

YÜZEYEL MESANE TÜMÖRLERİNDE P53, BCL-2 VE CD34 DÜZEYLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE DEĞERLENDİRİLMESİ VE NÜKSÜ ÖNGÖRMEDEKİ DEĞERLERİ
IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF P53, BCL-2 AND CD34 LEVELS AND PREDICTIVE VALUES ON RECURRENCE IN SUPERFICIAL BLADDER TUMORS

Gökhan FAYDACI*, Fatih TARHAN*, Bilal ERYILDIRIM*, Mücahit KORUR*, Aylin Ege GÜL**, Uğur KUYUMCUOĞLU*

* Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Üroloji Kliniği, İSTANBUL

** Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği, İSTANBUL

ABSTRACT

Introduction: Factors effecting progression and recurrence in superficial bladder cancers were evaluated and various results about importance of these factors have been reported. We evaluated the levels of P53, bcl-2 and CD34 by immunohistochemical method and predictive values of them on recurrence in superficial bladder cancers.

Materials and Methods: 66 patients with primary superficial bladder cancer included in the study. Patients were divided into 2 groups: Group 1 with recurrence (n=36) and Group 2 (n=30) without recurrence. Initial pathology specimens were examined and Bcl-2, mutant p53 and CD34 levels were determined by immunohistochemical staining by one pathologist.

Results: Mean ages of 36 recurrent patients were 65.59±1.96 and 30 nonrecurrent patients were 62.46±2.11 years respectively. In recurrent group, Ta and T1 tumors were detected in 16 (44%) and 20 (56%) patients, respectively. In this group, low grade tumors were detected in 27 patients (75%) and high grade tumors in 9 patients (25%). In nonrecurrent group, Ta and T1 tumors were detected in 14 (47%) and 16 (53%) patients, respectively. In this group, low grade tumors were detected in 24 patients (80%) and high grade tumors in 6 patients (20%). In nonrecurrent group, mean follow-up time of patients was 37.39±3.75 months (25-60 months).

Immunohistochemical staining with anti P53 antibody and anti bcl-2 antibody were found to be statistically significant in predicting recurrence in superficial bladder tumor (p<0.05). However, microvascular density, detected by using CD34 antibody with immunohistochemical method was not statistically significant in predicting recurrence (p>0.05).

Conclusion: Abnormal immunostaining of P53 and bcl-2 by immunohistochemical method can be used for prediction of recurrences in superficial bladder cancer. However, immunohistochemical analysis method should be standardized according to objective criteria.

Key words: P53, Bcl-2, CD34, Bladder, Tumor

ÖZET

Yüzeyel mesane tümörlerinde nüks ve progresyonu etkileyen etkenler araştırılıp, çeşitli çalışmalar yapılarak önemleri hakkında değişik sonuçlar yayınlanmıştır. Biz çalışmamızda yüzeyel mesane tümörlerinde immünhistokimyasal yöntemle bcl-2, mutant p53 ve CD34 düzeylerinin nüksü öngörmedeki rolünü araştırdık.

Primer yüzeyel mesane tümörü tanısı konulan 66 hasta çalışmaya alındı. Hastalar nüks eden (n=36) ve nüks etmeyen (n=30) olmak üzere iki grup halinde değerlendirildi. Hastaların bcl-2, mutant p53 ve CD34 düzeyleri, immünhistokimyasal yöntem ile ilk rezeksiyon materyalleri tek patoloji uzmanı tarafından incelenerek tespit edildi.

Nüks gelişen 36 hastanın yaş ortalaması 65.59±1.96, nüks gelişmeyen 30 hastanın yaş ortalaması 62.46±2.11 idi. Nükseden grupta; 16 (%44) hastada Ta, 20 (%56) hastada T1 tümör saptandı. Bu hastaların 27'sinde (%75) düşük derece, 9'unda (%25) yüksek derece tümör vardı. İzlemlerinde nüks gözlenmeyen grupta ise; 14 (%47) hastada Ta, 16 (%53) hastada T1 tümör saptandı. Bu grupta; düşük dereceli 24 hasta (%80), yüksek dereceli 6 hasta (%20) vardı. Nüks gelişmeyen grupta hastaların ortalama takip süresi 37.39±3.75 ay (25-60 ay) idi.

Anti p53 antikoru ve anti bcl-2 antikoru ile immünhistokimyasal boyanma yüzeyel mesane tümöründe nüksü öngörme açısından anlamlı bulundu (p<0.05). Ancak immünhistokimyasal yöntemle anti CD34 antikoru kullanılarak hesaplanan mikrovasküler yoğunluk nüksü öngörme konusunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05).

YÜZEYEL MESANE TÜMÖRLERİNDE P53, BCL-2 VE CD34 DÜZEYLERİ (P53, Bcl-2 and Cd34 Levels in Superficial Bladder Tumors)

Yüzeyel mesane tümörlerinde, immünohistokimyasal yöntem ile p53 ve bcl-2 anormal immunboyanması nüksü öngörmeye kullanılabilir. Ancak immünohistokimyasal değerlendirme tekniğinin patoloji uzmanının subjektif yorumundan uzaklaştırılarak standart hale dönüştürülmesi ve raporların objektif kısıtlara göre yazılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: P53, Bcl-2, CD34, Mesane, Tümör

GİRİŞ

Mesane tümörlerinin yaklaşık %70'i yüzeyel tümör olup, bunların %10-20'si progresyon götserip kasa invaziv hale gelir. Yüzeyel tümörlerin %70'i Ta, %20'si T1 ve %10'u CIS evresindedir¹. Nüks ya da progresyon gösterecek mesane kanserlerini önceden belirleyebilecek kesin prognostik etkenler yoktur. Bununla birlikte yüksek evre, kötü diferansiyasyon derecesi, karsinoma in situ varlığı, tümör çapı ve tümör sayısının nüks riskini arttırdığı bilinmektedir. Bu etkenlerin prognostik değerleri hakkında fikir birliği oluşmasına karşın, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni ölçütlere hala gerek duyulmaktadır.

Sıkça söz edilen yeni ölçütler; anjiyogenez, tümör supresor gen p53 ve apoptozu önleyici bir gen olan bcl-2'dir. Anjiyogenez için histolojik bir gösterge olan yüksek miktarda mikrovasküler yoğunluğun; invaziv mesane kanserlerini de içeren birçok tümörlerde kötü klinik seyir ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir². Ancak, yüzeyel mesane tümörlü hastalarda hastalığın seyri ile ilişkisi henüz net değildir³. Bir tümör supresor geni olan p53 ile yüksek dereceli, yüksek evreli ve kötü seyirli mesane tümörleri arasındaki ilişki birçok çalışmada vurgulanmıştır^{4,5}. Bcl-2, 18. kromozom üzerinde yerleşmiş apoptozu önleyici bir gendir⁶ ve mesane kanserlerinde bcl-2 ekspresyon düzeyi histopatolojik derece ile orantılı bulunmuştur.

Bu çalışmada retrospektif olarak yüzeyel mesane tümörlerinde immünohistokimyasal yöntem ile bir tümör supresor gen olan p53'ün, apoptotik aktiviteyi belirleyen bcl-2'nin ve anjiyogenezisi belirleyen CD34'ün ekspresyonlarının nüks ile olan ilişkisini araştırdık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 1999 ve Aralık 2005 tarihleri arasında kliniğimizde primer yüzeyel mesane tümörü tanısı konulan, en az 2 yıllık (25-60 ay) takipleri yapılan 66 hasta çalışmaya alındı. Bu hastalar nükseden (n=36) ve nüks etmeyen (n=30) olmak üzere iki grup halinde değerlendirildi ve hastalara çeşitli ne-

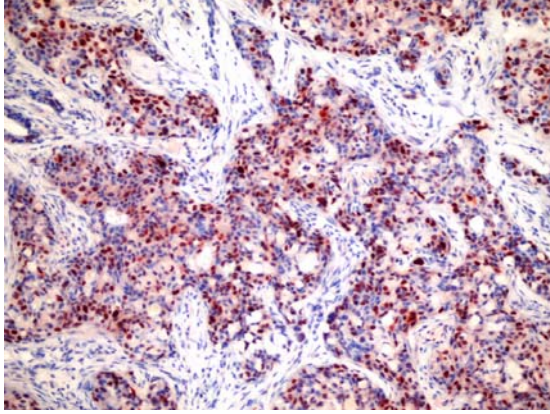
denlerle intravezikal ya da sistemik kemoterapi ve/veya immünoterapi uygulanmadı.

Histopatolojik olarak mesane tümörü tanısı konulan çalışma grubundaki tüm hastaların ilk rezeksiyon materyalleri değerlendirilerek hastalara ilk iki yıl içinde 3 ayda bir, sonraki iki yıl için 6 ayda bir ve daha sonra yılda bir olmak üzere sistoskopi yapıldı. Sistoskopi kontrollerinde şüpheli görülen lezyonlardan ve tümör tespit edilenlerden biyopsi alındı ya da TUR-Mesane tümörü yapıldı. Patoloji sonucu yüzeyel mesane tümörü gelen hastalar nüks kabul edildi. Kas invazyonu, lokal invazyon ya da metastaz saptanan hastalar ise progresyon olarak değerlendirildi⁷.

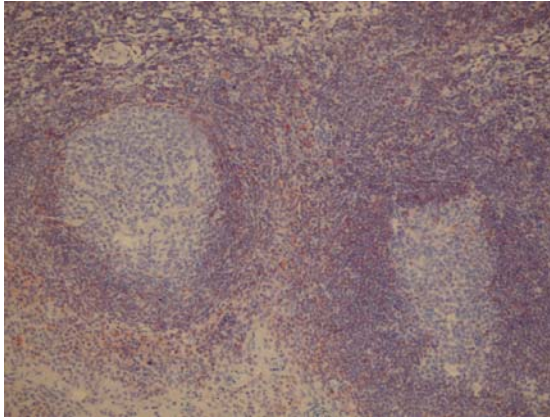
Hastalar yaş, cinsiyet, evre, CIS, derece, tümör çapı, tümör sayısı, ilk nükse kadar geçen zaman ve izlem süresi açısından değerlendirildi. Nükslerde; tümör varlığı histopatolojik olarak gösterildi.

Patoloji preparatları arşivden bulunarak tek patoloji uzmanı tarafından yeniden değerlendirildi. Değerlendirmede WHO/ISUP 1998'de tanımlanan derecelendirme sistemi⁸ ve U.I.C.C.'nin tanımladığı TNM sistemi kullanıldı⁹. Değerlendirmeler sırasında yeterli tümör yoğunluğu bulunan parafin bloklar immünohistokimyasal incelemede kullanılmak üzere seçildi.

Tümöre ait parafin bloklardan 3 mikron kalınlığında kesitler poly-L-lizin'li lamlara alındı. 37°C de 1 gece etüvde bekletildikten sonra ksilen ve dereceli alkollerden geçirilerek deparafinize edildi. Daha sonra mikrodalga fırında sitrat solüsyonu içinde antijen retrieval yapıldı. Boyama; primer antikolar (Bcl-2; Bcl-2α Ab-3, Clone 8C8, Mouse monoklonal, p53; p53 Ab-5, DO-7, Neo Markers, CD34; CD34, Mouse Monoclonal, Novo Castra) kullanılarak streptovidin biyotin alkalen fosfataz tekniğine göre yapıldı. Zıt boyama için mayer hemotoksilen kullanıldı. Pozitif kontrol olarak P53 için meme kanseri, Bcl-2 için tonsil, CD34 için ise tümördeki internal vasküler yapılar kullanıldı (Resim 1, 2). Negatif kontrol olarak primer antikör yerine PBS uygulandı.



Resim 1. Meme tümöründe P53 pozitif immunboyanma (p-53 pozitif kontrol)



Resim 2. Tonsil dokusu bcl-2 pozitif immunboyanma (bcl-2 pozitif kontrol)

Işık mikroskopunda kesitler incelendi ve kesitlerde boyanmanın en yaygın olduğu alanda 400 tümör hücresi sayılarak anti p53 antikor ile pozitif boyanma gösteren nükleusların oranı ve anti bcl-2 antikor ile pozitif boyanma gösteren sitoplazmaların oranı belirlendi. Pozitiflik oranları Wolf ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları şekilde¹⁰ 0-4 arasında değişen skala sistemiyle değerlendirildi. Bu sınıflamaya göre;

- 0: Hiç boyanmayanlar
- 1: %1-25 boyananlar
- 2: %26-50 boyananlar
- 3: %51-75 boyananlar
- 4: %76-100 boyananlar şeklindedir.

Farklı çalışmalarda immünohistokimyasal boyanmada eşik değeri; %5 alanlar¹¹, %22 alanlar¹²

ve herhangi bir boyanmayı da pozitif kabul eden çalışmalar olduğu görüldü¹³.

İmmün boyanma yoğunluğu da; Regiting ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları şekilde¹⁰ 0-3 arasında değişen skala ile değerlendirildi. Bu değerlendirmeye göre;

- 0: Boyanma yok
- 1: Boyanma hafif
- 2: Boyanma orta
- 3: Boyanma yoğun şeklindedir.

P53 antikor ile pozitif boyanma gösteren nükleusların oranı ve anti bcl-2 antikor ile pozitif boyanma gösteren sitoplazmaların oranı, Q skor (0-7) metodu kullanılarak semi-kantitatif olarak değerlendirildi¹⁰. Bu yöntem p53 ve bcl-2 ekspresyon düzeyleri yoğunluğu ve yaygınlığı skorlarını birleştirmektedir.

CD34 antikorları ile mikrovasküler yoğunluğun değerlendirilmesinde; kesitler 40X ve 100X büyütme ile taranarak, en yoğun vasküler yapının olduğu 3 alanda 400X (40Xx10X) büyütme ile sayım yapıldı. Sayım yapılırken lümen varlığı şartı olmaksızın, pozitif boyanma gösteren hücreler ve hücre kümeleri mikrovasküler yapı olarak değerlendirildi. Eritrosit varlığı damar sayımı için kriter olarak alınmadı. Preparattan elde edilen 3 alandaki mikrovasküler yoğunlukların ortalaması alınarak ortalama mikrovasküler yoğunluk elde edildi¹⁴.

Çalışmada elde edilen bulgular “ortalama± standart sapma” olarak verildi. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi, Prism 2,01 bilgisayar programı (Graphpad Software Inc) kullanılarak yapıldı. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde unpaired t, Mann Whitney U ve chi-square testleri kullanıldı. p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya transizyonel hücreli yüzeyel mesane tümörü tespit edilen 9 kadın, 57 erkek toplam 66 hasta alındı. Erkek-kadın oranı 6.3/1'dir.

Hastalar; nüks eden (Grup 1) ve etmeyen (Grup 2) olmak üzere iki grup halinde retrospektif olarak incelenerek grup 1'de 36 hasta, grup 2'de 30 hasta değerlendirildi. Grup 1'deki hastaların yaş ortalaması 65.59±1.96 (32-90); grup 2'deki hastaların yaş ortalaması 62.46±2.11 (45-81) idi.

*YÜZEYEL MESANE TÜMÖRLERİNDE P53, BCL-2 VE CD34 DÜZEYLERİ
(P53, Bcl-2 and Cd34 Levels in Superficial Bladder Tumors)*

Nüks eden grupta; 16 hastada (%44) Ta, 20 hastada (%56) T1 tümör saptandı. Bu hastaların 27'sinde (%75) düşük dereceli, 9'unda (%25) yüksek dereceli tümör vardı. Nüks gelişen grupta nüks kadar geçen süre ortalama olarak, 15.36 ± 2.43 ay (2-72 ay) tespit edildi. Takiplerinde nüks gözlenmeyen grupta ise; 14 hastada (%47) Ta, 16 hastada (%53) T1 tümör saptandı. Bu grupta; düşük dereceli 24 hasta (%80), yüksek dereceli 6 hasta (%20) vardı. Nüks gelişmeyen hastalar ortalama 37.39 ± 3.75 ay (25-60 ay) izlendi (Tablo 1). Hastaların hiçbirisinde CIS görülmedi.

Tablo 1. Hastaların yaş, evre, derece dağılımları		
	Nüks var (n:36)	Nüks yok (n:30)
Yaş ort.	65.59 $\pm$ 1.96	62.46 $\pm$ 2.11
Ta	16	14
T1	20	16
Düşük derece	27	24
Yüksek derece	9	6
Nüks Zamanı	15.36 $\pm$ 2.43 ay	-
İzlem Süresi	-	37.39 $\pm$ 3.75 ay

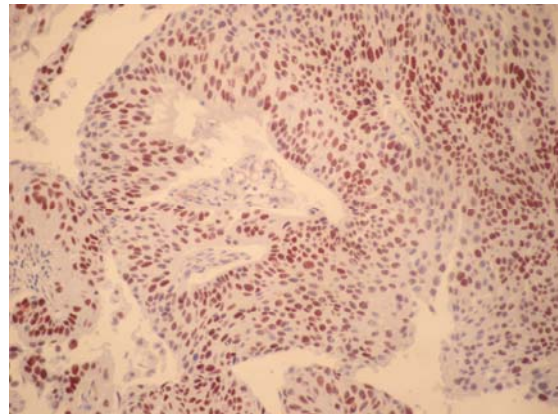
Tablo 2. Hastaların tümör çapına göre dağılımları			
	<3 cm	>3 cm	Tm. Çap ort.
Nüks var	16	20	3.71 $\pm$ 0.24 cm
Nüks yok	18	12	2.54 $\pm$ 0.29 cm
Toplam	34	32	-
p	p>0.05		p<0.05

Hastaların 34'ünde (%51.5) tümör çapı 3 cm'den küçük, 32'sinde (%48.5) 3 cm'den büyük bulundu. Tümör çapı 3 cm'den küçük olan 34 hastanın 16'sında (%47) nüks gözlenirken; 18'inde (%53) nüks gelişmedi. Ancak tümör çapı 3 cm'den büyük olan 32 hastanın 20'sinde (%62.5) nüks gözlenirken; 12'sinde (%37.5) nüks gelişmedi. Hastalar tümör çapı 3 cm'den küçük ve 3 cm'den büyük olanlar şeklinde gruplandırılarak nüks açısından istatistiksel analizleri yapıldığında, fark anlamlı bulunmadı (p>0.05). Ancak tümör çapı ortalaması; nükseden grupta 3.71 ± 0.24 cm nüks gözlenmeyen grupta 2.54 ± 0.29 cm olarak tespit edildi. Bu oranlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05) (Tablo 2).

Hastaların 33'ünde (%50) 1 adet tümör tespit edilirken; geri kalan 33'ünde (%50) 1'den fazla tümör tespit edildi. Tümör sayısı 1 olan 33 hastanın 17'sinde (%52) nüks saptanırken; 16'sında (%48) nüks saptanmadı. Tümör sayısı 1'den fazla olan 33 hastanın 18'inde (%55) nüks gelişirken; 15'inde (%45) nüks gelişmedi. Tümör sayısı 1'den fazla olan hastalarda tümör sayısı ortalaması nüks gelişen grupta 3.71 ± 0.24 adet iken; nüks gelişmeyen grupta 3.0 ± 0.3 idi. Bu veriler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05) (Tablo 3).

Tablo 3. Hastaların tümör sayısına göre dağılımı			
Tm. sayısı	1 tm	>1 tm	>1 Tm. sayı ort.
Nüks var	17	18	3.11 $\pm$ 0.3
Nüks yok	16	15	3.0 $\pm$ 0.3
Toplam	33	33	-
p	p>0.05		p>0.05

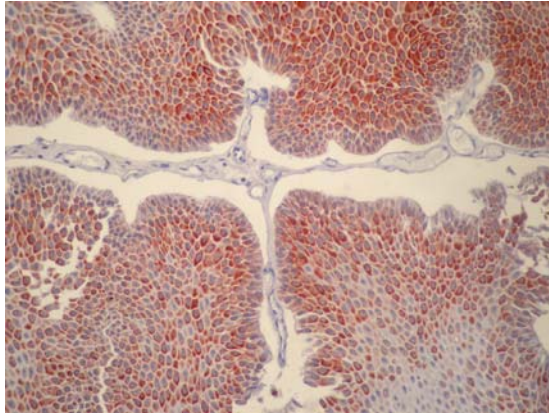
Tablo 4. Hastalarda p53 Q skor dağılımı			
	n	p53 Q skor	p
Nüks var	36	3.77 $\pm$ 0.24	p<0.05
Nüks yok	30	2.82 $\pm$ 0.28	
Ta	30	3.13 $\pm$ 0.29	p>0.05
T1	36	3.51 $\pm$ 0.26	
D Derece	51	3.32 $\pm$ 0.22	p>0.05
Y Derece	15	3.13 $\pm$ 0.58	



Resim 3. Transizyonel hücreli kanserde p53 ile nükleer boyanma (Skor=7) (X200)

P53 boyanma Q skor ortalaması nükseden grupta 3.77 ± 0.24 , nüksmeyen grupta ise 2.82 ± 0.28 olarak saptandı. Bu iki grup arasında p53 boyanma oranı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4). P53 boyanma oranı T1 evreli 36 hastada 3.51 ± 0.26 iken, Ta evreli 30 hastada 3.13 ± 0.29 olarak tespit edildi ($p > 0.05$). Yüksek dereceli 15 hastada p53 boyanma oranı 3.13 ± 0.58 iken, düşük dereceli 51 hastada 3.32 ± 0.22 olarak tespit edildi ($p > 0.05$) (Resim 3).

Tablo 5. Hastalarda bcl-2 Q skor dağılımı			
	n	bcl-2 Q skor	p
Nüks var	36	2.85 ± 0.30	$p < 0.05$
Nüks yok	30	1.58 ± 0.28	
Ta	30	1.75 ± 0.36	$p > 0.05$
T1	36	2.58 ± 0.28	
D Derece	51	2.07 ± 0.30	$p > 0.05$
Y Derece	15	2.89 ± 0.26	



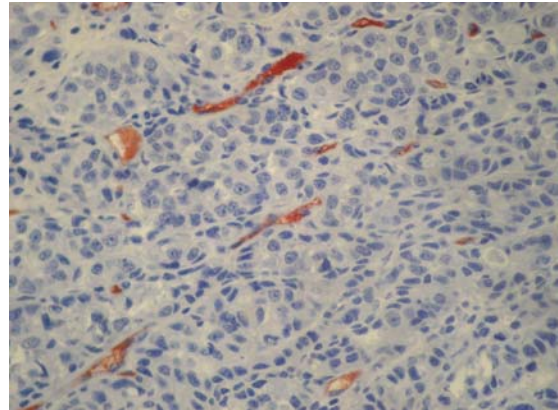
Resim 4. Transizyonel hücreli kanserde bcl-2 ile stoplazmik boyanma (Skor=5) (X200)

Anti bcl-2 antikoruna ile boyanma Q skor ortalaması nükseden grupta 2.85 ± 0.30 ; nüksmeyen grupta 1.58 ± 0.28 saptandı. Bu oranlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 5). Diğer taraftan Anti bcl-2 antikoruna ile boyanma oranı T1 evreli 36 hastada 2.58 ± 0.28 iken, Ta evreli 30 hastada 1.75 ± 0.36 saptandı ($p > 0.05$). Yüksek dereceli 15 hastada Anti bcl-2 antikoruna ile boyanma oranı 2.89 ± 0.26 iken, düşük dereceli 51 hastada 2.07 ± 0.30 saptandı ($p > 0.05$) (Resim 4).

Anti CD34 antikoruna kullanılarak hesaplanan mikrovasküler yoğunluk ortalamaları; iki grup ara-

sında birbirine yakın değerlerde saptanarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). Nükseden grupta ortalama mikrovasküler yoğunluk 29.46 ± 2.00 iken; nüksmeyen grupta 26.04 ± 1.95 saptandı (Tablo 6). Diğer taraftan ortalama mikrovasküler yoğunluk T1 evreli 36 hastada 32.76 ± 1.83 iken, Ta evreli 30 hastada 22.86 ± 1.50 saptandı ($p < 0.05$). Yüksek dereceli 15 hastada ortalama mikrovasküler yoğunluk 37.14 ± 5.12 iken, düşük dereceli 51 hastada 26.92 ± 1.34 saptandı ($p < 0.05$) (Resim 5).

Tablo 6. Hastalarda CD34 mikrovasküler yoğunluk dağılımı			
	n	CD34 mikrovasküler yoğunluk	p
Nüks var	36	29.46 ± 2.00	$p > 0.05$
Nüks yok	30	26.04 ± 1.95	
Ta	30	22.86 ± 1.50	$p < 0.05$
T1	36	32.76 ± 1.83	
D Derece	51	26.92 ± 1.34	$p < 0.05$
Y Derece	15	37.14 ± 5.12	



Resim 5. Transizyonel hücreli kanserde anjiyogenez alanları (X400)

TARTIŞMA

Mesane tümörleri oldukça geniş ve heterojen bir gruptur ve biyolojik davranışlarının nasıl olacağı bugün için bilinmemektedir. Hastalığın seyrini öngörebilmek için yoğun çalışmalar yapılmaktadır ve yeni prognostik etkenler araştırılmaktadır. Araştırılan bu prognostik etkenler ile büyük oranda daha önce belirlenen ve seyri belirlemede kısıtlı yarar sağlayan klasik prognostik etkenler karşılaştırıl-

maktadır. Çalışmaların ortak noktası mesane tümörlerinin biyolojik davranışını anlayabilmek, öngörebilmek ve buna göre en az morbidite ve mortalite ile uygun tedaviyi uygulamaktır.

Anjiyogenez, tümör büyümesi ve metastaz için gerekli yeni damar oluşmasıdır. Mesane tümörlerinin anjiyogenik kapasitesinin neoplastik bir özellik olduğu tespit edilmiştir¹⁵. Mesane tümörleri “malin” karaktere katkıda bulunan bir anjiyogeneze neden olmaktadır. Babkowski ve arkadaşları¹⁶ T1 evreli 49 hastada mikrovasküler yoğunluğun hastalığın seyrine etkilerini araştırmışlar; mikrovasküler yoğunluk ile derece, nüks ve progresyon arasında bir ilişki saptamamışlardır. Başka bir çalışmada Dinney ve arkadaşları T1 mesane kanserli hastalarda erken sistektomiye karar vermede prognostik etkenlerin ve mikrovasküler yoğunluğun sistektomi için hasta seçiminde bir rolü olup olmayacağını araştırmışlardır. T1 hastalarda sistektomi için hasta seçiminde mikrovasküler yoğunluğun artmasının prognostik etken olarak kullanılmayacağı sonucuna varmışlardır¹⁷. Bochner ve arkadaşları düşük derecede mikrovasküler yoğunluk tespit edilen mesane tümürlü hastalarda %19, orta derecede mikrovasküler yoğunluk olanlarda %56, yüksek derecede mikrovasküler yoğunluk olanlarda %68 nüks ve bu oranlarla paralel giden progresyon saptamışlardır¹⁸. Çelik ve arkadaşları; Ta ve T1 evreli 27 hastanın izlemlerinde nükseden ve nüks etmeyen hastalarda mikrovasküler yoğunluk açısından anlamlı bir fark elde etmişlerdir¹⁹.

Bizim çalışmamızda nükseden grupta ortalama mikrovasküler yoğunluğun (29.46±2.00) nüks etmeyen gruba göre (26.04±1.95) daha fazla olduğu, ancak istatistiksel anlam taşımadığı görülmüştür (p>0.05). Diğer taraftan T1 hastalarda (32.76±1.83) Ta hastalara oranla (22.86±1.50) ve yüksek derece hastalarda (37.14±5.12) düşük derece hastalara (26.92±1.34) oranla mikrovasküler yoğunluk daha fazla bulunmuştur (p<0.05). CD34; evre ve derece artışı ile uyumlu iken (p<0.05), nüksü öngörmede istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Mesane tümörlerinde evre ve derece nüks açısından önemli prognostik etkenlerdir. Mesane tümöründe anjiyogenezin tümör evresi ve derece ile korrele iken nüks gelişimi ile korrele olmaması beklenen bir sonuç değildir. CD34 dışında başka anjiyogenez göstergelerinin bulunması bunun nedenleri arasında olabilir. Anjiyogenezin diğer

göstergeleri olan von Willebrand's etken (Faktör VIII), hücre yüzey antijenleri CD31 ve CD34 gibi endotel spesifik antijenlerin hepsinin immünohistokimyasal olarak ayrı ayrı çalışılması ile anjiyogenez ile nüks arasındaki bağlantı gösterilebilir. Mikrovasküler yoğunluğun mesane tümörlerinin değerlendirilmesindeki potansiyel rolünü belirleyecek bilgilerin henüz yeterli olmaması, hasta sayılarında, doku boyutlarında ve immünohistokimyasal protokollerde farklılıkların bulunması daha geniş serilerle yapılmış çok merkezli prospektif çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir.

Birçok çalışmada immünohistokimyasal veya diğer yöntemlerle saptanan nükleer mutant p53 yoğunluğu ile tümörün progresyonunu gösteren derece ve evre arasında yüksek bir paralellik saptanmıştır. İmmünohistokimyasal olarak p53 mutasyonları analiz edildiği zaman heterojen bir nükleer aktivite izlenebilir. Mutant p53 immünohistokimyasal olarak doğru ve güvenilir bir şekilde yansıtılabilir²⁰. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda mesane tümörlerinin %50-65'inde saptanan p53 gen değişimi; yüksek histolojik derece, ileri evre nüks, progresyon ve yaşam süresi ile ilişkili bulunmuştur²¹. Az sayıda olmakla beraber, p53 ekspresyonunda artış ile histolojik derece ve patolojik evre arasında ilişki olmadığını ortaya koyan çalışmalar da vardır²². Esrig ve arkadaşları²⁰, mesane tümörlerinde p53 pozitifliği ile histopatolojik derece ve evre arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında histopatolojik derece artışı ile p53 pozitifliğinde anlamlı artış olduğunu bulmuşlardır. Papov ve arkadaşlarının çalışmasında ise²¹ mesane tümörlerinde p53 pozitifliğinin klinik ve histolojik ölçütlerden bağımsız prognostik belirleyici olduğu sonucuna varılmıştır. Süelözgen ve arkadaşlarının mesane tümörlerinde mutant p53 birikimini nüks açısından değerlendirdikleri çalışmada tümör nüksü için tümörün p53 pozitif ya da p53 negatif olması önemli bir etken olarak saptanmamıştır¹¹. Bu çalışmada pTa ve pT1 tümörler p53 pozitifliği ve negatifliği açısından birbirinden farklı bulunmamıştır. Ancak pT2 tümörlerde mutant p53 birikimi anlamlı bulunmuştur.

Yayınlarda genellikle p53 mutasyonu; evre ve derece ile karşılaştırılmış ve birbirinden farklı birçok sonuç yayınlanmıştır. Bu yayınların birçoğunda invaziv tümörlerle kıyaslanarak p53 mutasyonu sorgulanmıştır. Bizim çalışmamızda, yüzeysel me-

sane tümörlü hastalarda p53 mutasyonunun nüksü öngörmede etkinliği araştırıldı ve mutant p53 birikiminin saptanması anlamlı bulundu. Nükseden tümörlerde p53 Q skor ortalaması 3.77 ± 0.24 ; nüks etmeyen tümörlerde ise p53 skor ortalaması 2.82 ± 0.28 olarak tespit edildi ($p < 0.05$). Çalışmamızda, nüks olan grupta, P53 Q skoru yüksek tespit edilmesine karşın evre ve derece ile P53 Q skoru arasında bir ilişki saptanmadı. Çalışmalarda p53'ün immünohistokimyasal boyanma eşik değerindeki ve boyama tekniğindeki farklılıklar çok farklı yorumların ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bununla birlikte; farklı antikorların kullanılması, antijen fiksasyon tekniklerinin çeşitliliği, skorlamanın subjektif olması, anormal ve normal boyanmanın tanımında uniformite olmaması fikir birliği oluşmamasına sebep olmaktadır. Mesane tümörleri ile ilgili bu tanımlamaları standardize etmek üzere uluslararası bir çalışma grubu çalışmalarını sürdürmektedir. Mutant p53'ün immünohistokimyasal olarak derecelendirilmesi mutlaka bir standart hale dönüştürülmeli ve buna göre yorumlar yapılmalıdır. Biz çalışmamızda bir eşik değer kullanmadık. Boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu sırasıyla 0-4 ve 0-3 arasında değişen skala ile değerlendirildi. P53 antikoru ile pozitif boyanma gösteren reseptörlerin ve anti bcl-2 antikoru ile pozitif boyanma gösteren reseptörlerin boyanması, Q skor (0-7) yöntemi kullanılarak semi-kantitatif olarak değerlendirildi¹⁰.

Apoptotik mekanizmalar içinde yer alan ve bir apoptoz inhibitörü olan bcl-2, mesane kanserinin seyrini belirlemek için yapılan birçok çalışmada kullanılmış bir diğer etkindir⁵. Bcl-2'nin yüksek dereceli lenfomalarda, lösemilerde, nöroblastomda ve prostat kanserlerinde yüksek bulunması kötü hastalık seyrinin göstergesi iken, akciğer ve meme kanserlerinde iyi seyrin göstergesidir²³. Kong ve arkadaşları, 89 mesane tümörlü olguda yaptıkları çalışmada düşük histopatolojik dereceli tümörlerin %31'inde ve yüksek dereceli tümörlerin %63'ünde bcl-2 pozitifliği belirleyerek histopatolojik derece ile ilişkisini istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır²³. Ayrıca bcl-2 pozitiflik oranının invaziv tümörlerde hastalığın seyrini belirlemede önemli olduğunu, ancak invaziv olmayan tümörlerde bcl-2 pozitifliğinin hastalığın seyrinde ve sağkalım oranlarında belirleyici olmadığını bildirmişlerdir. Nakopoulou ve arkadaşları ise 63 mesane tümörlü olguda bcl-2 pozitifliğini düşük histopatolojik dere-

celi tümörlerde %46.2 oranında ve bazal tabakada sınırlı olarak görmüşlerdir. Ancak yüksek dereceli tümörlerde bazal tabakada boyanma görmemişlerdir⁵. Stavropoulos ve arkadaşları çalışmalarında yalnızca TUR-MT uygulanan yüzeysel mesane tümörlerinde bcl-2 aşırı salınımının nüks için ek bir prognostik bilgi sağlamadığı sonucuna varmışlardır^{24,25}. Aynı şekilde Tony ve arkadaşları düşük derece yüzeysel mesane tümörlerinde bcl-2'nin prognostik önemi olmadığını saptamışlardır²⁶. Bunların aksine Atug ve arkadaşları da bcl-2 pozitif hastalarda tümörün progresyona daha yatkın olduğunu gözlemlemişlerdir²⁵.

Biz çalışmamızda, yüzeysel mesane tümörlerinde aşırı bcl-2 salınımının immünohistokimyasal olarak tespit edilmesinin nüks gelişimi açısından prognostik bir etken olabileceği sonucuna ulaştık. Bcl-2 Q skoru; nükseden hastalarda 2.85 ± 0.30 , nüks gelişmeyen grupta 1.58 ± 0.28 olarak tespit edildi ($p < 0.05$). Fakat, evre ve derece ile Bcl-2 Q skor arasında ilişki tespit edilmedi. Olgularımızda immünohistokimyasal olarak mutant p53 ve bcl-2'nin fazla salınımının nüks açısından anlamlı saptanması, p53 ve bcl-2'nin mekanizmaları arasındaki ilişkinin irdelenmesi gerektiğini göstermektedir. Tümör süpresör gen olan p53; DNA hasarlanmasında aktive olarak ya hasarın onarılmasını sağlar ya da hücrenin apoptozuna neden olur²¹. Apoptozu engelleyen ise bcl-2'dir. P53'ün mutasyonu sonucunda oluşan mutant p53'ün DNA hasarını önlememesi sonucunda hasarlı DNA replike olurken, mutasyonlara ve kontrolsüz gelişmeye açıktır. Bu kontrolsüz gelişme; sonuçta bcl-2 artışına yol açarak tümör gelişimini hızlandırıyor olabilir. Diğer dokularda olduğu gibi mesanede de apoptotik yoldaki herhangi bir noktada düzenleyici genlerdeki hasar; anormal genomun yaşam süresinin artması, tümör gelişmesi ve kemoteropetiklere direnç gelişmesi ile sonuçlanır. Bütün bu bilgilere karşın, apoptotik yolun genetik kontrolü halen tam olarak anlaşılamamıştır²⁷.

Rodriguez ve arkadaşlarının çalışmalarında 3 cm'den büyük tümörlerde, 3 cm'den küçük tümörlere oranla 1.6 kat daha fazla nüks saptanmıştır²⁸. Yapılan diğer bazı çalışmaların sonucunda da tümör çapı ile tümör nüksü arasında anlamlı ilişki olduğu ve tümör çapı arttıkça tümörün nüks olasılığının arttığı rapor edilmiştir. Bu veriler sonucunda tümör çapının anlamlı bir prognostik etken olduğu

*YÜZEYEL MESANE TÜMÖRLERİNDE P53, BCL-2 VE CD34 DÜZEYLERİ
(P53, Bcl-2 and Cd34 Levels in Superficial Bladder Tumors)*

sonucuna varılmıştır²⁹. Bazı çalışmalarda ise tümör çapı ile nüks arasında ilişki bulunamamış ve tümör çapının tümör nüksüne etkili bir prognostik etken olmadığı belirtilmiştir³⁰. Yayınlardaki bazı çalışmaları temel alarak, hastaları tümör çapına göre 3 cm'den küçük ve 3 cm'den büyük olarak ayırdığımızda; nüksedenler içinde 3 cm'nin altındakiler %44 oran gösterir iken, nüksetmeyen grupta bu oran %60 idi (Tablo 2). Çapı 3 cm üzerinde olanlar nükseden grupta %56 oranında iken, nüksetmeyen grupta bu oran %40 idi. Çalışmamızda nüks açısından bu tümör büyüklüğünün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Ancak hastaları nüksedenler ve nüksetmeyenler olarak ayırdığımızda, nükseden grupta tümör çapı ortalamasının (3.71±0.24 cm) kontrol grubuna göre (2.54±0.29 cm) anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü.

Heney ve arkadaşlarının 1 yıl içinde meydana gelen nüksleri inceleyen çalışmalarında tek tümörde %22, 2 odak gösteren tümörde %48, 3 ve daha fazla odaklı tümörde %75 oranında nüks saptanmıştır³¹. Yayınlarda tümör sayısının tümör nüksünde etkili bir prognostik etken olduğunu kabul eden başka çalışma sonuçları da vardır³⁰. Ancak tümör sayısının tümör nüksünde etkili bir prognostik etken olmadığını belirten çalışmalar da vardır³². Bizim çalışmamızda tümör sayısı 1 olan 33 hastanın %51'inde nüks görülür iken; tümör sayısı 1'den fazla olan 33 hastanın %54'ünde nüks gelişmiştir. Bu oranlar istatistiksel olarak da fark göstermemiştir (p>0.05). Çalışmamızda tümör sayısının tek veya birden çok olmasının nükste etkili bir prognostik etken olmadığı görülmüştür.

P53 ve Bcl-2 immunboyanma Qskorları nüks olan ve olmayan gruplarda daha ayrıntılı olarak incelendiğinde skor arttıkça nüks olan hasta yüzdesinde artış izlendi (Tablo 7). Fakat hasta sayısı bu-

radan bir yargı çıkarabilecek kadar yeterli olmadığı görüldü. Bu konuda yorum yapabilmek için daha fazla sayıda hasta içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇ

Çalışmamızda yüzeysel mesane tümörü tanısı konulan 66 hasta nükseden ve nüksetmeyen olmak üzere iki grup halinde değerlendirildi. Hastalarda ilk rezeksiyon materyalleri immünohistokimyasal yöntemle bcl-2, mutant p53 ve CD34 düzeyleri açısından incelendi.

Anti p53 antikoruna ve anti bcl-2 antikoruna ile immünohistokimyasal boyanma; yüzeysel mesane tümöründe nüksü öngörme açısından anlamlı iken (p<0.05), immünohistokimyasal yöntemle anti CD34 antikoruna kullanılarak hesaplanan mikrovasküler yoğunluk nüks açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

Yüzeysel mesane tümörlerinde nüksü öngörmeye; immünohistokimyasal olarak p53, bcl-2 ve CD34 immünreaktivitesini değerlendirmek kolay ve ucuz bir yöntemdir. Ancak immünohistokimyasal değerlendirme tekniğinin patoloji uzmanının subjektif yorumlarından uzaklaştırılarak standart hale dönüştürülmesi ve bu standardizasyona göre yorumlanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Ro JY, Staerckel GA, Ayala AG: Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. Urol Clin North Am. 19: 435-453, 1992.
- 2- Jaeger TM, Weidner N, Chew K, Moore DH, Kerschmann RL, Waldman FM, Carroll PR: Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. J Urol. 154: 69-71, 1995.
- 3- Reiher F, Ozer O, Pins M, Jovanovic BD, Eggener S, Campbell SC: p53 and microvessel density in primary resection specimens of superficial bladder cancer. J Urol. 167: 1469-74, 2002.

Tablo 7. p53 ve bcl-2 immün boyanma skorları ve hasta dağılımı

Skor		0 n=5	1 n=0	2 n=10	3 n=21	4 n=17	5 n=10	6 n=1	7 n=2
P53	% Nüks var	20		40	43	75	60	100	100
	% Nüks yok	80		60	57	25	40		
		0 n=15	1 n=0	2 n=18	3 n=12	4 n=9	5 n=10	6 n=2	7 n=0
BCL2	% Nüks var	27		39	67	89	70	100	
	% Nüks yok	73		61	33	11	30		

- 4- Vollmer RT, Humphrey PA, Swanson PE, Wick MR, Hudson ML: Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma: Its relation to histologic degree and expression of p53, MIB-1, c-erb B-2, epidermal growth factor receptor, and bcl-2. *Cancer*. 82: 715-23, 1998.
- 5- Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakiopoulou H, Dimopoulos MA: The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol*. 29: 146-54, 1998.
- 6- Patel VA, Hill DJ, Sheppard MC, Wang F, Logan A, Eggo MC: Apoptosis during goitre involution - the role of Bcl-2. *J Endocrinol*. 164: 323-30, 2000.
- 7- Han RF, Pan JG: Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology*. 67: 1216-1223, 2006.
- 8- Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK: The Bladder Consensus Conference Committee. The World Health Organization/International Society of Urologic Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol*. 22: 1435-1448, 1998.
- 9- Sobin DH, Wittekind CH: TNM Classification of Malignant Tumours. 6th edn. Wiley-Liss. New York 199-202, 2002.
- 10- Regitnig P, Reiner A, Dinges HP, Hoffer G, Muller-Holzner E, Lax SF, Obrist P, Rudas M, Quehenberger F: Quality assurance for detection of estrogen and progesterone receptors by immunohistochemistry in Austrian pathology laboratories. *Virchows Arch*. 441: 328-34, 2002.
- 11- Süelözgen T, Vardar E, Yeniöl CÖ, Sural S, Ayder AR, Postacı H: Mesanenin değişici epitelyum hücreli kanserlerinde mutant p53 birikiminin patolojik evre, derece, nüks ve sağ kalımla ilişkisi. *Türk Üroloji Dergisi*. 27: 145-151, 2001.
- 12- Sarı R, Kurtuluş F, Evirgen M, Ceylan O, İğdem AA, Çek M: Yüzeysel ürotelyal hücreli mesane kanserlerinin takibinde p53 ve Ki-67 overekspresyonlarının yeri. *Türk Üroloji Dergisi*. 28: 25-32, 2002.
- 13- Şahan E, Tetikkurt ÜS, Balcı C, İğdem AA, Gültekin SE, Erdoğan N: Prostatik asiner adenokarsinomda p53 ve Bcl-2 ekspresyonları ile Ki-67 proliferasyon indeksinin değerlendirilmesi, histopatolojik ve klinik prognostik faktörlerle ilişkisi. *Türk Üroloji Dergisi*. 29: 250-7, 2003.
- 14- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 324: 1-8, 1991.
- 15- Shahabuddin S, Arnold F, Costello CB, Kumar S: Tumor angiogenesis factor in urological cancers. *Br J Urol*. 56: 490-4, 1984.
- 16- Babkowski RC, Zhang H, Xia WY, Antelo M, Katz RL, Angela NG, Shakelford D, Marley G, Veltri R, Dinney PN: Angiogenesis does not have prognostic value in T1 bladder cancer. *J Urol*. 155: 615A, 1215, 1996.
- 17- Dinney CP, Babkowski RC, Antelo M, Perrotte P, Liebert M, Zhang HZ, Palmer J, Veltri RW, Katz RL, Grossman HB: Relationship among cystectomy, microvessel density and prognosis in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 160: 1285-90, 1998.
- 18- Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW: Angiogenesis in bladder cancer: Relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 87: 1603-12, 1995.
- 19- Çelik B, Gürdal M, Şengör F, Erol A, Yıldız K, Aslan R: Mesanenin değişici epitel hücreli tümörlerinde anjiogenezisin prognostik önemi. *Türk Üroloji Dergisi*. 26: 395-398, 2000.
- 20- Esrig D, Spruck CH 3rd, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ: p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol*. 143: 1389-97, 1993.
- 21- Popov Z, Hoznek A, Colombel M, Bastuji-Garin S, Lefrere-Belda MA, Bellot J, Abboh CC, Mazerolles C, Chopin DK: The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer*. 80: 1472-81, 1997.
- 22- Tsuji M, Kojima K, Murakami Y, Kanayama H, Kagawa S: Prognostic value of Ki-67 antigen and p53 protein in urinary bladder cancer: Immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br J Urol*. 79: 367-72, 1997.
- 23- Kong G, Shin KY, Oh YH, Lee JJ, Park HY, Woo YN, Lee JD: Bcl-2 and p53 expressions in invasive bladder cancers. *Acta Oncol*. 37: 715-20, 1998.
- 24- Stavropoulos NE, Filiadis I, Ioachim E, Hastazeris K, Tsimaris I, Kalogeras D, Stefanaki S, Agnantis NJ: Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer. *Anticancer Res*. 22: 3759-64, 2002.
- 25- Atug F, Turkeri L, Ozyurek M, Akdas A: Bcl-2 and p53 overexpression as associated risk factors in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int Urol Nephrol*. 30: 455-61, 1998.
- 26- Wu TT, Chen JH, Lee YH, Huang JK: The role of bcl-2, p53, and ki-67 index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. *J Urol*. 163: 758-60, 2000.
- 27- Kelly JD, Williamson KE, Irvine AE, Hamilton PW, Weir HP, Anderson NH, Keane PF, Johnston SR: Apoptosis and its clinical significance for bladder cancer therapy. *BJU Int*. 83: 1-10, 1999.
- 28- Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodriguez J: Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol*. 163: 73-8, 2000.
- 29- Kiemeny LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek AL, Debruyne FM: Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. *J Urol*. 150: 60-4, 1993.
- 30- Mulders PF, Meyden AP, Doesburg WH, Oosterhof GO, Debruyne FM: Prognostic factors in pTa-pT1 superficial bladder tumors treated with intravesical instillations. The Dutch South-Eastern Urological Collaborative Group. *Br J Urol*. 73: 403-8, 1994.
- 31- Heney NM, Nocks BN, Daly JJ, Prout GR Jr, Newall JB, Griffin PP, Perrone TL, Szyfelbein WA: Ta and T1 bladder cancer: Location, recurrence and progression. *Br J Urol*. 54: 152-7, 1982.
- 32- Loening S, Narayana A, Yoder L, Slymen D, Weinstein S, Penick G, Culp D: Factors influencing the recurrence rate of bladder cancer. *J Urol*. 123: 29-31, 1980.