

8. Çeşme suyunda beş dakika yıkanır.
9. %95'lik etil alkolde 3 kez beşer dakika dehidrate edilir.
10. Ksilolde 3 kez beşer dakika dealkolize edilir.
11. Lamlar Entellan® ile kapatılır.

Boyama sırasında kullanılan solüsyonların hazırlanışı şöyledir:

5N HCl : Deiyonize su 56 ml.
 Konsantre HCl 40 ml.

Schiff solüsyonu : 0.5 pararosaniline 100 ml. kaynayan suda çözülür.

Karışım 50 °C' ye kadar soğutulur.

10 ml. 1 N HCl ve 2 gr. Potasyum metabisulfit eklenir.

Oda sıcaklığında 24 saat saklanır. Süzülür.

Gerekirse buzdolabında saklanır.

Potasyum sülfid solüsyonu :	Potasyum metabisülfid	1 gr.
	Deiyonize su	190 gr.
	1 N HCl	10 ml.

Tüm aşamalardan sonra nükleus (DNA) mavi boyanırken sitoplazmalar ve zemin boyanmaz (Resim-2) .

Morfometrik Değerlendirme

Donanım ve Yazılım: Bütün ölçümler Zeiss Axioskop ışık mikroskobu üzerine monte edilmiş üç çipli renkli Sony videokameradan alınan görüntülerde yapılmıştır. Ölçüm sırasında 63 büyütmeli 0. 17 nümerik açıklığı olan plan apochromate (immersiyon) objektif kullanılmıştır. Ölçümler 128 MB belleği olan, Pentium 233MMX işlemcili , IBM uyumlu bilgisayarda 21 "inch" lik monitörde (Philips), Windows NT 4. 0 işletim sistemi üzerinde çalışan

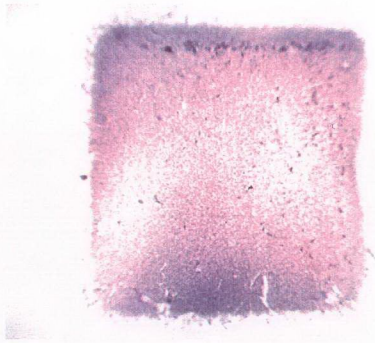
Autocyte QUIC DNA 1995-1998 yazılımı ile yapılmıştır. Görüntüler bilgisayara Matrox Meteor “frame grabber” kartı ile aktarılmıştır (Resim-3).

Teknik: Görüntü analizi ekipmanının kalibrasyonu için rat hepatositleri kullanılmıştır (Roche®). Herbir ölçüm için mikroskop, bilgisayar, “frame grabber” ve otomatik şaryo çalışır hale getirilmiştir. Daha sonra Autocyte Quic DNA programı başlatılarak açılan pencerede yeni ölçüm yapılması seçeneği kabul edilmiştir. Programın mikroskoptan aldığı görüntü bilgisayar ekranında görünür hale getirilmiştir. Kamera adaptörü kapatılarak tam karanlık değeri (background noise) saptanmıştır. Preparat üzerinde seçilen boş bir alanın optik yoğunluğu alındıktan sonra Kohler aydınlatması için ayarlama yapılmıştır. Bu aşamalardan sonra ise görüntü net hale getirilmiş ve ölçüme başlanmıştır. Çalışılacak alanın bir köşesinden başlanarak tüm tümör ve referans hücrelerinin nükleusları interaktif olarak seçilmiş ve her bir hücre için optik yoğunluk ve nükleer alan saptanmıştır. İnternal referans olarak lenfositlerin nükleusları seçilmiştir. En az 200 tümör hücresinin nükleusu ve 30 lenfosit nükleusu seçildikten sonra sayım işlemi bitirilmiştir. Ezilmiş, parçalanmış veya üstüste binmiş hücreler çalışmaya alınmamıştır. Görüntü alıp kaydetme işlemi bittikten sonra olgulara ait görüntüler teker teker gözden geçirilerek nükleer membranında aşırı düzensizlikler bulunan nükleuslar dejenere oldukları kabul edilerek ölçümden çıkarılmıştır. Daha sonra internal kontrol için optik yoğunluklarının varyasyon katsayısı %8’den fazla olmayan lenfositler referans hücre olarak kabul edilerek ploidi kalibrasyonu yapılmıştır. Referans hücrelerin DNA doruğunun diploid tümör hücrelerinin doruğundan farklı olduğu olgular için düzeltme faktörü hesaplanmıştır. Düzeltme faktörünün hesaplanması için diploid alandaki tümör hücrelerinin ortalama

DNA indeksi referans hücrelerinin DNA ortalamasına bölünmüştür. Sonuçta olgular için DNA indeks grafikleri elde edilmiş ve Auer sınıflandırılmasına göre yorumlanarak gruplara ayrılmıştır. Auer histogram sınıflandırması DNA histogramlarını değerlendirmede kullanılan bir yöntemdir. Tip I histogram ile diploid populasyon ifade edilmiş, diğer histogram tipleri anöplöid populasyonlar için kullanılmıştır. Sonuçta her bir olgu için DNA ile ilgili şu parametreler elde edilmiştir : DNA indeksi, doruk DNA değeri, DNA indeksi 2.5c, 3c, 4c ve 5c'den fazla hücrelerin oranı ve Auer histogramı. Her bir olgu için ölçülen tüm tümör hücrelerinin nükleer alanlarının ortalaması bulunmuş ve ortalama nükleer alan (ONA) olarak kaydedilmiştir. Bunların içinden en büyük 10 hücrenin alanının ayrıca ortalaması alınmış ve en büyük 10 hücrenin ortalama nükleer alanı (NA 10) veri olarak elde edilmiştir.

Değerlendirmelerin sonunda her olgunun verileri protokol numarasından oluşan dosya adıyla kaydedilmiştir.

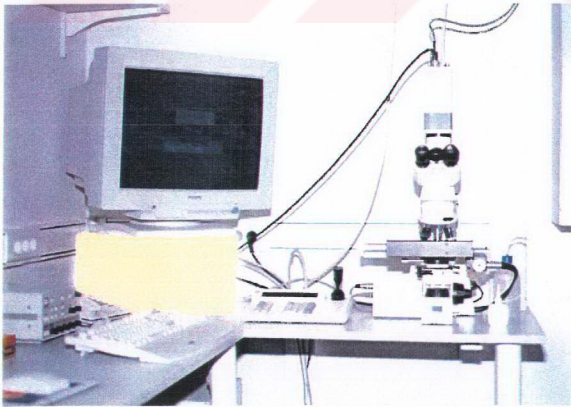
İstatiksel İnceleme: Yöntem bölümünde tanımlanan parametrelerden en büyük 10 hücrenin nükleer alanı (NA 10), ortalama nükleer alan (ONA) ve DNA indeksi açısından histolojik dereceler arasında fark olup olmadığını belirlemek amacıyla nonparametrik bir test olan Mann-Whitney U testi ile Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılmış ve eşik değeri %5 ($p= 0.05$) olarak kabul edilmiştir. Ayrıca ONA ve NA 10'nın DNA indeksi ile ilişkisini belirlemek için bağıntı analizi yapılmıştır. Bütün istatistikler ve grafikler için SPSS 7.5 yazılımı kullanılmıştır.



Şekil -1 : Lama yayılmış, feulgen ile boyanmış nükleus süspansiyonu (x8)



Şekil-2 : Lama yayılmış, feulgen ile boyanmış nükleus süspansiyonu, büyük büyütme (x200)



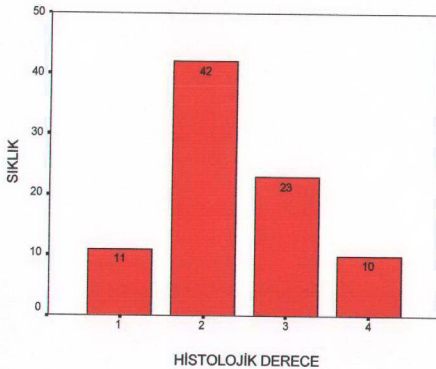
Şekil-3 : Ölçümler için kullanılan donanım

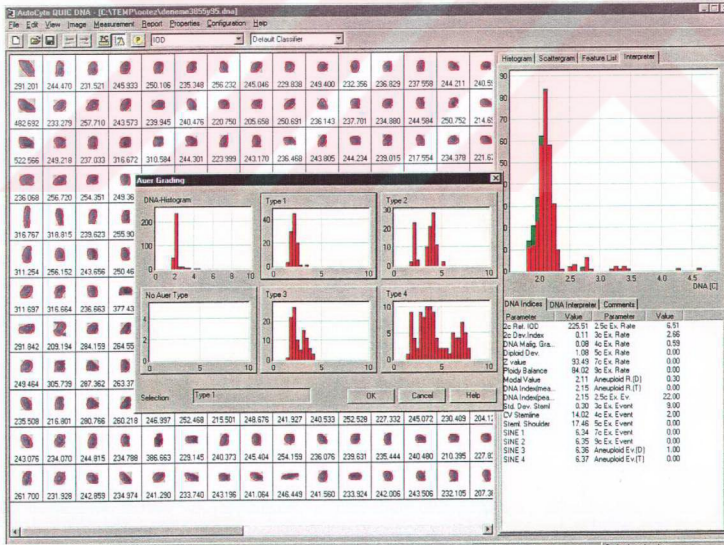
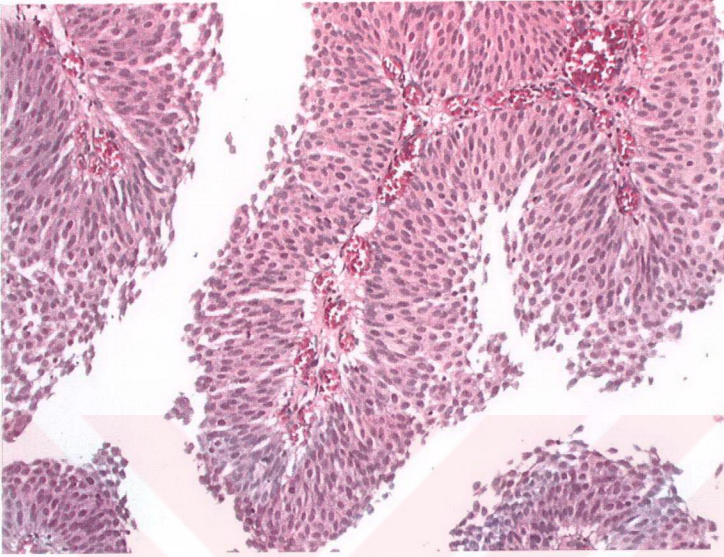
BULGULAR

Çalışma, değişici epitel hücreli karsinoma tanısı alan mesane kanseri olgularında yapılmıştır. Morfometrik ölçümler ve histopatolojik değerlendirmeler 86 olgu üzerinden yapılmıştır. Olguların yaşları 35 ile 82 arasında olup ortalama 61'dir. Seksen altı olgunun 75'ini (%87.2) erkek, 11'ini (%17.8) kadın hastalar oluşturmaktadır. Erkek/kadın oranı 6.8/1'dir.

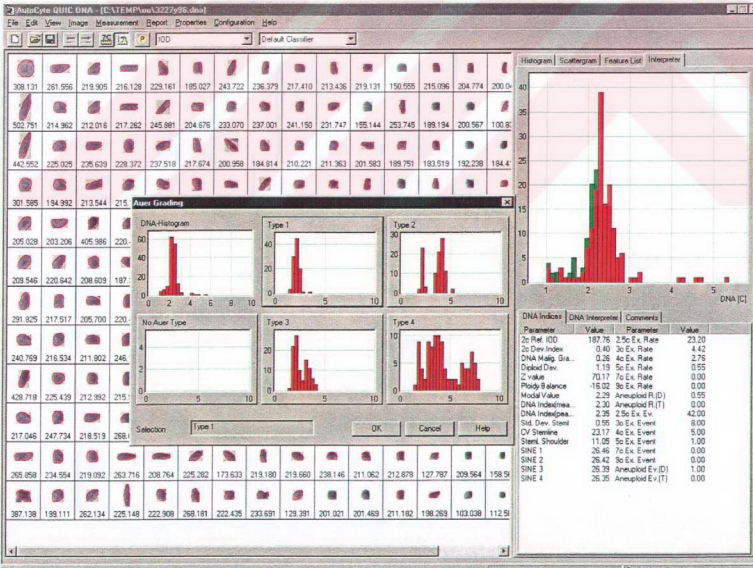
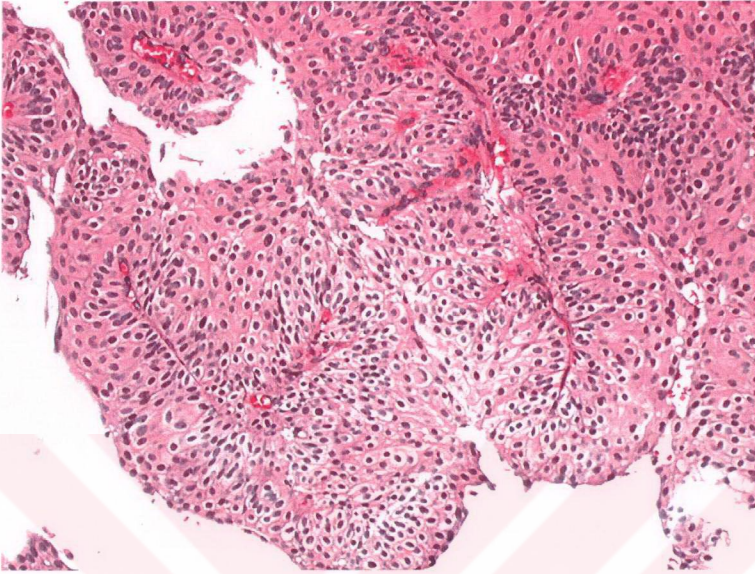
Olguların 11'i grade I, 42'si grade II, 23'ü grade III ve 10'u grade IV DEHK olgusudur (Şekil-2). Grade I olguların 7'si noninfiltratif, 4'ü ise submukozaya invaze görünümündedir. Grade II olguların 11'i noninfiltratif olup 29'u submukozaya, 2'si ise kasa infiltredir. Grade III olguların 7'si submukozaya, 15'i kasa ve biri perivezikal yağ dokusuna infiltredir. Grade IV olguların biri submukozaya ve 9'u ise kasa invazyon göstermektedir (Tablo-5). Farklı histolojik derecesi olan 4 olgunun morfolojik görünümü ve bu olgulara ait sitomorfometrik değerlendirme ekranları resim-4,5,6 ve 7'de gösterilmiştir.

Şekil-2 : Olguların histolojik derecelerinin dağılımı

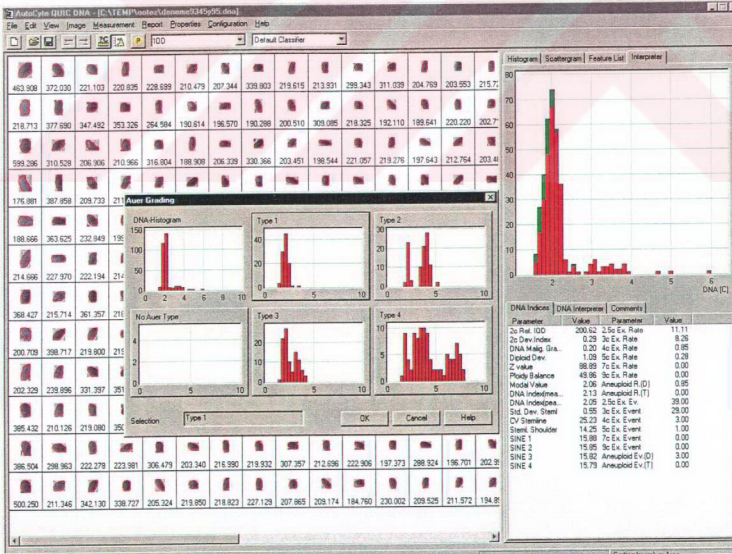
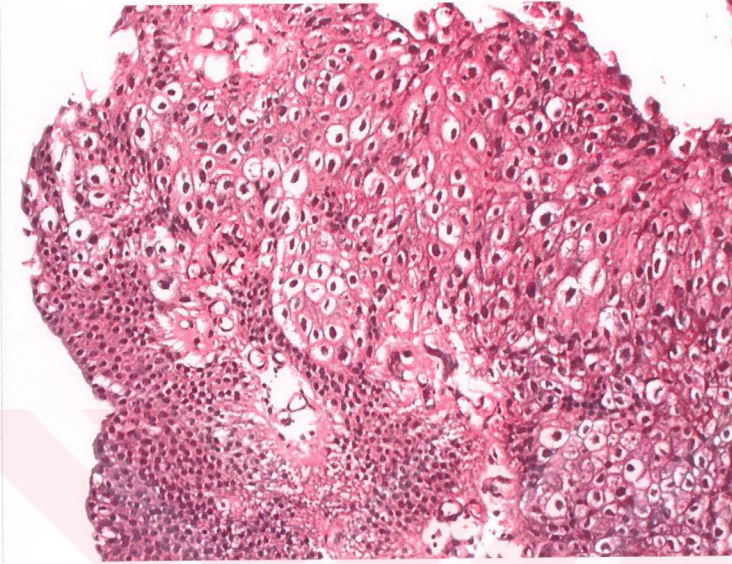




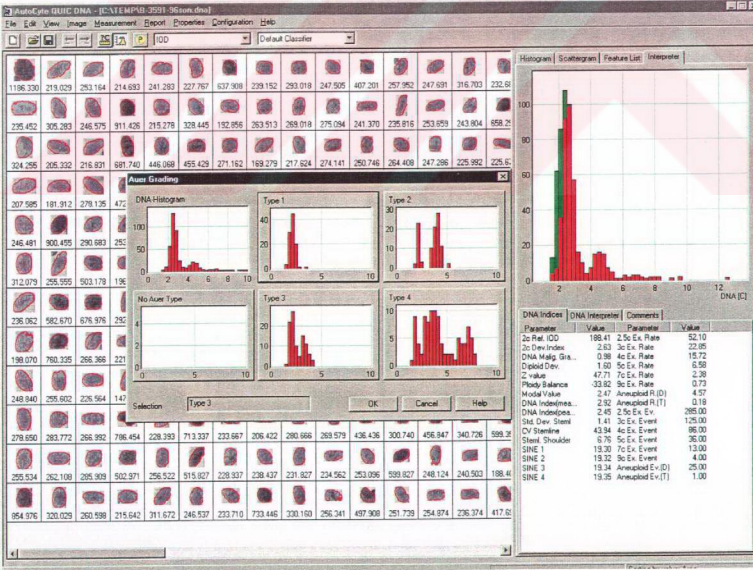
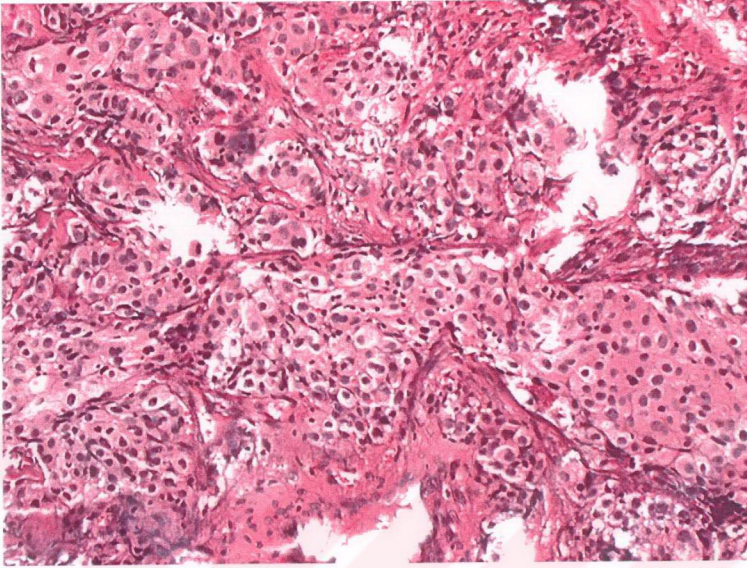
Resim-4 : Grade I (Ash) DEHK (B-3855/95) olgusu (H-E x100) ve morfometrik ölçüm sonucu



Resim-5 : Grade II (Ash) DEHK (B-3227/96) olgusu (H-E x100) ve morfometrik ölçüm sonucu



Resim-6 : Grade III (Ash) DEHK (B-9345/95) olgusu (H-E x100) ve morfometrik ölçüm sonucu



Resim-7 : Grade IV (Ash) DEHK (B-3591/96) olgusu (H-E x100) ve morfometrik ölçüm sonucu

Tablo-5 : Olguların invazyon dereceleri

Histolojik derece	İnvazyon derecesi				Toplam
	Noninfiltratif	Submukoza	Kas	Perivezikal yağ	
Grade I	7	4	-	-	11
Grade II	11	29	2	-	42
Grade III	-	7	15	1	23
Grade IV	-	1	9	-	10
Toplam	18	41	26	1	86

Olguların, morfometrik ölçümlerde saptanan ONA, NA 10, DNA indeksi, doruk DNA değeri, DNA indeksi 2.5c, 3c, 4c ve 5c'yi aşan hücre oranları ile Auer histogramları, tümörün invazyon derecesi ile birlikte tablo-6,7,8 ve 9'da gösterilmiştir.

Tablo-6 : Grade I DEHK olgularının sitomorfometrik ölçüm sonuçları

SIRA NO	PROTOKOL NO	YIL	YAŞ	CLNS	DERECE	İNVAZYON	JEWETT	TNM	Tümör hücre sayısı	Referans hücre sayısı	NA ORT	NA 10	DNA indeksi	DORUK DNA	V2.5c	V3c	V4c	V5c	AUER HISTOGRAMI
1	2873	96	61	E	1	Noninfiltratif	0	Ta	472	28	70,1	132,4	2,02	2,05	1,4	0,6	0,4	0	1
2	329	95	60	E	1	Noninfiltratif	0	Ta	312	94	67,3	116,3	2,11	2,15	14	4,4	0,5	0,2	1
3	3613	96	68	E	1	Submukoza	A	T1	372	35	96,5	132,4	2,2	2,05	9,1	8,4	2,2	0,7	1
4	3668	95	63	E	1	Noninfiltratif	0	Ta	441	31	48,9	85,4	2,01	2,05	0,9	0	0	0	1
5	3792	96	45	E	1	Noninfiltratif	0	Ta	147	61	117,8	139,7	2,06	2,25	1,7	1,3	0,4	0	1
6	3855	95	73	E	1	Noninfiltratif	0	Ta	405	23	67,8	122,4	2,04	2,15	5,1	2,1	0,5	0	1
7	3987	96	70	E	1	Noninfiltratif	0	Ta	322	38	72,6	108,6	2,04	2,15	3,1	0	0	0	1
8	506	95	57	E	1	Submukoza	A	T1	250	61	63,8	126,8	2,02	2,05	3,1	2,2	0,6	0	1
9	9023	95	60	K	1	Submukoza	A	T1	304	68	49,2	110,4	2,01	2,05	2,6	1,7	0,2	0	1
10	9531	96	48	E	1	Submukoza	A	T1	237	55	71,4	118,7	2,16	1,95	21,2	13,6	0,9	0	1
11	11146	96	61	K	1	Noninfiltratif	0	Ta	274	22	65	105	2,1	2,05	7,2	6,2	1,3	0,3	1

Tablo-7 : Grade II DEHK olgularının sitomorfometrik ölçüm sonuçları

SIRA NO	PROT. NO	YIL	YAŞ	CİNS	DERECE	İNVAZYON	JEWETT	TNM	THS	REF. H. S.	NA ORT	NA 10	DNA indeksi	DORUK DNA	>2.5c	>3c	>4c	>5c	AUER HIS.
1	10162	96	44	E	2	Submukoza	A	T1	266	41	67,7	124,8	2,08	1,95	4,2	3,5	3,5	0,6	1
2	10181	95	56	E	2	Submukoza	A	T1	304	95	78,9	230,1	2,36	2,05	18,5	13,5	6	3,2	1
3	10459	96	50	E	2	Submukoza	A	T1	225	41	80,7	146,1	2,07	1,95	7,8	5,4	0,6	0	1
4	10558	95	61	K	2	Submukoza	A	T1	218	66	85,5	143,4	2,21	2,05	14,7	6,3	2,1	0,3	1
5	10863	96	58	E	2	Submukoza	A	T1	321	28	59,5	108,1	1,99	1,95	3,7	1,4	0,5	0	1
6	10871	96	64	E	2	Submukoza	A	T1	265	44	56,4	103,9	2,17	2,15	5,5	4,5	1,5	0,6	1
7	11296	96	75	E	2	Submukoza	A	T1	401	30	74	148,3	3,09	3,05	81,4	57,2	6,8	2,4	3
8	1180	96	48	E	2	Submukoza	A	T1	222	84	85,2	138,8	2,02	2,15	7,1	2,6	0,6	0	1
9	1256	96	43	E	2	Submukoza	A	T1	198	48	81,2	112,6	2,09	2,05	3,2	2,8	0,8	0	1
10	2443	95	54	E	2	Noninfiltratif	0	Ta	164	44	218,1	94,8	2,38	2,05	15,1	11,2	5,6	3,5	1
11	255	96	71	E	2	Submukoza	A	T1	284	51	98,1	203,6	2,3	1,95	18,5	11,1	5,2	1,8	1
12	4170	95	71	E	2	Submukoza	A	T1	386	38	81,6	208,2	2,31	1,95	20,1	13,9	4	1,9	3
13	431	96	67	K	2	Submukoza	A	T1	179	42	89,7	170,2	2,11	1,95	10,5	9,6	2,5	0	1
14	4528	95	62	E	2	Yüzeyel kas	B1	T2	325	24	91	171,2	2,33	2,15	19,5	10,9	2,9	0,3	1
15	4757	95	71	K	2	Noninfiltratif	0	Ta	328	69	59,6	112,7	2,03	2,15	7,8	0,3	0	0	1
16	490	96	55	E	2	Submukoza	A	T1	252	48	62,6	117,9	2,01	1,95	4,7	3	0,7	0	1
17	503	95	56	E	2	Submukoza	A	T1	229	33	88	190,7	2,11	2,05	6,3	4,5	2,7	0,3	1
18	6239	97	57	E	2	Submukoza	A	T1	331	50	75,2	144,4	2,03	1,95	6	3,7	1	0,3	1
19	6657	97	49	E	2	Submukoza	A	T1	230	40	107,7	192,6	2,01	2,05	3,7	3,3	0,7	0	1
20	6892	97	69	K	2	Submukoza	A	T1	258	52	124,3	224,1	2,68	1,95	43,2	41,3	7,7	0	3

Tablo-7'nin devamı

SIRA NO	PROT. NO	YIL	YAŞ	CİNS	DERECE	İNVAZYON	JEWETT	TNM	THS	REF. H. S.	NA ORT	NA 10	DNA indeksi	DORUK DNA	V _{2.5c}	V _{3c}	V _{4c}	V _{5c}	AUER HIS.
21	6925	97	74	E	2	Noninfiltratif	0	Ta	261	28	52,7	84,9	2,05	2,05	4,5	2,8	0,4	0	1
22	7645	97	84	E	2	Submukoza	A	T1	212	41	71,7	125,1	2,06	1,95	4,8	1,7	0,3	0,3	1
23	8013	96	53	E	2	Noninfiltratif	0	Ta	296	22	51,9	89,4	2,07	2,05	4,1	1,9	0	0	1
24	8233	96	39	E	2	Noninfiltratif	0	Ta	294	50	68,7	121,8	2,37	1,85	28,7	22,7	4,3	0,8	3
25	8449	96	44	E	2	Submukoza	A	T1	235	43	84,2	143,7	2,04	1,95	8,9	1,8	0,6	0	1
26	8562	97	53	E	2	Submukoza	A	T1	204	27	99,9	152,8	2,25	1,85	18,8	8,2	4,9	1,6	1
27	8738	95	39	E	2	Noninfiltratif	0	Ta	350	32	87,3	144,4	2,03	2,05	2,6	2,1	1,1	0	1
28	8740	95	57	E	2	Noninfiltratif	0	Ta	350	29	85,7	184	2,74	1,95	46,2	41,7	12,1	1,1	3
29	9062	96	72	E	2	Derin kas	B2	T3	217	21	91,6	158	2,97	1,95	50,9	49,8	10,4	3,2	3
30	9661	95	52	E	2	Submukoza	A	T1	439	41	93,6	211,1	3,14	2,25	66,6	58,7	18,2	1	3
31	9984	96	74	K	2	Submukoza	A	T1	306	35	68,6	100,7	2,03	2,05	2,3	2,3	0,3	0	1
32	9990	96	43	E	2	Submukoza	A	T1	337	40	73,1	157,7	2,05	2,15	4,8	2,4	1,3	0,3	1
33	857	98	52	E	2	Noninfiltratif	0	Ta	173	43	96,3	197,8	2,46	1,95	35,7	11,8	6,1	2,4	3
34	1640	95	69	E	2	Submukoza	A	T1	248	35	65,2	112,5	2,62	2,15	39,5	28,2	15,1	2,1	3
35	8597	96	67	E	2	Submukoza	A	T1	209	43	90	170	2,62	2,55	50	10,7	6,1	2,5	3
36	8847	95	59	E	2	Noninfiltratif	0	Ta	171	30	65,9	108,1	2,02	1,95	5,5	2,1	0,4	0	1
37	10324	96	43	E	1	Noninfiltratif	0	Ta	356	65	64,1	121,1	2	2,05	2,6	0,72	0	0	1
38	570	96	66	E	1	Submukoza	A	T1	295	51	81	141,5	2,02	2,05	2,9	2,9	1,2	0	1
39	6395	96	65	E	1	Submukoza	A	T1	394	32	80,2	143,4	2,12	2,05	11	2,1	0,7	0	1
40	6439	96	39	K	1	Noninfiltratif	0	Ta	214	33	96,7	158,9	2,1	2,05	7,3	6,1	0,4	0	1
41	6830	97	54	E	1	Submukoza	A	T1	267	29	95,5	174,9	2,12	2,05	13,5	3	0	0	1
42	10736	97	71	E	1	Submukoza	A	T1	188	38	80	180	2,75	2,45	44,4	21,2	6,6	4,2	3

Tablo-8 : Grade III DEHK olgularının sitomorfometrik ölçüm sonuçları

SIRA NO	PROTOKOL NO	YIL	YAŞ	CİNS	DERECE	İNVAZYON	JEWETT	TNM	Tümör hücre sayısı	Referans hücre sayısı	NA ORT	NA 10	DNA indeksi	DORUK DNA	> 2.5c	> 3c	> 4c	> 5c	AUER HISTOGRAMI
1	10005	96	56	E	3	Kas			355	104	57,1	118,6	2,73	2,45	44,2	18,9	12,4	2,4	3
2	1331	96	65	E	3	Derin kas	B2	T3a	185	56	116,2	270,1	2,76	2,95	53,1	24,4	13,2	9,9	3
3	11091	96	80	E	3	Perivez. yağ	C	T3b	269	38	113,2	277,2	3,18	2,05	63,5	44,3	22,4	12,7	3
4	1430	95	61	K	3	Kas			205	50	101,9	205	2,98	3,55	63,1	57,6	9,8	5,8	3
5	2270	95	73	E	3	Kas			374	53	87,3	266,2	3,03	2,25	34,4	29,2	21,3	10	3
6	2479	97	65	E	3	Kas			154	31	90,2	178,4	2,38	2,05	20,3	16,9	4,2	1,2	1
7	2485	95	64	E	3	Submukoza	A	T1	261	24	102,1	231,3	2,73	2,15	38,9	28,4	18,9	4,5	3
8	2994	95	66	E	3	Kas			385	27	61,2	151,1	2,56	2,45	43,7	14,8	5,6	1,9	3
9	3431	95	82	K	3	Derin kas	B2	T3a	359	94	76,6	177,3	2,83	2,05	49,2	32	12,6	5,9	3
10	4335	95	81	E	3	Submukoza	A	T1	184	76	103,1	222,2	3,3	1,95	51,9	50,4	23,1	12,7	4
11	4912	96	64	E	3	Kas			256	38	107,6	215,5	4,03	1,55	75,2	74,2	59,2	26,5	4
12	652	95	72	E	3	Kas			323	51	48,8	102,4	2,18	2,05	17,1	8	1,6	0,3	1
13	7043	97	54	K	3	Submukoza	A	T1	234	42	84,8	182,5	2,27	2,15	9,1	5,4	2,9	1,8	1
14	7209	97	68	E	3	Kas			299	52	131,4	208,4	2,05	2,25	4	2	0,6	0	1
15	863	95	72	E	3	Kas			275	114	97,6	209,8	2,51	1,85	35,2	27,9	6,8	2,9	3
16	73	95	65	E	3	Yüzeyel kas	B1	T2	416	131	117,8	232,9	2,92	2,45	52,1	22,9	15,7	6,5	3
17	897	96	69	E	3	Submukoza	A	T1	256	30	149,3	275,9	3,4	3,85	73,4	66,4	21,7	4,9	2
18	9311	95	61	E	3	Kas			346	48	64	139,9	2	1,95	2,5	1,8	1,2	0	1
19	9345	95	56	E	3	Submukoza	A	T1	305	46	53,5	109,1	2,13	2,05	11,1	8,3	0,9	0,3	1
20	9492	95	?	E	3	Kas			198	32	133,1	235,9	3,5	1,65	62,6	58,3	39,6	13,5	4
21	3892	97	79	E	3	Submukoza	A	T1	346	44	134	246,7	3,5	4,05	74,6	70,7	41,3	1	2
22	2948	95	57	E	3	Submukoza	A	T1	114	47	99,8	209,4	2,22	1,55	21,6	10,2	5,4	2,4	1
23	1224	98	67	E	3	Kas			172	29	75	155	2,74	2,45	53,7	25,4	8,5	3	3

Tablo-9 : Grade IV DEHK olgularının sitomorfometrik ölçüm sonuçları

SIRA NO	PROTOKOL NO	YIL	YAŞ	CİNS	DERECE	İNVAZYON	JEWETT	TNM	Tümör hücre sayısı	Referans hücre sayısı	NA ORT	NA 10	DNA indeksi	DORUK DNA	>2.5c	>3c	>4c	>5c	AUER HISTOGRAMI
1	10286	95	63	E	4	Kas			249	81	101,7	202,3	2,43	2,15	31,2	13	4,5	0,6	3
2	10522	95	76	E	4	Submukoza	A	T1	211	72	114,3	202	2,39	1,85	25,1	16,9	4,9	2,1	3
3	1421	96	74	E	4	Derin kas	B2	T3a	256	59	111,8	236	3,17	2,05	57,7	53,9	15,2	8,8	4
4	1641	95	65	E	4	Kas			252	49	106,9	222,1	2,35	2,15	26,2	18,6	3,6	1,3	3
5	3591	96	57	E	4	Kas			309	27	85,3	174,3	2,55	2,15	43,2	14,3	2,7	1,5	3
6	3631	96	66	E	4	Derin kas	B2	T3a	327	20	112,1	238,5	3,88	3,55	79,3	74,6	29,7	20,1	4
7	4104	96	62	E	4	Kas			214	56	139,9	296,5	2,85	2,65	62,9	29,6	16,7	7,8	4
8	9310	95	81	E	4	Derin kas	B2	T3a	230	155	101,9	221,2	2,34	2,05	19,6	11	6	1,7	3
9	7698	97	35	E	4	Kas			276	71	84,9	208,4	2,85	2,25	55,5	26,1	13,7	4,7	3
10	3924	97	65	E	4	Kas			259	15	202,5	422,3	3,13	2,65	70,1	35,6	24,2	9,6	4

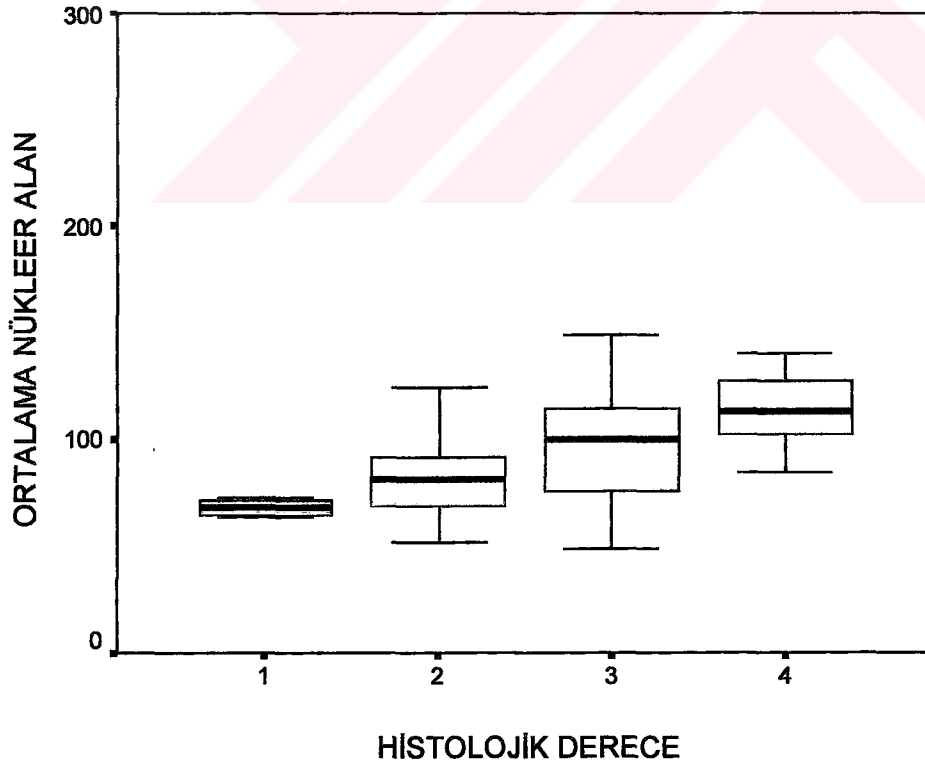
Tüm olguların histolojik derecelerine göre ONA ve NA 10 değerleri tablo-10' da gösterilmiştir (Şekil-3,4).

Tablo-10 : Olguların histolojik derecelerine göre ONA ve NA 10 değerleri

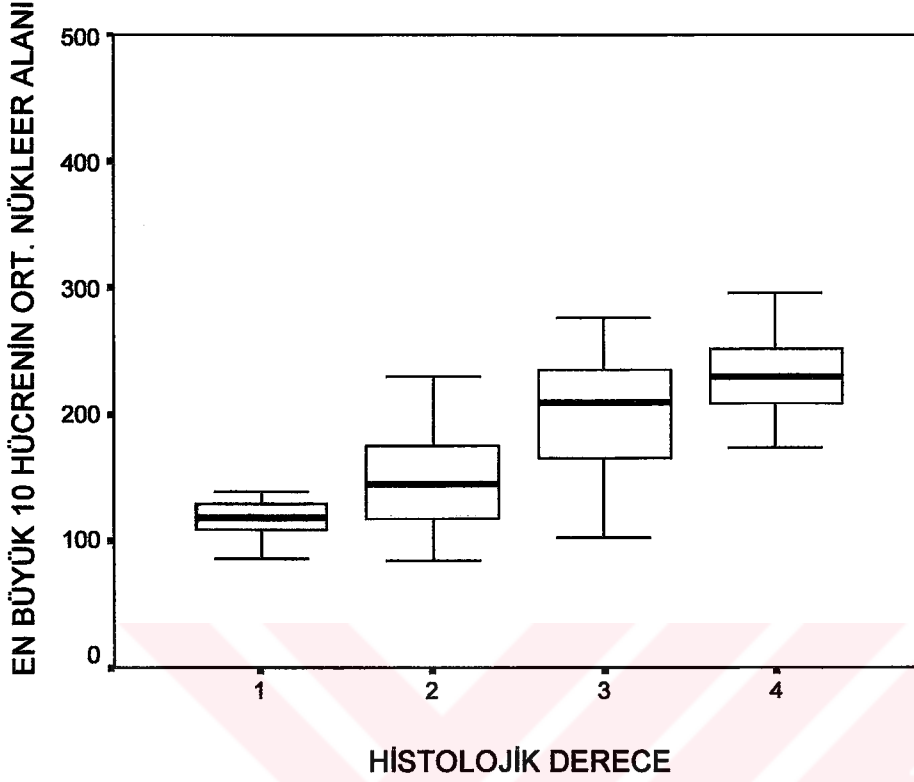
	Grade I		Grade II		Grade III		Grade IV	
n	11		42		23		10	
	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS
ONA	71.8	19.8	83.6	26.2	95.9	27.9	116.1	34.1
NA10	118.1	15.4	149.2	38.1	200.9	52.7	242.3	70.9

n: olgu sayısı, ort: ortalama, SS: standart sapma, ONA: ortalama nükleer alan, NA10: en büyük 10 hücrenin ortalama nükleer alanı

Şekil-3 : Olguların histolojik derecelerine göre ortalama nükleer alanları



Şekil- 4 : Olguların histolojik derecelerine göre en büyük 10 hücrenin ortalama nükleer alanları



Kruskal-Wallis varyans analizi ile 4 grubun (histolojik derece) ONA ve NA 10 ortalamasının farklı olduğu (her iki parametre için $p=0.0001$) saptanmıştır. Bu farklılığın hangi gruplar arasından kaynaklandığının saptanması için Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Grade I ile II (ONA için $p=0.059$, NA 10 için $p=0.051$) ve grade III ile IV (ONA için $p=0.180$, NA 10 için $p=0.123$) arasında ne ONA ne de NA 10 yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak, grade II ile III arasında ONA açısından belirgin bir fark ($p=0.027$) bulunmazken, NA 10 yönünden belirgin bir farklılığın ($p=0.0001$) bulunduğu dikkati çekmektedir (Tablo-11).

Tablo-11 : ONA ve NA 10 sonuçları yönünden histolojik dereceler arasındaki istatistiksel farklar

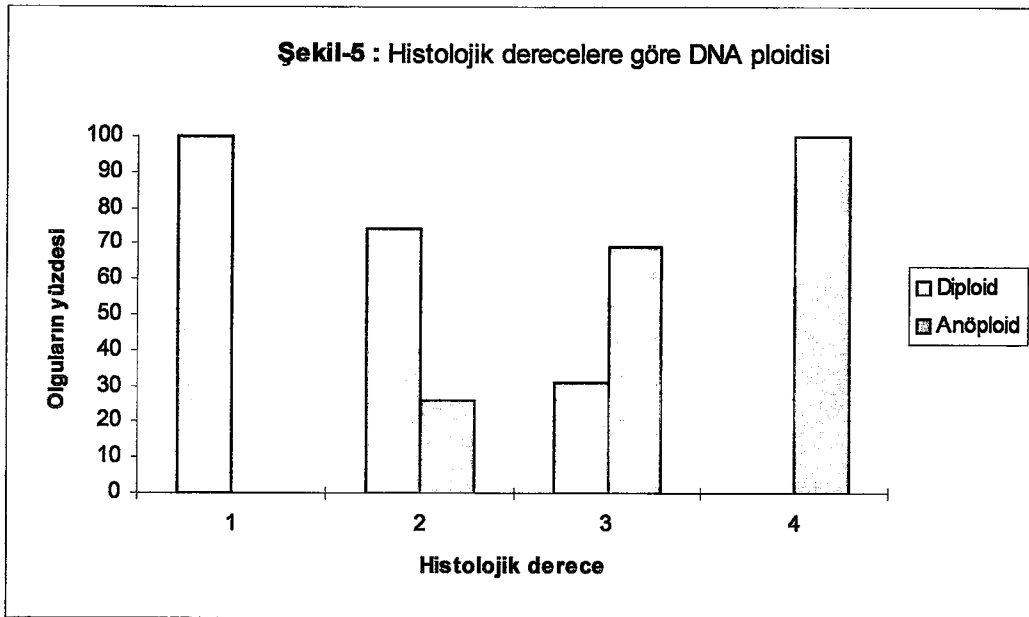
	1 ile 2	2 ile 3	3 ile 4
ONA	p=0.059	p=0.027*	p=0.180
NA 10	p=0.051	p=0.0001*	p=0.123

*istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.05)

Olgular DNA ploidi yönünden değerlendirildiğinde, grade I olguların tamamının diploid olduğu görülmektedir. Grade II olguların 31'i diploid, 11'i anöploid, grade III olguların ise 7'si diploid, 16'sı anöploiddir. Grade 4 olguların ise tamamı anöploiddir (Tablo- 12, Şekil-4).

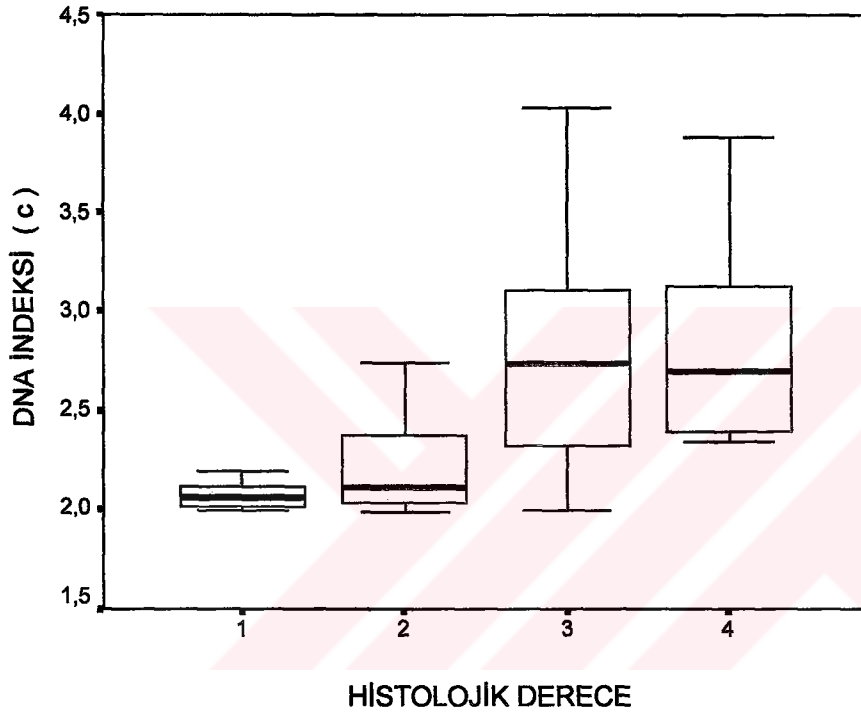
Tablo-12 : Olguların histolojik derecelerine göre DNA ploidi değerleri

Histolojik derece	DNA ploidi (olgu sayısı)	
	Diploid	Anöploid
1	11	-
2	31	11
3	7	16
4	-	10
Toplam	49	37



Olgular, DNA indeksleri yönünden değerlendirildiğinde, grade I ile II ($p=0.056$) ve grade III ile IV arasında anlamlı bir fark ($p=0.923$) saptanmamıştır. Ancak, grade II ile III arasında DNA indeksi yönünden belirgin bir fark ($p=0.0001$) göze çarpmaktadır (Şekil-5, Tablo-13).

Şekil-5 : Olguların histolojik derecelere göre DNA indeksleri



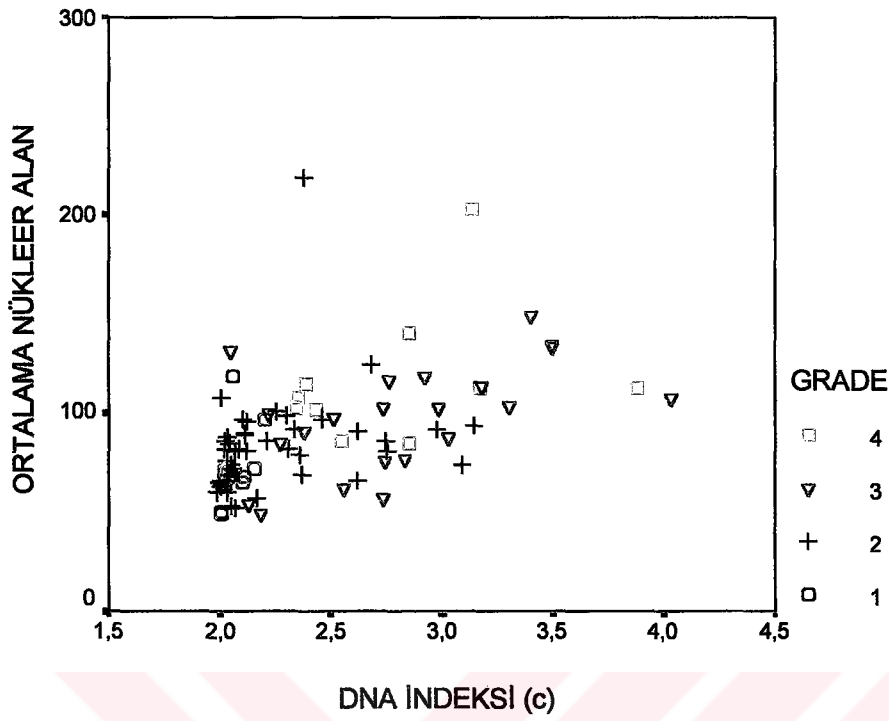
Tablo-13 : DNA indeksi yönünden histolojik dereceler arasındaki istatistiksel farklar

	1 ile 2	2 ile 3	3 ile 4
DNA indeksi	$p=0.056$	$p=0.0001^*$	$p=0.923$

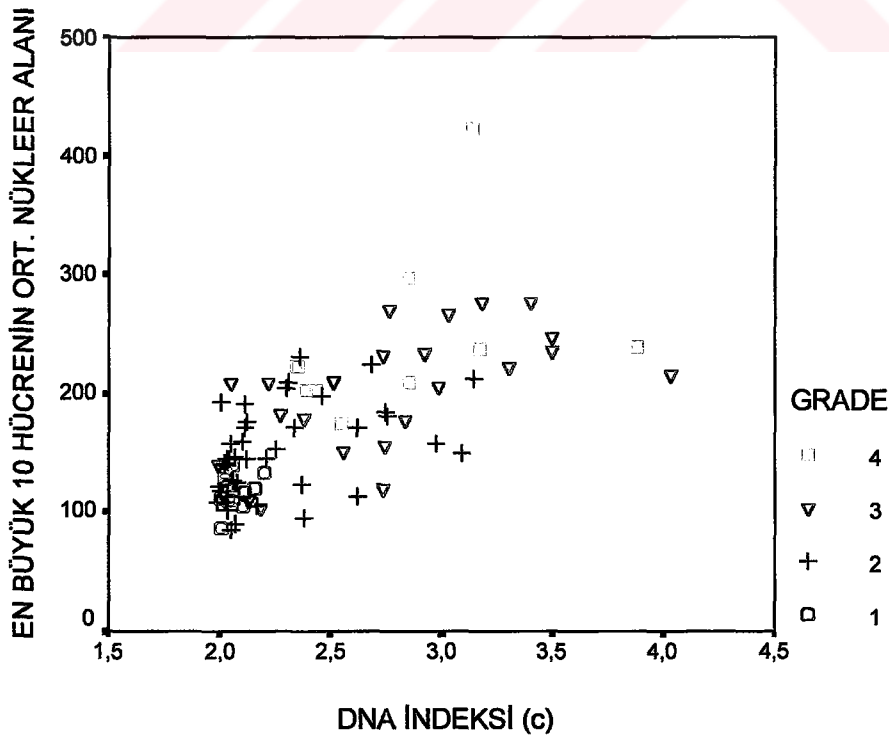
*istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.05$)

Bağıntı analizi ile ONA ve NA 10'nun DNA indeksi ile ilişkisi incelendiğinde; NA 10'nun DNA indeksi ile belirgin derecede ($r= 0.650$) pozitif bağıntılı olduğu görülmektedir. ONA'nın DNA indeksi ile ilişkisi ($r= 0.486$) daha düşüktür (Şekil-6,7).

Şekil-6 : DNA indeksi ve ortalama nükleer alan ilişkisi ($r=0.486$)



Şekil-7: DNA indeksi ve en büyük 10 hücrenin ortalama nükleer alanı arasındaki ilişki ($r=0.650$)



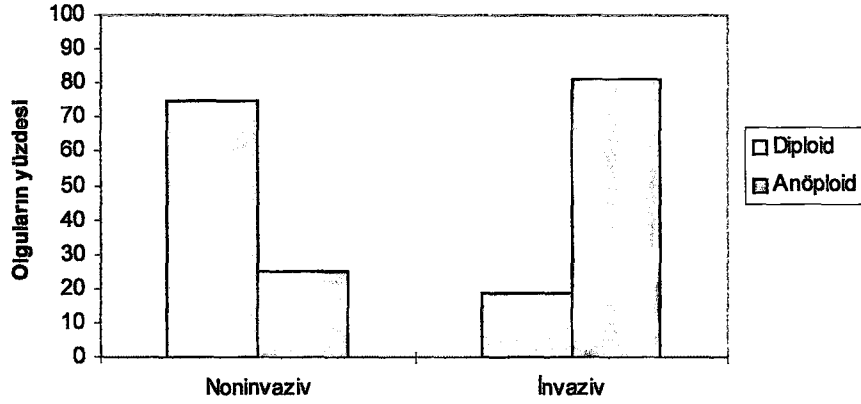
Sitomorfometrik ve DNA ölçüm değerlerinin yaş ile ilişkisini araştırmak için olgular ortalama yaşa (ortalama yaş : 61) göre, 61'den küçük ve büyük olarak iki gruba ayrılmıştır. Daha sonra bu iki grup arasında ONA, NA 10 ve DNA indeksi bakımından fark bulunup bulunmadığını değerlendirmek için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Sonuç olarak yaş ile ilişki değerlendirildiğinde ONA için $p= 0.015$, NA 10 için $p= 0.003$ ve DNA indeksi için ise $p= 0.0001$ olarak bulunmuştur.

İnvazyon ile sitomorfometrik ve DNA ölçüm değerlerinin ilişkisini belirleyebilmek için olgular kasa invazyon olan ve olmayanlar olarak iki gruba ayrılmıştır. Daha sonra bu iki grup arasında ONA, NA 10 ve DNA indeksi bakımından fark bulunup bulunmadığını değerlendirmek için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Sonuç olarak invazyon ile ilişki değerlendirildiğinde ONA için $p= 0.04$, NA 10 için $p= 0.0001$ ve DNA indeksi için ise $p= 0.0001$ olarak bulunmuştur. Kas tabakasına invazyon bulunan 27 olgunun 22'sinin (%81) anöploid olduğu saptanmıştır. Kas tabakasına invazyon bulunmayan 59 olgunun ise 15'inin (%25) anöploid olduğu görülmektedir(Tablo-14, Şekil-8).

Tablo-14 : Kas tabakasına invazyona göre olguların DNA plöidisi

Grade	Kas tabakasına invazyon yok 59		Kas tabakasına invazyon var 27	
	Diploid	Anöploid	Diploid	Anöploid
I	11	-	-	-
II	30	10	1	1
III	3	4	4	12
IV	-	1	-	9
Toplam	44	15	5	22

Şekil-8 : Kas tabakasına invazyona göre olguların DNA plöidisi



Çalışmamızdaki toplam 86 olgudan 6'sı, 9 ay - 18 ay sonra yinelemiştir. Bu olgulardan üçünün histolojik derecesi II olup yüzeysel karsinomalardır. Kasa invazyon gösteren diğer üç olgudan 2'si grade III, diğeri grade IV DEHK'dır. Bu olguların altısı da anöplöid olup 5'inin Auer histogramı tip 3, birinin ise tip 4'dür. Olgulardan dördünün ONA ve NA 10 değerleri ortalamanın üzerindedir (Tablo-15).

Tablo-15 : Yineleyen DEHK olgularının sitomorfometrik ölçüm sonuçları

SIRA NO	PROTOKOL NO	YIL	YAŞ	CİNS	DERECE	İNVAZYON	JEWETT	TNM	Tümör hücre sayısı	Referans hücre sayısı	NA ORT	NA 10	DNA indeksi	DORUK DNA	>2.5c	>3c	>4c	>5c	AUER HİSTOGRAMI
1	857	98	52	E	2	Norinfiltratif	0	Ta	173	43	96,3	197,8	2,46	1,85	35,7	11,8	6,1	2,4	3
2	1640	96	68	E	2	Submukoza	A	T1	248	35	65,2	112,5	2,62	2,15	38,5	28,2	15,1	2,1	3
3	8597	98	67	E	2	Submukoza	A	T1	209	43	90	170	2,62	2,55	50	10,7	6,1	2,5	3
4	1224	98	67	E	3	Kas			172	29	75	155	2,74	2,45	53,7	25,4	8,5	3	3
5	7688	97	35	E	4	Kas			276	71	84,9	208,4	2,85	2,25	55,5	26,1	13,7	4,7	3
6	3924	97	65	E	4	Kas			259	15	202,5	422,3	3,13	2,65	70,1	35,6	24,2	9,6	4

TARTIŞMA VE SONUÇ

Mesaneinin değişici epitel hücreli karsinoması, farklı biyolojik davranış ve malignite potansiyeline sahip heterojen bir neoplazidir (1,20). Bu nedenle, tümörün malignite potansiyeliyle ilişkili morfolojik özelliklerini değerlendiren, farklı histolojik dereceleme sistemleri geliştirilmiştir (20). Ancak, bu histolojik dereceleme sistemlerinin subjektif olması nedeniyle, yinelenebilirliğinin düşük olduğu görölmektedir (3,50). 1973 yılında, Dünya Sağlık Örgütü patoloğlar arasında histolojik derecelemede uyumu artırmak amacıyla, standardize rehber kriterler yayınlamıştır (20). Buna rağmen çalışmalar hem aynı patoloğun tekrarlayan derecelemelerinde hem de farklı patoloğlar arasındaki histolojik derecelemelerde uyumsuzluğun bulunduğunu göstermiştir (3,20,49).

Son yıllarda, morfometrinin mesaneinin değişici epitel hücreli karsinomalarının derecelemesinde objektif ve yinelenebilir bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır (1,4,6,50). Farklı evrelerdeki DEHK olgularının klinik gidişleri ile selektif nükleer morfometrik ölçüm sonuçları arasında yakın bir ilişki saptanmıştır (4). Bu tez çalışmasında; görüntü analizi kullanılarak mesaneinin DEHK'larının nükleer morfometrik özellikleri ve DNA ploidiisi incelenmiş bunların klasik prognostik faktörler ile ilişkisi araştırılmıştır. Ayrıca, bu nükleer morfometrik özellikler ile nüks olasılığı arasındaki ilişki incelenmiştir.

Akım sitometrisi çalışmalarında da, DEHK'ların histolojik derecesi ve evresi ile nükleer DNA miktarı arasında belirgin ilişkinin bulunduğu gösterilmiştir (6). Bununla birlikte, akım sitometrisinin bir problemi tümör dışı hücreleri çalışmanın dışında tutamamasıdır. Bu durum, özellikle küçük tümör

odakları için problem oluşturmaktadır. Çok az sayıda anöplöid hücre içeren olgularda, akım sitometrisinin rezolusyonu bu hücreleri saptamak için yetersiz kalmaktadır (1).

Görüntü analizi ise bu sorunlara çözüm bulabilmektedir. Görüntü analizi ile ölçüm sırasında ve sonrasında, hücreler tek tek kontrol edilebilmekte ve artefaktlar bilgisayar ile giderilebilmektedir. Ayrıca, çok az sayıdaki anormal hücreler de saptanabilmektedir. Ölçüm sırasında, her olgu için internal kontrollerin saptanması ölçümün doğruluğu hakkında sağlıklı bilgi vermektedir. Normal diploid populasyonun saptanması için yaklaşık 50 kadar kontrol hücresi ölçmek gerekmektedir (1). Internal kontrol olarak granülositler, lenfositler, normal fibrositler ve endotel hücreleri seçilebilmektedir (1). Ancak optik yoğunlukları değişeceğinden kontrol olarak çalışma boyunca tek tip hücre seçmek gerekmektedir. Örneğin bir olgu için lenfositler kontrol grubu olarak seçilmiş ise bunların aralarında endotel hücreleri bulunmamalıdır (1).

Bu çalışmada, optik yoğunluklarının varyasyon katsayısı %8'in altında olan lenfositler veya endotel hücreleri internal kontrol olarak seçilmiştir. Ancak, özellikle küçük nükleuslu tümör olgularında, kontrol hücresi seçimi yapılırken neoplastik hücreler ile lenfositler arasında ayırım bazen zor olmaktadır. Aynı zamanda, piknotik görünümlü, koyu boyanmış lenfositlerin optik yoğunluklarının gerçekte olduğundan daha düşük sonuç verdiği görülmektedir. Bu durum görüntü analizi yönteminde kullanılan donanımlardan kaynaklanmaktadır (1). Çalışmada, bu tür hücrelerin seçilmemesine dikkat edilmiştir.

Görüntü analizinde Feulgen ile boyanmış nükleuslarda nükleer morfolojik ölçümler ve DNA ploidi çalışmaları yapılabilmektedir. Bu çalışmada da, olgulara ait nükleer morfolojik parametreler ve DNA ploidi değerleri veri olarak elde edilmiştir. Ayrıca, çalışmanın niteliğine göre “texture” parametreleri de çalışılabilir. Bu çalışmada, nükleus süspansiyonu hazırlanırken dokunun asidik ortamda hidrolize olması nedeniyle Feulgen boyası ile nükleer detay her zaman çok iyi gösterilemediğinden “texture” parametreleri çalışılmamıştır.

Görüntü analizi yöntemiyle ölçümü yapılan hücrelerin görüntüleri saklanabildiği için, istenildiği zaman hücrelerin morfolojik özellikleri yeniden gözden geçirilebilmekte ve aynı preparat ile ölçüm tekrarlanabilmektedir. Akım sitometrisinde ise hangi hücrelerin ölçüme alındığı tam olarak bilinmemekte ve aynı örnek ile ölçüm tekrar edilememektedir. Bu çalışmada her olgu için yapılan ölçümler elektronik ortamda arşivlenmiş ve gerektiğinde ölçümler tekrar gözden geçirilmiştir.

Bu çalışmada, görüntü analizi ile her bir olgunun ölçümü için geçen süre, 15 dakika ile 45 arasında değişmektedir. Zemin boyanmasının fazla olduğu ya da üst üste binmiş hücrelerin fazla bulunduğu preparatlarda ve hiposellüler örneklerde, ölçüm süresi uzamaktadır.

Görüntü analizinin akım sitometrisine göre daha fazla zaman alması, tespit ve boyanın ileri derecede standardizasyonunu gerektirmesi ve ploidi doruklarının az sayıda hücreden oluşması kullanılan bu yöntemin dezavantajlarıdır (1).

Görüntü analizi için 5-7 mikron kalınlığında histolojik kesitler, biyopsilerden elde edilen nükleus süspansiyonları, sitolojik yaymalar,

sitosantrifüj örnekleri ve taze dokulardan yapılan dokundurma-kazıma preparatları kullanılabilmektedir (20). Histolojik kesitlerde DNA ploidi analizi çalışması sırasında istenilen alanın seçilebilmesi, bir avantaj gibi görünse de; kesit artefaktı, DNA yorumunu güçleştirmektedir. Kesitlerde, küçük uniform hücreler büyük anaplastik hücrelere göre daha çok bulunacağından DNA histogramı sola kaymakta ve yanlış değerlendirmelere yol açmaktadır (20). Bu nedenle histolojik kesitlerde genellikle DNA ploidi analizi yapılmamaktadır. Fakat, hematoksilin-eozin ile boyalı histolojik kesitler, nükleer morfolometrik ölçümler için kullanılabilmektedir.

Sitolojik örnekler ve taze dokulardan yapılan dokundurma-kazıma preparatları, kesilmiş hücreler yerine tam nükleuslar içerdiğinden, DNA analizi için en sık kullanılan örneklerdir. DNA analizi için kullanılan bir diğer materyal, parafin bloklardan hazırlanan nükleus süspansiyonlarıdır. Bu tez çalışmasında, DNA analizi için parafin bloklardan hazırlanan nükleus süspansiyonları kullanılmıştır.

Parafin bloklardan nükleus süspansiyonu hazırlamak için temelde birbirine benzer bir çok yöntem tanımlanmıştır. Bu yöntemlerin en kritik aşaması dokunun parçalanması bölümüdür. Ayrılma yeterli olmadığında, hücreler tek tek ayrılmamakta ve bu nedenle değerlendirme yapılamamaktadır. Dokuların nükleus süspansiyonu haline getirilip yayma olarak hazırlanması sırasında bir çok artefakt meydana gelmektedir. Bunlardan en sık görüleni, nükleer membranın bozularak nükleus morfolojisinin değişmesidir. Bu artefakt, yüksek hızda santrifügasyona ve uzun süre pepsin solüsyonunda tutmaya bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Yüksek hızda santrifüj yapmadan da, yeterli sayıda nükleusun bulunduğu

süspansiyon elde edilebilmektedir. Dokunun pepsin solüsyonunda tutulma süresi, dokunun niteliğine göre 30 dakika ile 2 saat arasında değişmektedir. Bu tez çalışmasında, mesanenin DEHK ları için en uygun sürenin 50 dakika olduğu saptanmıştır. Pepsin solüsyonunun stabilizasyonu çok çabuk kaybolduğundan, solusyonun hazırlandığı gün kullanılması gerekmektedir.

Feulgen boyaması sırasındaki 1 saatlik hidrolize ek olarak, nükleus süspansiyonu hazırlanması sırasında da dokuların 50 dakikalık asit ortamda pepsine maruz kalması gerekmektedir. Asidik ortamda geçen bu ek süre sırasında, DNA bazen aşırı hidrolize olmakta ve sonuçta, nükleus beklenenden açık renkte boyanmaktadır. Bu problemi bir ölçüde gidermek için, nükleus süspansiyonlarından görüntü analizi ile elde edilen DNA indekslerinde matematik manipulasyon gerekmektedir (20). Bu çalışmada da, düzeltme faktörünün hesaplanması için diploid alandaki tümör hücrelerinin ortalama DNA indeksi, referans hücrelerinin DNA ortalamasına bölünmüş ve elde edilen katsayı programda kullanılarak olguların DNA indeksleri saptanmıştır.

Nükleer DNA miktarının belirlenmesinde en sık kullanılan boyama yöntemi Feulgen reaksiyonudur (45). Bu reaksiyonda, boya aşamalarından olan asit hidroliz basamağında pürin-deoksiriboz bağları koparılarak reaktif aldehid grupları açığa çıkarılır. Bu aldehid grupları daha sonra Schiff "reagent"i ile boyanarak ölçüme hazır hale gelir. Feulgen yöntemi ile yalnızca DNA boyandığı için preparatlardaki diğer hücresel yapılar ve artefaktların morfometrik incelemeyi güçleştirmesini önlemek amacıyla da bu yöntem uygulanmaktadır. Boya reaktivitesini etkileyen birçok faktörden bazıları

şunlardır : pH, ortam sıcaklığı, sülfür dioksit konsantrasyonu, yıkama solüsyonunda tutma süresi.

Ortam sıcaklığı ideal boyanmanın olabilmesi için $22\pm0,5$ C'de sabit tutulmalıdır. Sıcaklıktaki $\pm0,5C$ 'nin üzerindeki oynamalar, süreye de bağlı olarak, boyanabilir DNA miktarını %15-20 oranında değiştirebilmektedir. Bu nedenle, çalışmanın yapıldığı laboratuarda klima kullanılarak $22\pm0,5C$ ortam sıcaklığı sağlanmıştır. Sonucu etkileyen bir başka faktör de ortam pH'sıdır. Bu yöntem özellikle kantitatif ölçüm için kullanıldığında önem kazanır.

Tümörün büyüme hızının; mitotik aktivitede artış, DNA anöploidisi ve pleomorfizm ile ilişkili olduğu şeklindeki temel bilgilerimiz DEHK'lar için de geçerlidir (4). Bunu morfometrik ölçümlerle de göstermek için bir çok çalışma yapılmıştır (4,5,7,34,36,37,38,39,42,50). Lipponen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hematoksilen-eozin ile boyalı kesitlerde rastgele seçilen 50 hücrenin nükleer alanını ölçülmüş ve DEHK'larda histolojik derece ile nükleus büyüklüklerinin değiştiği bulunmuştur (39). Bloomjous ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, yine hematoksilen-eozin ile boyalı kesitlerde, en çok atipi gösteren alanlarda en büyük 10 hücrenin nükleer alanı ölçülmüş ve histolojik derece ile nükleer alanın arttığı saptanmıştır (6). Histolojik olarak en atipik görünümlü alanların ve büyük hücrelerin seçimi nedeniyle, bu morfometrik yöntemde subjektivite bilinçli olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında ise, her olgu için ölçülen tüm hücrelerin nükleer alanlarının ortalamasının alındığı ortalama nükleer alan (ONA) ve en büyük 10 hücrenin ortalama nükleer alanı (NA 10) olmak üzere iki farklı yöntemle nükleer alan ölçülmüştür. Ash sistemine göre yapılan histolojik derecelemeyle ONA ve NA 10 ilişkisi incelendiğinde, grade arttıkça

nükleer alanın da arttığı saptanmıştır (Tablo-10, şekil-3,4). Histolojik dereceler arasında nükleer alan açısından fark bulunup bulunmadığına bakıldığında, grade II ile grade III arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunduğu görülmektedir. Bu fark özellikle NA 10'da ($p=0.001$) çok belirgindir. Bu çalışmadaki NA 10 ölçümü; her olgu için süspansiyonda ölçülen tüm hücreler içindeki en büyük 10 hücrenin ortalama nükleer alanını göstermektedir. Dolayısıyla, histolojik kesitlerde en atipik görünümlü alanlardaki büyük nükleuslu hücrelerin ölçümünün yapıldığı benzer yöntemle göre daha objektif ve yinelenebilir olduğu düşünülebilir. Grade I ile II ve grade III ile IV arasında ne ONA ne de NA 10 açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Morfometrik yöntemler ile yapılan nükleer alan ölçümlerine göre DEHK'lar derecelenmeye çalışılmıştır (6,34,35). İkili dereceleme sisteminde, derecelemenin yeterliliği % 90 iken, üçlü sistemde % 80 civarında olduğu saptanmıştır (34,36,38). Bu çalışmadaki ONA ve NA 10 sonuçları büyük oranda örtüşmekle birlikte, grade II ve III arasında özellikle NA 10 ölçümlerinde çok az örtüşme bulunmaktadır (Şekil-4). İstatistiksel olarak da, tablo-11'de gösterilen bu bulgu, NA 10 ölçümü ile DEHK'ların sitomorfometrik olarak ikiye ayrılabilirliğini göstermektedir. Kaynaklarda morfometri ile üçlü yerine ikili dereceleme gruplarının kullanılmasının daha uygun olacağı tartışılmakta ve klinik açıdan da bu şekilde basit bir sınıflandırmanın daha etkili tedavi yaklaşımına yol açacağı belirtilmektedir (6,34). Özellikle NA 10 ölçümüne dayalı morfometrik ayırım, bu çalışmada kullanılan nükleus süspansiyonu yöntemiyle daha belirgin hale gelmiştir ($p=0.0001$). Çalışmamızda, olguların DNA indeksi ile histolojik dereceleri

karşılaştırıldığında elde edilen sonuç da, morfometrik olarak ikili derecelemeyle desteklemektedir (Tablo-13, şekil-5).

WHO'nun histolojik dereceleme sistemine göre yapılan çalışmalarda, morfometrik parametreler ile grade II tümörlerin iki gruba ayrıldığı saptanmıştır (9,35). Grade II (WHO) karsinomaların geniş bir spektrum içinde yer aldığı ve bazılarının grade I, bazılarının ise grade III karsinomalara benzediği gösterilmiştir (6). Kaynaklarda Ash histolojik dereceleme sistemine göre yapılan çalışma bulunmamaktadır. Ancak, çalışmamızda Ash sisteminin morfometrik derecelemeyle daha uyumlu olduğu, grade I ve II tümörlerin genellikle küçük nükleuslu, III ve IV tümörlerin genellikle daha büyük nükleuslu hücrelerden oluştuğu görülmektedir (Şekil-3,4 Tablo-10).

Bir çok farklı histolojik dereceleme sisteminde, ilerlemiş tümör dereceleri için nükleer alanın büyümesinin majör kriter olduğu görülmektedir. Sitogenetik ve akım sitometrisi çalışmaları, ilerlemiş malignitelerdeki bu nükleer büyümenin anormal nükleer DNA miktarı ile birlikte olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu ilişki, kombine karyometrik ve DNA fotositometrik çalışmalar ile de gösterilmiştir (6). Bu tez çalışmasındaki olgular DNA ploidi yönünden değerlendirildiğinde; grade I olguların tamamının diploid olduğu görülmektedir. Grade II olguların 31'i diploid, 11'i anöplöid, grade III olguların ise 7'si diploid, 16'sı ise anöplöiddir. Grade 4 olguların ise tamamı anöplöiddir (Tablo-12, Şekil-5). Kaynaklarla uyumlu olarak, düşük dereceli (grade I, WHO) DEHK'ların diploid, yüksek dereceli tümörlerin (grade III, WHO) ise anöplöid olduğu görülmektedir.

Agresif tümör davranışının göstergesi olan nükleer boyutta artış, aynı zamanda tümör evresiyle de ilişkili görünümündedir (6). Çalışmamızda, kas

tabakasına invazyon gösteren DEHK'ların, yüzeysel tümörlere göre (TA ve T1) daha büyük nükleuslu olduğu saptanmıştır . Özellikle NA 10'nun invazyon ile ilişkisi çok belirgin ($p= 0.0001$) olup ONA' da bu ilişki ($p= 0.04$) daha düşüktür ($p<0.05$). DNA indeksi ile invazyon arasında da belirgin bir ilişki ($p= 0.0001$) mevcut olup kasa invazyon gösteren olguların çoğunun anöploid olduğu görülmektedir. Çalışmamızda kas tabakasına invazyon bulunan 27 olgunun 22'sinin (%81) anöploid olduğu saptanmıştır. Kas tabakasına invazyon bulunmayan 59 olgunun ise 15'inin (%25) anöploid olduğu görülmektedir (Tablo-14 , Şekil-8). Bu durum, invazyon derecesi arttıkça DEHK ların DNA ploidisinin anöploid yöne kaydığını göstermektedir.

Olguların sitomorfometrik ve DNA ölçüm değerlerini ortalama yaşa (61) göre karşılaştırdığımızda; 61 yaşından büyük olguların tümörlerindeki nükleusların, 61 yaşından küçüklere göre daha büyük olduğu görülmektedir (ONA için $p= 0.015$, NA 10 için $p= 0.003$). Benzer şekilde 61 yaşından büyük olguların tümörlerinin DNA indeksinin, 61 yaşından küçüklere göre daha yüksek olduğu görülmektedir ($p= 0.0001$). Tümör hücrelerinin büyüklüğünün ve DNA indekslerinin yaş ile arttığını gösteren bu bulgu, yaşlılardaki tümörlerin daha ileri evrelerde saptanmış olmasına bağlanabilir.

Nielsen ve arkadaşlarının çalışmalarına göre özellikle en büyük 10 hücrenin nükleer alanının (NA10) anöploidi ile ilişkili olduğu ve NA 10'nın yineleme olasılığını belirlediği saptanmıştır (5,35). Bu tez çalışmasında, DNA indeksi ile nükleer alan ilişkisi incelendiğinde NA 10'nın DNA indeksi ile belirgin derecede pozitif bağıntılı ($r= 0.650$) olduğu görülmektedir (Şekil-7). DNA indeksi ile ONA arasında ise daha düşük derecede pozitif bağıntı

($r= 0.486$) mevcuttur (Şekil-6). Bu bulgu, DEHK olgularının prospektif değerlendirmesinde ONA yerine NA10'un kullanımının daha yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Bazı nükleer morfometrik parametrelerin prognoz ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (4,6,21,35). Lipponen ve arkadaşlarının, multiparametrik analizler kullanarak yaptıkları morfometrik bir çalışmada, kullanılan parametrelerden, nükleer alan ve nükleer alanın standart sapmasının prognoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır (35). Aynı çalışmada, nükleer alanın standart sapmasının, progresyonu belirleme olasılığının nükleer alana göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (35). Primer tümörün sitomorfometrisinin, progresyon ve yineleme gösterebilecek çevre mukozanın eğilimi konusunda da belirleyici olduğu bildirilmiştir (6). Derin kas tabakasına invazyon gösteren DEHK'larda, Borland ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 150 hücrenin nükleer alanı ölçüldüğünde, nükleer alan ile prognoz arasında belirgin ilişki saptanmıştır (7). Buna dayanarak, sistektomiye takiben adjuvan kemoterapi alacak hastaların belirlenmesinde nükleer morfometrinin yararlı olacağı belirtilmiştir (7).

Blomjous ve arkadaşlarının bir çalışmasında, sitomorfometrinin önemi, grade II (WHO) karsinomali hastaları iki farklı prognostik gruba ayırarak gösterilmiştir. Bu hastaların, ortalama nükleer alan ölçümü ile 5 yıllık yaşam süresi grade I karsinomalar gibi (% 100) olan ve 5 yıllık yaşam grade III karsinomalar kadar süresi (% 63.2) olan tümörler olmak üzere iki alt gruba ayrıldığı saptanmıştır (6). Başka çalışmalarda ise anöploid tümörlerin, diploid tümörlere göre 5 yıllık yaşam sürelerinin daha kısa ve yineleme oranlarının da yüksek olduğu bulunmuştur (4,20). Bizim çalışmamızda ise 86 olgudan

6'sının 9 ay ile 18 ay sonra yinelediği saptanmıştır. Yineleyen 6 olgunun 3'ü yüzeysel , geri kalan 3'ü ise kas tabakasına invazyon gösteren DEHK'lardır. Bu olguların tamamı anöploid tümörlerdir. Kaynaklarda, yüzeysel karsinomalarda anöploidinin yineleme açısından risk faktörü oluşturduğu belirtilmektedir (4). Çalışmamızda yineleyen 6 olgunun tamamının anöploid olması, kaynaklardaki bu çalışmaların sonuçlarını desteklemekte ve DNA analizinin rutin olarak kullanımının gerekli olduğunu düşündürmektedir.

Genel olarak, anöploid DNA değerlerine sahip tümörlerin, invazyon derecesinin ve yineleme oranının, diploid tümörlere göre daha yüksek olduğu bilinmektedir (13,20). Dolayısıyla, anöploidinin önemi özellikle yüzeysel karsinomalarda ortaya çıkmaktadır. On sekizi noninfiltratif, 41'i submukozaya infiltre toplam 59 yüzeysel karsinoma olgumuzdan 15'i anöploiddir. Bu anöploid yüzeysel karsinomalardan 10'unun grade II, 4'ünün grade III ve birinin grade IV olduğu görülmektedir. Yineleyen 6 olgumuzdan 3'ünün grade II yüzeysel karsinoma olgusu olduğuna dikkat edilecek olursa, progresyon ve yineleme açısından risk oluşturması nedeniyle anöploidi gösteren yüzeysel karsinomaların klinik olarak daha sıkı takibi ve agresif tedavisi gerektiği düşünülebilir (Tablo-15).

Kaynaklarda prognozla ilgili yapılan çalışmaların hepsi retrospektif niteliktedir (36). Retrospektif çalışmalarda, bireysel tedavi, evre ve histolojik dereceleme gibi bir çok faktör sonuçlar üzerine etki etmektedir.

Bu tez çalışmasında, hastaların takiplerindeki standardizasyon eksikliği ve retrospektif çalışmalarda sözü edilen faktörler nedeniyle prognostik değerlendirme yapılamamıştır. Morfometrik derecelemenin

prognoza etkisini doğru bir şekilde değerlendirebilmek için prospektif klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasının sonuçları şu şekilde özetlenebilir;

- DEHK'ların histolojik derecesi arttıkça tümör hücrelerinin nükleer alanının büyüdüğü görülmektedir. Özellikle, en büyük 10 hücrenin ortalama nükleer alanı (NA 10), histolojik dereceyle daha yakından ilişkilidir.

- DEHK'lar için sitomorfometrik olarak ikili dereceleme sistemi daha uygundur.

- Grade I (Ash) DEHK'ların tamamının diploid, yüksek dereceli tümörlerin (grade III, IV Ash) ise çoğunun anöloid olduğu saptanmıştır. Grade II (Ash) DEHK'ların ise daha heterojen bir grup (31'i diploid, 11'i anöloid) olduğu görülmektedir.

- Kas tabakasına invazyon gösteren DEHK'ların çoğunun (%81) anöloid ve büyük nükleuslu tümörler olduğu saptanmıştır.

- Yaşlılarda (ortalama yaş 61'den büyük olgular) ortaya çıkan DEHK'ların nükleer alanı büyük ve DNA indeksi daha yüksektir.

- Nükleer alan ile DNA indeksi belirgin derecede pozitif bağıntılıdır (NA 10 için $r = 0.650$).

- Yüzeyel karsinomalarda anöloidi ve büyük nükleus, tümörün yineleme yapabileceğinin bir göstergesi olabilir.

- Bulgularımız, DEHK'larda nükleer alan ölçümünün (özellikle NA10) ve DNA analizinin hastaların daha iyi izlenmesi ve tedavi edilmesini sağlamada yararlı olacağını belirten kaynak verilerini desteklemektedir.

ÖZET

Mesane kanserleri, tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen morbidite ve mortalite yönünden önemli bir problem oluşturmaktadır. Farklı biyolojik davranış ve malignite potansiyeline sahip olan bu heterojen neoplazi için farklı histolojik dereceleme sistemleri geliştirilmiştir. Ancak, bu histolojik dereceleme sistemlerinin subjektif olması nedeniyle, derecelemenin yinelenebilirliğinin düşük olduğu görülmektedir. Transüretral rezeksiyona rağmen yüzeysel mesane kanserlerinin önemli bir kısmında nüks gelişmekte ve olguların %15-20'si kas tabakasına invazyon gösteren yüksek dereceli kanserlere dönüşmektedir. Histolojik dereceleme bu olguların baştan belirlenebilmelerini saptamada yetersiz kalmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, görüntü analizi yöntemlerini kullanarak, mesanenin 86 değişici epitel hücreli karsinoma olgusunda nükleer morfolometrik özelliklerini ve DNA ploidisini incelemek ve bu parametrelerin klasik prognostik faktörler ile ilişkisini araştırmaktır. Ayrıca, çalışmada bu parametreler ile nüks olasılığı arasındaki ilişki de incelenmiştir.

Sonuç olarak; en büyük 10 nükleusun ortalama nükleer alanının ve DNA ploidisinin klasik prognostik parametreler ile belirgin olarak ilişkili olduğu saptanmıştır. DEHK'lar için sitomorfometrik olarak ikili histolojik dereceleme sisteminin daha uygun olduğu görülmektedir. Yüzeysel karsinomalarda, morfolometrik parametreler ve DNA ploidi hastaların prognoz açısından farklı gruplara ayrılmasını saptamada katkı sağlayabilmektedir.

SUMMARY

Carcinomas of the bladder cause important problems of mortality and morbidity despite diagnostic and therapeutic improvements. A variety of grading systems have been developed to reflect the different biologic behavior and malignant potential of this heterogeneous neoplasm. However, these histologic grading systems are subjective and reproducibility is low. In spite of transurethral resection, an important number of superficial bladder cancer relapse and 15-20% of these transform into high grade cancers invading muscle layer. Histologic grading is insufficient in the detection of these cases at the time of diagnosis.

The aims of this study are to study nuclear morphometric features and DNA ploidy status of 86 cases of transitional cell bladder carcinomas and to evaluate the relationship of these parameters with the conventional prognostic factors using image analysis methods. The relationship between these parameters and likelihood of relapse have also been investigated.

In conclusion, the mean nuclear area of the 10 largest nuclei and DNA ploidy status have been shown to be significantly correlated with conventional prognostic factors. Cytomorphometrically, a binary grading system seems more suitable for transitional cell carcinoma of the bladder. For superficial carcinomas; morphometric parameters and DNA ploidy analysis can be helpful in the separation of the patients into prognostically different groups.

KAYNAKLAR

1. Baak, J.P.A. : Manual Of Quantitative Pathology In Cancer Diagnosis And Prognosis. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1991.
2. Badalament, R. A., Hermansen, D. K., Kimmel, M., Gay, H., Herr, H. W., Fair, W. R., Whitmore, W. F., Melamed, M. R. : The Sensitivity Of Bladder Wash Flow Cytometry, Bladder Wash Cytology And Voided Cytology And Voided Cytology In The Detection Of Bladder Carcinoma. Cancer 60: 1423-1427, 1987.
3. Blomjous, E.C.M., Smeulders, A.W.M., Baak, J.P.A., Vos, W., Van Galen, C. M., Meijer, C.J.L.: A Comparative Study in Morphometric Grading of Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. Anal. Quant. Cytol. Histol. 11:426-432, 1989.
4. Blomjous, E.C.M., Schipper, N.W., Baak, J.P.A., Vos, W., Voogt, H.J., Meijer, C.J.L.: The Value Of Morphometry And DNA Flow Cytometry In Addition To Classic Prognosticators In Superficial Bladder Urinary Carcinoma. Am. J. Clin. Pathol. 91:243-248, 1989.
5. Blomjous, E.C.M., Schipper, Vos, W., N.W., Baak, J.P.A., Voogt, H.J., Meijer, C.J.L.M.: Comparison of Quantitative and Classic Prognosticators in Urinary Bladder Carcinoma . Virchows Archiv. A. Pathol. Anat. 415:421-428, 1989.
6. Blomjous, E.C.M., Vos, W., Schipper, N.W., Uyterlinde, A.M., Baak, J.P.A., Voogt, H.J., Meijer, C.J.L.: The Prognostic Significance Of Selective Nuclear Morphometry In Urinary Bladder Carcinoma. Hum. Pathol. 21: 409-413, 1990.

7. Borland, R.N., Partin, A.W., Epstein, J.I., Brendler, C.B.: The Use Of Nuclear Morhometry In Predicting Recurrence Of Transitional Cell Carcinoma. J. Urol. 149: 272-275, 1993.
8. Carbin, B. E., Ekman, P., Gustafson, H., Christensen, N. J., Sandstedt, B., Silfversward, C. : Grading Of Human Urothelial Carcinoma Based On Nuclear Atypia And Mitotic Frequency. I. Histologic Description. J. Urol. 145: 968-971, 1991.
9. Carbin, B. E., Ekman, P., Gustafson, H., Christensen, N. J., Sandstedt, B., Silfversward, C., Sandstedt, B. : Grading Of Human Urothelial Carcinoma Based On Nuclear Atypia And Mitotic Frequency. II. Prognostic Importance. J. Urol. 145: 972-976, 1991.
10. Cardo, C.C., Wartinger, D.D., Melamed, M.R., Fair, W., Fradet, Y. : Immunopathologic Analysis Of Human Urinary Bladder Cancer. Am. J. Pathol. 140: 375-385, 1992.
11. Cardo, C. C., Reuter, V. E. : Alterations Of Tumor Suppressor Genes In Bladder Cancer. Semin. Diag. Pathol. 14: 123-132, 1997.
12. David, E. N. , Mellon, K. : Epidermal Growth Factor Receptor And Bladder Cancer: A review. Urol. Int. 48: 365-371, 1992.
13. De Vita, R., Forte, D., Maggi, F., Eleuteri, P., Silverio, F. : Cellular DNA Content And Proliferative Activity Evaluated By Flow Cytometry Versus Histopathological And Staging Classifications In Human Bladder Tumors. Eur. Urol. 19: 65-73, 1991.
14. Eble, N. J., Young, R. H. : Carcinoma Of The Urinary Bladder : A Review Of Its Diverse Morphology. Semin. Diag. Pathol. 14: 98-108, 1997.

15. Epstein, J. L., Amin, M. B., Reuter, V. R., Mostofi, F. K. : The World Health Organisation / International Society Of Urological Pathology Consensus Classification Of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms Of The Urinary Bladder. *Am. J. Surg. Pathol.* 22: 1435-1448, 1998.
16. Esrig, D., Spruck, C. H., Nichols, P. W., Chaiwun, B., Steven, K., Groshen, S., Chen, S., Skinner, D. G., Jones, P. A., Cote, R. J. : p53 Nuclear Protein Accumulation Correlates With Mutations In The p53 Gene, Tumor Grade , And Stage In Bladder Cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* 143: 1389-1397, 1993.
17. Esrig, D., Elmajian, D., Groshen, S., Freeman, J. A., Stein J. P., Chen, S., Nichols, P. W., Skinner D. G., Jones, P. A., Cote, R. J. : Accumulation Of Nuclear p53 And Tumor Progression In Bladder Cancer. *N. Eng. J. Med.* 331: 1259-1264, 1994.
18. Fitzpatrick, J. M., Reda, M. : Bladder Carcinoma In Patients 40 Years Old Or Less. *J. Urol.* 135: 53-54, 1986.
19. Foresman, W. H., Messing, E. M.: Bladder Cancer: Natural History, Tumour Markers And Early Detection Strategies. *Semin. Surg. Oncol.* 13: 229-306, 1997.
20. Forte, J.D., Croker, B.C., Hendricks, J.B.: Comparison Of Histologic And Cytologic Specimens Of Urothelial Carcinoma With Image Analysis. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.* 19:158-166, 1997.
21. Fukuzawa, S., Hashimura, T., Sasaki, M., Yamabe, H., Yoshida, O.: Nuclear Morhometry For Improved Prediction Of The Prognosis Of Human Bladder Carcinoma. *Cancer* 76: 1790-1796, 1995.

22. Glick, S. H., Howell, L. P., White, R. W. D. : Relationship Of P53 And Bcl-2 To Prognosis In Muscle Invasive Transitional Cell Carcinoma Of The Bladder. *J. Urol.* 155: 1754-1757, 1996.
23. Gospodarowicz, M.K. : Staging Bladder Cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 10: 51-59, 1994.
24. Hall, R. R.: Superficial Bladder Cancer. *BMJ* 308: 910-3, 1994.
25. Helander, K., Kirkhus, B., Iversen, O.H., Johansson, S.L., Nilsson, S., Vaage, S., Fjordvang, H.: Studies On Urinary Bladder Carcinoma By Morphometry, Flow Cytometry, And Light Microscopic Malignancy Grading With Special Reference To Grade II Tumours. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 408: 117-126, 1985.
26. Hendricks, J.B., Wilkinson, E.J., Pharis, P.J., Sapi, Z., Braylan, R. C.: Quantitative Morphologic Assessment Of Nuclei Extracted From Paraffin For DNA Flow Cytometry. *Mod. Pathol.* 6: 565-569, 1993.
27. Johansson, S. L., Cohen, S. M., : Epidemiology And Etiology Of Bladder Cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 13: 291-298, 1997.
28. Jones, A. P., Droller, M. J., : Pathways Of Development And Progression In Bladder Cancer : New Correlations Between Clinical Observations And Molecular Mechanisms. *Semin. Urol.* 11: 177-192, 1993.
29. Kaubisch, S., Lum, B. L., Reese, J., Freiha, F., Torti, F. M. : Stage T₁ Bladder Cancer : Grade Is The Primary Determinant For Risk Of Muscle Invasion. *J. Urol.* 146: 28-31, 1991.
30. Kruger, S., Muller, H.: Correlation Of Morphometry, Nucleolar Organizer Regions, Proliferating Cell Nuclear Antigen And Ki57 Antigen Expression

With Grading And Staging In Urinary Bladder Carcinomas. Br. J. Urol. 75: 480-484, 1995.

31.Lapham, R. L., Ro, J. Y., Staerckel, G. A., Ayala, A. G. : Pathology Of Transitional Cell Carcinoma Of The Bladder And Its Clinical Implications. Semin. Surg. Oncol. 13: 307-318, 1997.

32.Lapham, R. L., Grignon, D., Ro, J. Y. : Pathologic Prognostic Parameters In Bladder Urothelial Biopsy, Transurethral Resection And Cystectomy Specimens. Semin. Diag. Pathol. 14: 109-122, 1997.

33.Limas C., Lange P., : A, B, H Antigen Detectability In Normal And Neoplastic Urothelium, influence of Methodologic Factors. Cancer 49: 2476-2484, 1982.

34.Lipponen, P., Simpanen, H., Pesonen, E., Eskelinen, M., Sotarauta, M., Collan, Y.: Potential Of Morphometry In Grading Transitional Cell Carcinoma Of The Bladder. Path. Res. Pract. 185: 617-620, 1989.

35.Lipponen, P., Eskelinen, M.: Nuclear Morphometry In Grading Transitional Cell Bladder Cancer Compared With Subjective Histological Grading. Anticancer Res. 10: 1725-1730, 1990.

36.Lipponen P.K., Eskelinen M.J., Sotarauta M.: Prediction Of Superficial Bladder Cancer By Histoquantitative Methods. Eur J Cancer 26: 1060-1063, 1990.

37.Lipponen, P.K., Collan, Y., Eskelinen, M.J., Pesonen, E., Sotarauta, M., Nordling, S.: Comparison Of Morphometry And DNA Flow Cytometry With Standard Prognostic Factors In Bladder Cancer. Br. J. Urol. 65: 589-597, 1990.

- 38.Lipponen, P.K., Kosma, V. M., Collan, Y., Kulju, T., Kosunen, O., Eskelinen, M.: Potential of Nuclear Morphometry and Volume-Corrected Mitotic Index in Grading Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. *Eur. Urol.* 17: 333-337, 1990.
- 39.Lipponen, P. K., Collan, Y., Eskelinen, M. J., Pesonen, E., Sotarauta, M.: Morphometry in Human Transitional Cell Bladder Cancer (Nuclear Area and Standard Deviation of Nuclear Area-Relation to Tumor Grade (WHO) and Prognosis). *Eur. Urol.* 17: 155 -159, 1990.
- 40.Lipponen, P.K.: The Prognostic Value Of Basement Membrane Morphology, Tumour Histology And Morphometry In Superficial Bladder Cancer. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 119: 295-300, 1993.
- 41.Lipponen, P. K., Eskelinen, M. J., Jauhiainen, K., Harju, E., Terho, R.: Tumour Infiltrating Lymphocytes as an Independent Prognostic Factor in Transitional Cell Bladder Cancer. *Eur. J. Cancer.* 29A: 69 -75, 1993.
- 42.Lipponen, P.K.: Stereologically Measured Nuclear Volume In Comparison To Two-Dimensional Nuclear Morphometry, Mitotic Index And Flow Cytometry In Predicting Disease Outcome In Bladder Cancer. *Anticancer Res.* 13: 529-532, 1993.
- 43.Lower, G. M. : Concepts In Causality: Chemically Induced Human Urinary Bladder Cancer. *Cancer* 49: 1056-1066, 1982.
- 44.Medina, S. G. D., Chopin, D., Marjou, A. E., Delovee, A., Rochelle, W. J. L., Hoznek, A., Abbou, C., Aaronson, S. A., Thiery, J. P. : Decreased Expression Of Keratinocyte Growth Factor Receptor In A Subset Of Human Transitional Cell Bladder Carcinomas. *Oncogene* 14: 323-330, 1997.

45. Mikel, U., Geissel, A., Griffin, J., Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology, AFIP, Washington, 1994, 114-127.
46. Murphy, W. M.: Current Status Of Urinary Cytology In The Evaluation Of Bladder Neoplasms. Hum. Pathol. 21: 886-896, 1990.
47. Murphy, M. M., Beckwith, J. B., Farrow G. M. : Tumors Of The Kidney, Bladder, and Related Urinary Structures, Third series, fascicle 11, AFIP, Bethesda, Maryland, pp. 193-248, 1994.
48. Neal, E.D., Mellon K., : Epidermal Growth Factor Receptor And Bladder Cancer (A Review). Urol. Int.. 48: 365-371, 1982.
49. Ooms, E.C.M., Anderson, W. A. D., Alons, C.L., Boon, M.E, Veldhuizen, R.W.: Analysis of the Performance of Pathologists in the Grading of Bladder Tumors. Hum. Pathol. 14:140-143, 1983.
50. Ooms, E.C.M., Kurver, P.H.J., Veldhuizen, R.W., Alons, C.L., Boon, M.E.: Morphometry Grading Of Bladder Tumors In Comparison With Histologic Grading By Pathologists. Hum. Pathol. 14:144-150, 1983.
51. Orntoft, T. F., Nielsen, M. J. S., Wolf, H., Olsen, S., Clausen, H., Hakomori, S., Dabelsteen, E. : Blood Group ABO And Lewis Antigen Expression During Neoplastic Progression Of Human Urothelium. Cancer 60: 2641-2648, 1987.
52. Pagano, F., Garbeglio, A., Milano, C., Bassi, P., Pegoraro, V. : Prognosis Of Bladder Cancer. I. Risk Factors In Superficial Transitional Cell Carcinoma. Eur. Urol. 13: 145-149, 1987.
53. Pauwels, R. P. E., Smeets, A. W. G., Schappers, R. F. M., Geraedts, J. P. M., Debruyne, F. M. J. : Grading In Superficial Bladder Cancer (1) Morphological Criteria. Br. J. Urol. 61: 129-134, 1988.

54. Pauwels, R. P. E., Smeets, A. W. G., Schappers, R. F. M., Geraedts, J. P. M., Debruyne, F. M. J. : Grading In Superficial Bladder Cancer (2) Cytogenetic Classification. Br. J. Urol. 61: 135-139, 1988.
55. Reuter, V. E.: Urinary Bladder and Ureter . Histology for Pathologists, (Ed) Sternberg, S. S., Newyork, Raven Press 1992, 709-719.
56. Rosai, J. (Ed) Ackerman's Surgical Pathology, 7th Edition Vol 1, Washington, Mosby, 1995, 1195-1203.
57. Russell, P. J., Brown, J. L., Grimmond, S. M., Raghavan, D. : Molecular Biology Of Urological Tumours. Br. J. Urol. 65: 121-130, 1990.
58. Sowter, C., Slavin, G., Sowter, G., Hendry, W.: Morphometry Of Bladder Carcinoma: Morphometry And Grading Complement Each Other. Anal. Cell. Pathol. 3: 1-9, 1991.
59. Srinivas, V., Khan, S. A., Hoisington, S., Varma, A., Gonder M. J.: Relationship Of Blood Groups And Bladder Cancer. J. Urol. 135: 50-52, 1986.
60. Stephenson, W. T., Holmes, F. F., Noble, M. J., Gerald, K. B. : Analysis Of Bladder Carcinoma By Subsite, Cytoscopic Location May Have Prognostic Value. Cancer 66: 1630-1635, 1990.
61. Tachibana, M., Degucci, N., Jitsukawa, S., Baba, S., Hata, M., Tazaki, H. : Quantification Of Cell Kinetic Characteristics Using Flow Cytometric Measurements Of DNA And Bromodeoxyuridine For Bladder Cancer. J. Urol. 145: 963-67, 1994.
62. Tan, L. B., Chang, C, Huang, C. H., Lin, L. M. : Detection Of Blood Group Surface Antigens Of Urinary Bladder Tumours Using Monoclonal

Antibodies With The Avidin-Biotin Complex Technique. Int. J. Urol. Nephrol. 24:255-264, 1992.

63.Tyrkus, M., Powell, I., Fakr, W. : Cytogenetic Studies Of Carcinoma In Situ Of The Bladder : Prognostic Implications. J. Urol. 148: 44-46, 1992.

64.Witjes, J.A., Kiemeney, L.A.L.M., Oosterhof, G.O.N., Debruyne, F.J.M. : Prognostic Factors In Superficial Bladder Cancer. Eur. Urol. 21 :89-97, 1992.

65.Wojcik, E.M., Miller, M.C., O'Dowd, G.J., Robert, W.V.,: Value Of Computer-Assisted Quantitative Nuclear Grading In Differentiation Of Normal Urothelial Cells From Low And High Grade Transitional Cell Carcinoma. Analyt. Quant. Cytol. Histol. 20:69-75,1998.

66.Wolf, H. : Prognostic Factors In Bladder Carcinoma. Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl. 138: 153-160, 1991.

67.Young, R. H., Eble, J. N. : Unusual Forms Of Carcinoma Of The Urinary Bladder. Hum. Pathol. 22: 948-65, 1991.

**T.C. YÖNEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**