

# Mesane ürotelyal tümörlerinin tip ve derecelendirmesinde nükleer morfometri

## Nuclear morphometry in typing and grading urothelial neoplasms of urinary bladder

Mehmet KEFELİ, Levent YILDIZ, Oğuz AYDIN, Sancar BARIŞ, Bedri KANDEMİR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

### ÖZET

Bu çalışmada görüntü analizi kullanılarak, WHO/ISUP 1998 sınıflamasında yer alan farklı derecelerdeki lezyonların nükleer özellikleri morfometrik olarak değerlendirildi ve kıyaslandı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2002-2006 yılı arşivinde saptanan, mesane ürotelyal tümör tanılı 56 olgu çalışmaya alındı. Olgular WHO/ISUP 1998'e uygun olarak sınıflandırıldı. Her olguda dijitalize edilen görüntü üzerinde 100-150 çekirdek ile en büyük nükleusa sahip 10 hücre morfometrik incelemeye alındı. Her bir çekirdek için alan ( $\mu\text{m}^2$ ), çevre ( $\mu\text{m}$ ), form faktör, maksimum ve minimum çap ( $\mu\text{m}$ ) hesaplandı. Çalışmamızda mesanenin ürotelyal tümörlerinde nükleer morfometrik bulguların WHO/ISUP 1998 sınıflaması ile paralellik gösterdiği saptandı. WHO/ISUP 1998 sınıflamasında derecelendirmede zorluk çekilen olgularda nükleer morfometrik parametrelerin yönlendirici metod olarak kullanılabilirliğinin, prognoza ait verilerin de bulunduğu geniş serilerle yapılacak çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır.

**Anahtar sözcükler:** Mesane, ürotelyal tümör, derece, morfometri, WHO/ISUP

### ABSTRACT

In this study, by using image analyzer, the different diagnostic categories for urinary tumors described in WHO/ISUP 1998 classification were analyzed for the nuclear morphometric features and the data were statistically compared. Fifty six cases of urothelial neoplasia of urinary bladder diagnosed between 2002 and 2006 were selected from the archives of Ondokuz Mayıs University, Department of Pathology. The cases were re-classified according to WHO/ISUP 1998 criteria. In each case morphometric assessment was performed for average 100-150 tumor cell nuclei and 10 largest tumor cell nuclei on the digitalized image. For each the selected cell, nuclear area ( $\mu\text{m}^2$ ), perimeter ( $\mu\text{m}$ ), form factor, maximum and minimum diameters ( $\mu\text{m}$ ) were determined. We have found that morphometric analysis and WHO/ISUP 1998 classification show parallelism in the typing/grading of urothelial neoplasia of the urinary bladder. The standard use of nuclear morphometric features as an ancillary method for the classification of urinary neoplasms in difficult cases can be considered, however further studies that will include the prognostic data are needed.

**Key words:** Bladder, urothelial neoplasia, grade, morphometry, WHO/ISUP

### GİRİŞ

Histolojik derece, ürotelyal mesane karsinomlarında prognozu etkileyen ve tedavi yöntemini belirleyen önemli bir parametredir (1,2). Mesanenin ürotelyal tümörleri için günümüze kadar birçok sınıflama sistemi kullanılmıştır.

**Yazışma adresi:** Yrd. Doç. Dr. Mehmet Kefeli, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, 55139, Kurupelit, Samsun

Bunların hemen hepsinde tümör yapısal ve sitolojik özelliklere göre derecelendirilmektedir. Son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanan ve oldukça ayrıntılı olarak tanımlanan WHO/ISUP 1998 sınıflamasında tümörün nükleer özellikleri tanı kategorilerini belirlemede önemli bir yere sahiptir (3). Bu çalışmanın amacı objektif ve tekrarlanabilir bir yöntem olan görüntü analizi kullanılarak, mesanenin ürotelyal

tümörlerinin nükleer morfolometrik özelliklerini incelemek ve bu tümörler için son yıllarda yaygın olarak kullanılan WHO/ISUP 1998 sınıflamasında ortaya konulan tanı kategorilerinin nükleer morfolometrik özellikler açısından bir fark taşıyıp taşımadığını araştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2002-2006 yılı arasında gelen ve mesanede ürotelyal tümör tanısı alan 86 olguya ait Hematoksilin-Eozin kesitleri yeniden gözden geçirilerek tümör içerenler belirlendi ve üç uzman patolog tarafından, birlikte, çok başlıklı eğitim mikroskobunda değerlendirilerek WHO/ISUP 1998'e uygun olarak sınıflandırıldı. Patologlar arasında uzlaşmanın sağlandığı 56 olgu çalışmaya alındı. Tüm olguların aynı standart tespit ve parafin takip işlemine alındığı belirlenmiştir. Tümör derecesini iyi temsil ettiği düşünülen bloklar seçilerek 2-4 µm'lik kesitler alındı. Nükleer morfolometrik çalışmada kullanılmak üzere hazırlanan bu kesitlere, nükleer kontrastı artırmak amacıyla Feulgen metodu ile nükleer boyama yapıldı. Morfolometrik çalışma için ışık mikroskobunun (Zeiss, Axiophot, Germany) immersiyon (x1000) büyütmesinde nükleer örtüşme ve artefaktların en az olduğu alana ait görüntüler dijital video kamera (Insight Diagnostic Instrument, USA) ile bilgisayara aktarıldı ve görüntü analiz programı morfolometri yazılımı (Samba Technologies 2005, morphology analysis, France) ile değerlendirildi. Görüntü analiz programında piksel sayma özelliğinin eşik değeri manuel ayarlandıktan sonra seçilen nükleusların her biri sayma işlemi yapılmadan önce manuel olarak kontrol edildi. Üst üste binmenin olmasına bağlı birden fazla nükleusun tek bir nükleus gibi seçildiği veya sınırları tam çıkmayan nükleuslar seçilerek elendi. Her olguda dijitalize edilen görüntü üzerinde ortalama 100-150 çekirdek (tüm tümör hücre grubu) ile en büyük nükleuslu 10 hücre (en büyük nükleuslu 10 hücre grubu) morfolometrik incelemeye

alındı. En büyük nükleuslu 10 hücre, x20'lik büyütme ile 20-30 alan taranarak en büyük nükleusların bulunduğu alandaki hücrelerin seçilmesi yöntemi ile belirlendi. Tüm tümör hücre grubu ise nükleer sınırların iyi seçilebildiği ve üst üste binmenin en az olduğu rastgele seçilen ortalama 10 alanda, her alanda 10-15 nükleus seçilerek belirlendi. Görüntü analizi programında her bir çekirdek için alan (mikronkare), çevre (mikronmetre), form faktör, maksimum ve minimum çap (mikronmetre) hesaplandı. Nükleusların biçimini tanımlayan bir parametre olan form faktör " $\text{nükleer çevre}^2 / 4\pi \cdot \text{nükleer alan}$ " formülü ile görüntü analizi programı tarafından otomatik olarak hesaplandı. Form faktör değeri 1.00'dan küçük olduğunda nükleusun yuvarlak olduğu, 1.00'dan yüksek olduğunda ise nükleer biçimde yuvarlaklıktan sapmalar olduğunu belirtmektedir (4).

Değerlendirilen morfolometrik özelliklerin tanı kategorileri arasında gösterdiği farkın anlamlılığına istatistiksel olarak T-testi ile bakıldı.

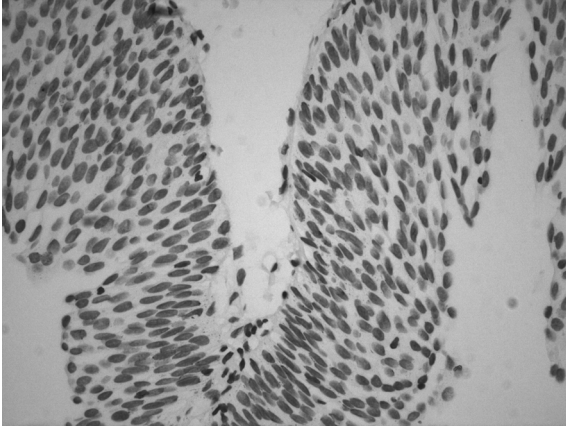
## BULGULAR

Olguların yaşları 22 ile 92 arasında olup ortalama yaş 60.7'dir. Elli altı olgunun 50'sini erkek, 6'sını kadın hastalar oluşturmaktadır. Olguların 6'sı (%10.7) papillom, 7'si (%12.5) düşük malignite potansiyelli papiller neoplazi (DMPPN), 19'u (%33.9) düşük dereceli papiller karsinom (DDPK), 24'ü (%42.85) yüksek dereceli papiller karsinom idi (YDPK). Gruplar arasında nükleer alan ortalaması tüm tümör hücre grubunda papillomda  $13.81 \pm 6.65 \mu\text{m}^2$ , DMPPN'de  $17.49 \pm 7.53 \mu\text{m}^2$ , DDPK'da  $20.51 \pm 10.87 \mu\text{m}^2$  ve YDPK'da  $38.85 \pm 30.88 \mu\text{m}^2$  olarak bulundu. Çevre papillomda  $17.34 \pm 5.53 \mu\text{m}$ , DMPPN'de  $19.06 \pm 4.98 \mu\text{m}$ , DDPK'da  $22.57 \pm 7.65 \mu\text{m}$ , YDPK  $29.07 \pm 9.93 \mu\text{m}$  olarak bulundu. Minimum çap değerleri papillomda  $3.6 \pm 0.9 \mu\text{m}$ , DMPPN'de  $3.96 \pm 0.91 \mu\text{m}$ , DDPK'da  $4.26 \pm 1.15 \mu\text{m}$ , YDPK'da  $5.74 \pm 2.12 \mu\text{m}$  iken maksimum çap değerleri ise papillomda  $5.6 \pm 1.6$ , DMPPN'de  $6.28 \pm 1.61$ , DDPK'da  $7.14 \pm 2.03$ ,

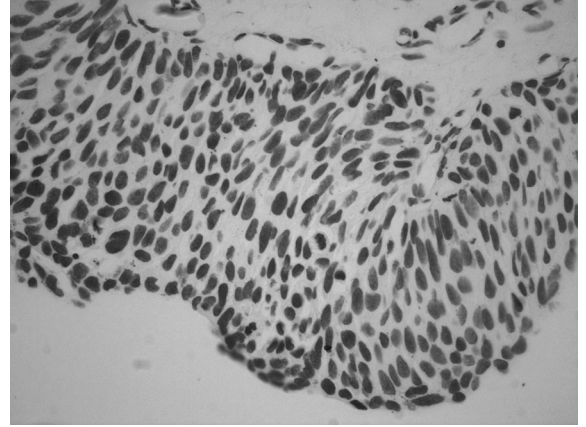
YDPK'da ise  $9.14 \pm 3$  olarak bulundu. Form faktör değerleri ise papillomda  $1.86 \pm 0.77$   $\mu\text{m}$ , DMPPN'de  $1.79 \pm 0.64$   $\mu\text{m}$ , DDPK'da  $2.18 \pm 1.09$   $\mu\text{m}$ , YDPK'da  $2.18 \pm 1.21$   $\mu\text{m}$  idi (Resim 1,2,3). Tüm tümör hücre grubu ve en büyük on nükleuslu hücre grubuna ait elde edilen veriler Tablo 1 ve 2'de özetlenmiştir.

Papillom ve DMPPN olguları karşılaştırıldığında tüm tümör hücreleri grubunda form faktör dışındaki tüm morfometrik parametreler için farklar anlamlı bulundu ( $p < 0.01$ ). En büyük 10 hücre grubunda ise alan, form faktör ve minimum çap farkları anlamlı iken ( $p < 0.01$ ) maksimum çap ve çevre parametreleri arasındaki fark anlamsızdı. DMPPN ve DDPK arasındaki farka bakıldığında tüm tümör hücrelerinde parametrelerin tamamında fark anlamlı ( $p < 0.01$ ) iken, en büyük 10 hücrede farkın anlamlı olmadığı tek parametre form faktör idi. YDPK ile DDPK arasındaki farka baktığımızda tüm tümör hücrele-

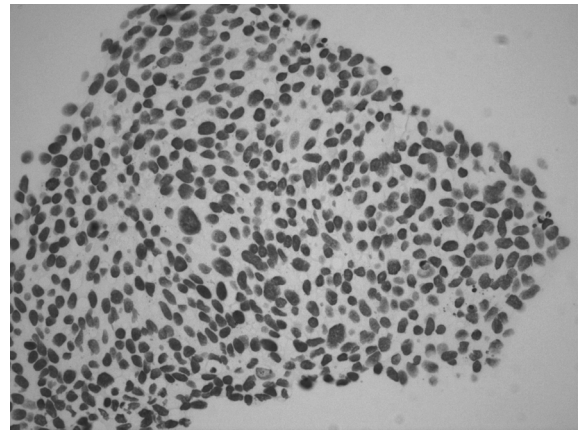
rinde form faktör dışında kalan parametrelerin tamamı anlamlı idi ( $p < 0.01$ ). En büyük 10 hücrede ise tüm parametreler arasındaki fark anlamlıydı ( $p < 0.01$ ).



Resim 1. Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi (Feulgen x400).



Resim 2. Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom (Feulgen x400).



Resim 3. Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom (Feulgen x400).

Tablo 1. Tüm tümör hücre grubuna göre elde edilen verilerin tanı kategorilerine göre dağılımı (Ortalama $\pm$ SD).

	Nükleer Alan	Form Faktör	Nükleer Çevre	Minimum Çap	Maksimum Çap
Papillom (n:6)	13.81 $\pm$ 6.65	1.86 $\pm$ 0.77	17.34 $\pm$ 5.53	3.6 $\pm$ 0.9	5.6 $\pm$ 1.6
DMPPN (n: 7)	17.49 $\pm$ 7.53	1.79 $\pm$ 0.64	19.06 $\pm$ 4.98	3.96 $\pm$ 0.91	6.28 $\pm$ 1.61
DDPK (n: 19)	20.51 $\pm$ 10.87	2.18 $\pm$ 1.09	22.57 $\pm$ 7.65	4.26 $\pm$ 1.15	7.14 $\pm$ 2.03
YDPK (n: 24)	38.85 $\pm$ 30.88	2.18 $\pm$ 1.21	29.07 $\pm$ 9.93	5.74 $\pm$ 2.12	9.13 $\pm$ 3

DMPPN: Düşük malignite potansiyelli papiller neoplazi

DDPK: Düşük dereceli papiller karsinom

YDPK: Yüksek dereceli papiller karsinom

**Tablo 2. En büyük nükleuslu 10 hücre grubuna göre elde edilen verilerin tanı kategorilerine göre dağılımı (Ortalama±SD).**

	Nükleer Alan	Form Faktör	Nükleer Çevre	Minimum Çap	Maksimum Çap
Papillom (n:6)	19.53±7.98	1.98±1.03	21.32±7.33	4±0.82	7.09±1.86
DMPPN (n: 7)	29.52±24.99	1.61±0.46	22.95±8.49	5.05±1.81	7.54±2.61
DDPK (n: 19)	45.39±23.05	1.58±0.52	28.94±7.55	6.07±1.57	9.9±2.6
YDPK (n: 24)	85.82±64.11	1.42±0.41	36.91±11.95	8.39±2.97	12.78±4.18

*DMPPN: Düşük malignite potansiyelli papiller neoplazi*

*DDPK: Düşük dereceli papiller karsinom*

*YDPK: Yüksek dereceli papiller karsinom*

## TARTIŞMA

Mesane ürotelyal tümörlerinde tümör derecesi ve evre önemli prognostik göstergelerdir. Bir dereceleme sistemi ortaya konulurken karşılanmaya çalışılan en büyük beklenti, sağ kalım için güvenli ve etkin bir gösterge olmasıdır. Mesane ürotelyal neoplazileri için günümüze kadar birçok sınıflama sistemi kullanılmış olup, son yıllarda en yaygın kullanılanı WHO/ISUP 1998 sınıflamasıdır (3,5,6,7). Günümüzde yaygın kullanım alanı bulan bu sınıflama sisteminde, tümörün yapısal ve hücresel özellikleri bir arada değerlendirilerek ifade edilmektedir. Diğer sınıflamalara göre daha ayrıntılı tanımlanması ve daha nesnel ölçütleri olmasına rağmen yine de derecelendirme zorluklarının yaşandığı olgular vardır. Bu tür olgularda nükleer morfolometrik özellikler gibi ek yardımcı bulgular faydalı olabilir.

Morfolometrik değerlendirmeler basit, objektif ve tekrarlanabilir değerlendirmelere olanak veren yöntemlerdir. Morfolometrik çalışmalarla çeşitli tümörlerin derecelendirme sistemleri ve prognoz ile ilişkileri araştırılmıştır. Mesane tümörlerinde de nükleer morfolometrik özellikler ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve bunların histopatolojik derece ve prognoz ile arasındaki ilişki araştırılmıştır (8,9,10). Lipponen ve ark.'ları yaptıkları çalışmada WHO 1973 sınıflamasına göre tanı almış 83 transizyonel hücreli karsinom olgusunda prognozu göstermede morfolometrik parametrelerin de histopatolojik derece kadar iyi olduğunu belirtmişlerdir. Hatta nükleer morfolometrinin lenf nodu ve uzak metastaz

açısından histopatolojik dereceden daha iyi bir belirleyici olduğunu açıklamışlardır (11). Özer ve ark.'ları yaptıkları çalışmada ise 73 yüzeysel ürotelyal karsinom (pTa ve pT1) olgusunda yüksek nükleer alan, çevre ve minimum-maksimum çap değerlerinin yüksek derece ve proliferatif aktivite ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Evre ile ise ortalama nükleer alan ve minimum çap arasında ilişki saptamışlardır. Ortalama 21 ay takip ettikleri hastaların klinik progresyonu ile sadece tümörün derecesini ilişkili bulmuşlardır. Morfolometrik parametreler ile tümör progresyonu ve nüks arasında ilişki saptamamışlardır (12).

Borland ve ark.'ları ise radikal sistektomi uygulanan 14 transizyonel hücreli karsinom olgusunda nükleer morfolometri ile nüks arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmada yer alan 14 olgudan 7'sinde nüks izlenmemiş ve bu grupta yer alan olguların ortalama nükleer alan ve çap gibi parametreleri diğer gruptan farklılık göstermiştir (p=0.003). Çalışmanın sonucuna göre radikal sistektomi uygulanan hastaların nükleer morfolometrik özelliklerinin hastalarda nüks açısından belirleyici olabileceği ve bu hastalara operasyon sonrası adjuvan kemoterapi uygulanabileceğini belirtmişlerdir (13). Yine Bol ve ark.'ları yaptıkları çalışmada 195 evre Ta-T1 ürotelyal karsinom olgusunda nükleer morfolometri ve proliferatif aktivitenin tümör progresyonu ile arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve nükleer morfolometri ve proliferatif aktivitenin tümörün derecesinden bağımsız olarak tümör progresyonu ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (14).

Nesnel olmak iddiası ile ortaya çıkan diji-



talize morfometrik sistemlerin de yöntemsel problemleri vardır. Bunların başında çekirdek örtüşmelerinin ölçüm işlemini olumsuz etkilemesi ve yeterli karşıtlık ortaya koyamayan çekirdek boyaları gelir. Bu sorunların bulunmadığı alanlardan yapılan dijitalizasyonlar kolaylıkla bir örnekleme hatasına neden olabilir. Yeterince ince kesit almaya olanak sağlayan gömme ortamları, dokulardan hazırlanacak hücre ya da çekirdek süspansiyonlarının kullanılması, nükleer içeriğe yönelik özelleşmiş boyalar ve ölçüme alınacak çekirdeklerin sayısının artırılması ile bu sorunların üstesinden gelinebilir.

Çalışmamızda ürotelyal mesane tümörlerinde nükleer morfometrik parametrelerin WHO/ISUP 1998 sınıflaması ile paralellik gösterdiği saptanmıştır. Mesane tümörlerinde prognoz ve nüks ile ilişkisi literatürde birçok çalışmada gösterilen nükleer morfometrik özelliklerin WHO/ISUP 1998 sınıflamasında derecelendirmede zorluk çekilen ve arada kalınan olgular da yardımcı ve belirleyici yöntem olarak kullanılabilirliği prognostik veriler eşliğinde daha ileri çalışmalar ile değerlendirilmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, et al. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* 1998;160:615-659.
2. Collan Y, Makinen J, Heikkinen A. Histological grading to TC tumors of the bladder. Value of histological grading (WHO) in prognosis. *Eur Urol* 1979;5:311-318.
3. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/ International Society of Urological Pathology Consensus Classification for urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1435-1438.
4. A Molecular Diagnostic Company Samba Technologies. Samba Programmer's Reference Third Edition October 2001 (Ref: 14704DEA), p.236.
5. Broders AC. Epithelioma of the genitourinary organs. *Ann Surg* 1922;75:574-604.
6. Ash JE. Epithelial tumors of the bladder. *J Urol* 1940;44:135-145.
7. Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumors. Volume 10. Geneva, World Health Organization, 1973.
8. Ooms EC, Blok AP, Veldhuizen RW. Reproducibility of quantitative grading systems of bladder tumors. *Histopathol* 1985;9:501-503.
9. Lipponen P, Simpanen H, Pesonen E, Eskelinen M, Sotarauta M, Collan Y. Potential of morphometry in grading transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Pathol Res Pract* 1989;185:617-620.
10. Blomjous CE, Vos W, Schipper NW, Uyterlinde AM, Baak JP, de Voogt HJ, et al. The prognostic significance of selective nuclear morphometry in urinary bladder carcinoma. *Hum Pathol* 1990;21:409-413.
11. Lipponen PK, Collan Y, Eskelinen MJ, Pesonen E, Sotarauta M. Morphometry in human transitional cell bladder cancer. *Eur Urol* 1990;17:155-160.
12. Ozer E, Yorukoglu K, Mungan MU, Ozkal S, Demirel D, Sagol O, et al. Prognostic significance of nuclear morphometry in superficial bladder cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:251-256.
13. Borland RN, Partin AW, Epstein JI, Brendler CB. The use of nuclear morphometry in predicting recurrence of transitional cell carcinoma. *J Urol* 1993;149:272-275.
14. Bol MG, Baak JP, Rep S, Marx WL, Kruse AJ, Bos SD, et al. Prognostic value of proliferatif activity and nuclear morphometry for progression in TaT1 urothelial cell carcinomas of the urinary bladder. *Urology* 2002;60:1124-1130.