

# MESANENİN DEĞİŞİCİ EPİTEL HÜCRELİ PAPİLLOM VE KARSİNOMLARINDA AgNOR VE MITOTİK İNDEKS YÖNTEMLERİNİN TÜMÖR STAGE'İ İLE İLİŞKİSİ

Dr. Şahande ELAGÖZ\*, Dr. Handan AKER\*, Dr. Ender DÜZCAN\*\*, Dr. Ziyet ÇINAR\*\*\*

**ÖZET:** Mesanenin değişici epitel hücreli kanserleri (DEHK) oldukça değişken bir biyolojik potansiyele sahip olup, bu potansiyel tümörün grade ve stage'i ile koreledir. Biz 104 değişici epitel hücreli papillom ve kanser olgusunda proliferasyonu ölçmek için iki farklı yöntem olan AgNOR ve mitotik indeks yöntemlerini kullandık ve sonuçlarımızı stage ile karşılaştırdık. Her iki yöntem de stage ile korelasyon göstermesine rağmen, iki yöntemi de tam olarak değerlendirmek için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu gördük.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Mesane, değişici epitel hücreli kanser, stage, AgNOR, mitotik indeks.

**SUMMARY:** THE RELATIONSHIP AMONG THE AgNOR AND MITOTIC INDEX WITH TUMOR STAGE IN BLADDER PAPILLOMA AND THE TRANSITIONAL CELL CARCINOMA. Transitional cell carcinomas of the urinary bladder vary in their biologic potential, which may be correlated with the grade and stage of the tumor. Cellular proliferation may prove to be another predicting measure of biologic potential of tumor. We have compared two different methods (AgNOR and mitotic index) to assess proliferation in 104 tumors and correlated these results with tumor stage. For each case, we applied AgNORs and mitotic index methods. Although AgNORs and mitotic index methods were related to pathological stage, clearly indicated the need for further studies before the clinical importance of these methods can be fully appreciated in bladder cancer.

**KEY WORDS:** Urinary bladder, transitional cell carcinoma, stage, AgNOR, mitotic index.

## GİRİŞ

Sıklığı, dünya üzerinde ırka ve coğrafyaya bağlı olarak anlamlı şekilde farklılıklar gösteren mesane kanserleri, kansere bağlı ölümlerde kadınlarda 14'üncü, erkeklerde ise 4'üncü sırada yer alır (1,2). Sivas ve çevresinde, bütün kanser tanılarının erkeklerde %11.67'sini, kadınlarda ise %2.53'ünü mesane kanserleri oluşturmaktadır (3).

Bölgemizde oldukça sık rastlanan mesanenin değişici epitel hücreli kanserlerinde (DEHK) en önemli ve halen kullanılmakta olan prognostik parametre, kanserin yaygınlığının ifadesi olan patolojik stage (evre)'dir (4-9). Direkt olarak prognozu yansıtmaması ve tedavi protokolunun seçilmesi açısından çok önemli olan patolojik stage, olguların %40'ında klinik stage'in altında veya üstünde bulunabilir (5,8).

Çalışmamızın amacı mesanenin DEHK'lerini stage'lemek morfolojik bir ölçüm olarak kabul edilen mitotik indeks (MI) ile proliferatif bir belirleyici olarak kabul edilen AgNOR yöntemlerinin kullanılıp kullanılmayacağıdır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza 1 Ocak 1987 ve 31 Aralık 1994 tarihleri arasında Anabilim Dalımızca incelenerek mesanenin DEH papillom ve kanseri tanısı almış 104 olguyu dahil ettik. Olgulardan 3'ü sistektomi, 4'ü biyopsi ve 97'si ise TUR materyali idi. Olguları stage'lemek için olguya ait bütün hematoksilen eozin kesitler incelenerek Jewett'in önerdiği patolojik stage sistemi uygulandı (10). Ancak özellikle TUR ve biyopsi materyallerinde yüzeysel ve derin kas ayırımını yapmanın çoğu zaman zor, hatta imkansız olduğu görüldü. Bu nedenle Jewett sınıflamasındaki yüzeysel ve derin kas invazyonu sınıflaması çalışmamızda sadece kas invazyonu gösterenler stage A,

kas invazyonu gösterenler stage B ve serozal lenfatiklerde invazyonu olanlar stage C olarak değerlendirildi.

Her olguya parafin bloklardan patolojik durumunu en iyi yansıtanı seçilerek 4µm'lik kesitler hazırlandı. Çalışmamızda AgNOR boya ve sayım yöntemi olarak Crocker ve arkadaşlarının (11), MI yöntemi olarak Simpson ve arkadaşlarının (12) önerdiği yöntemler kullanıldı.

### AgNOR YÖNTEMİ

Parafin bloklardan elde edilen 4µm kalınlığındaki kesitler deparafinize edildikten sonra 20 dakika süre ile %96'lık alkolde bekletilerek deiyonize su ile yıkandı ve taze olarak hazırlanmış AgNOR solüsyonu (1 kısım %1'lik formik asit ve %2'lik jelatin karışımı ile 2 kısım %50'lik gümüş nitrat) ile oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 60-90 dakika inkübe edildi. Boyama işlemi sonrasında artefaktları azaltmak amacıyla deiyonize suda iyice çalkalanan kesitler 30 saniye %5'lik tiyosülfattan geçirildi, tekrar deiyonize suda çalkalandı, dokular, derecesi yükselen alkol serilerden geçilerek dehidrate edildi ve ksilol ile temizlenip sentetik kapatma maddesi ile kapatıldı. Değerlendirme işlemi N.A değeri 1.25 olan Abbe tipi kondansörlü Nikon marka binoküler ışık mikroskopunda x1000 büyütme ile yapıldı. Her olgu için farklı 100 hücrenin nükleusunda Crocker'in önerdiği sayım sistemi kullanıldı (3). Bunun için nükleolus içi AgNOR benekleri (AgNOR I), nükleoler+ekstranükleoler AgNOR benekleri (AgNOR II) sayıldı. Her olgu için ortalama AgNOR değerleri bulunarak, bu değerler AgNOR indeksi olarak kabul edildi.

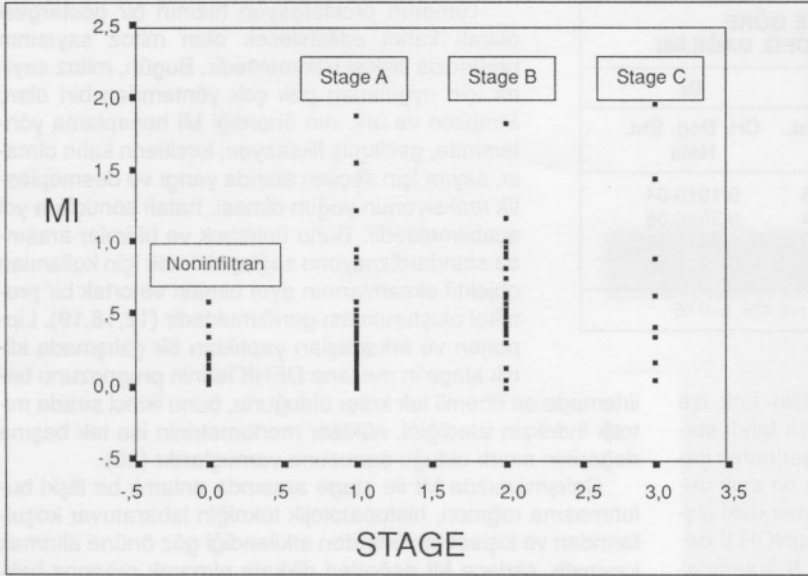
### MITOTİK İNDEKS YÖNTEMİ

Mitotik indeks, 10 farklı alanda sayılan mitotik şekillerin toplamının tüm sahadaki tahmini hücre sayısına oranıdır ve bulunan oran payda 1000 olacak şekilde (MI=mitoz/1000 hücre) ifade edilir (4). Bu yöntemde küçük büyütmede bütün tümör dokusu taranarak hücreden ve mitozdan en zengin, nekroz, fibrozis ve iltihabın olmadığı alan seçildi. Mikroskop sahası lineer mikrometre ile ikiye bölünerek çap çizgisi şeklinde izlenen bu çizginin kesiştiği hücreler N.A değeri 1.25

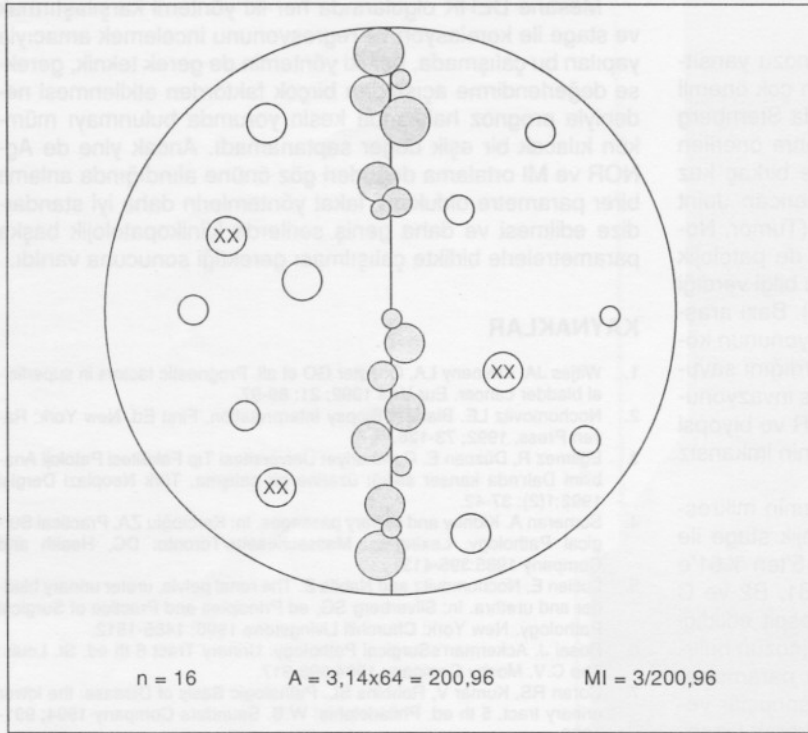
\* Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

\*\* Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

\*\*\* Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı  
Bu çalışma XII. Ulusal Patoloji Kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur



Şekil 1: Olguların stage'lere göre MI ort. değ. dağılımı



Şekil 2: Mitotik indeksin hesaplanması sırasında mikroskop sahasının şematik görünümü (x400).

olan Abbe tipi kondansörlü Nikon marka binoküler ışık mikroskopunda x40 objektif ile sayıldı (n). Dairenin alan formülünden yola çıkılarak mikroskop sahasındaki tahmini hücre sayısı ( $A=\pi(n/2)^2$ ) formülü ile hesaplandı. Tüm sahalardaki tahmini hücre sayısını bulmak için 1, 5, 10'uncu sahalardan hesaplanan tahmini hücre sayılarının ortalaması alınıp 10 ile çarpıldı. Daha sonra 10 farklı alandaki mitotik figürler sayıldı. Son olarak toplam mitoz sayısının tahmini hücre sayısına oranı hesaplanarak ve 1000 ile genişletilerek her olgu için  $MI=\text{mitoz}/1000$  hücre cinsinden ifade edildi (1,3-6). MI yönteminin hesaplanması Şekil 1'de görülmektedir.

AgNOR indeksi ve MI değerleri ile tümörün grade'i ara-

sındaki ilişkiyi araştırmak için çoklu korelasyon-regresyon analizlerinden olan "step-wise regresyon" analizi, ilişki bulunan gruplar arasında ise ilişkinin kuvvetini incelemek için "korelasyon analizi", değişkenlerden birisindeki bir birimlik artışın diğer değişkende nasıl bir değişime neden olabileceğini incelemek için ise "regresyon analizi" uygulandı. Kontrol grubu ile çalışma grubunun AgNOR I, AgNOR II ve MI değerleri karşılaştırılırken de "iki ortalama farkının anlamlılık testi (student t testi)" uygulandı.

Agnor yönteminde nukleolus içi beneklerin toplamı AgNOR I, nukleus içindeki tüm beneklerin sayısı ise AgNOR II olarak kabul edildi ve hangi sayım yönteminin parametrelerle daha korele olduğu araştırıldı. Çalışmamızda gruplar arasında AgNOR ve MI değerleri açısından ilişki olup olmadığını, ilişki bulunan gruplar arasında ise ilişkinin derecesini araştırmak için korelasyon analizi, değişkenlerden birisindeki bir birimlik değişimin diğer değişkende nasıl bir değişimi neden olabileceğini incelemek için ise regresyon analizi uygulandı (Step-wise regresyon analizi).

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 104 olgunun 6'sının yaşları kayıtlardan tespit edilemedi. Kalan 98 olgunun yaş ortalaması  $59.5\pm 1.23$  idi. Olguların cinslere göre dağılımı incelendiğinde ise erkek/kadın oranı 4.3/1 idi. Gerek yaş, gerekse cins dağılımı ile AgNOR ve MI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. Jewett'e göre yeniden stage'lemesi yapıldığında (10) olguların %18'i (%17.3) noninfiltran, 48'i (%46.2) stage A, 28'i (%26.9) stage B ve 10'u (%9.6) stage C idi. Olguların stage'lere göre dağılımı ile ortalama AgNOR ve MI değerleri Tablo 1'de görülmektedir. Stage ile AgNOR I değerleri arasındaki korelasyon ve regresyon araştırıldığında istatistiksel olarak bu değerler önemsiz bulundu ( $r:0.265$ ;  $p>0.05$ ). Stage ile AgNOR II değerleri karşılaştırıldığında ise doğrusal bir regresyon bulunmuş olup stage bir birim arttığında AgNOR II değerinde 0.067 birimlik artışa neden olduğu görüldü ( $r:0.209$ ;  $p<0.05$ ). Stage'lere ait AgNOR I

ve II ortalama değerleri ikiyeşerli olarak Tukey testi ile karşılaştırıldığında noninfiltran ile stage C arasındaki fark anlamlı ( $p<0.05$ ), diğer değerler arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamsız idi ( $p>0.05$ ). Stage ile AgNOR I ve AgNOR II değerleri birlikte incelendiğinde AgNOR II değeri ile stage arasındaki korelasyon ve regresyonun daha kuvvetli olduğu görüldü.

Stage ile MI değerleri arasındaki korelasyon ve regresyon araştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ( $r:0.436$ ;  $p<0.05$ ). Daha sonra grup ortalamaları ikiyeşerli olarak karşılaştırıldığında noninfiltran ile stage B, noninfiltran ile stage C ve stage A ile stage C arasındaki fark istatistiksel

**TABLO 1: OLGULARIN STAGE'LERE GÖRE AgNOR I, AgNOR II VE MI ORT. DEĞ. DAĞILIMI**

STAGE	Olgu Sayısı	AgNOR I		AgNOR II		MI	
		Ort.Değ. Std. Hata	Ort. Değ. Std. Hata	Ort. Değ. Std. Hata	Ort. Değ. Std. Hata		
Noninfiltran	18	8.65±0.38	9.67±0.38	0.19±0.04			
A	48	9.77±0.44	10.91±0.44	0.35±0.05			
B	28	9.61±1.13	10.81±0.50	0.65±0.02			
C	10	11.19±1.35	12.66±1.10	0.73±0.18			

r=0.265, p>0.05 r=0.209, p>0.05 r=0.436, p<0.05

olarak önemli ( $p<0.05$ ), diğer değerler arasındaki fark ise önemsiz ( $p>0.05$ ) bulundu. Bütün bunlara rağmen farklı stage'deki olgularda gerek AgNOR, gerekse MI değerlerinin çakıştığı, olguları stage'lemekte her iki yöntem için bir eşik değeri olmadığı görüldü. Stage ile MI değerleri arasındaki ilişki Şekil 2 de görülmektedir. MI ile AgNOR I ve AgNOR II değerleri birlikte karşılaştırıldığında ise MI AgNOR II arasındaki korelasyon ve regresyonun daha kuvvetli olduğu görüldü.

## TARTIŞMA

Mesanenin DEHK'lerinde direkt olarak prognozu yansıması ve tedavi protokolünün seçilmesi açısından çok önemli olan patolojik stage'in önemi, ilk kez 1946 yılında Sternberg ve Jewett tarafından belirtilmiştir (5,8). Daha sonra önerilen bu sistemler esas olarak alınmış, zaman içinde birkaç kez modifiye edilmiştir (5,8,9). En son olarak American Joint Committee on Cancer tarafından önerilen TNM (Tumor, Node, Metastase) sınıflamasının hem klinik, hem de patolojik stage'i gösterdiği, tümör yayılımı hakkında doğru bilgi verdiği ve daha kullanışlı olduğu ileri sürülmüştür (4,7,8). Bazı araştırmacılar hangi derinlikte olursa olsun kas invazyonunun kötü prognozu gösterdiğini ve uzak metastazı artırdığını savunurken (4,13), Jewett ve arkadaşları ise derin kas invazyonunun daha kötü prognozu gösterdiğini, ancak TUR ve biyopsi materyallerinde yüzeysel ve derin kası ayırt etmenin imkansız olduğunu ileri sürmüşlerdir (5,8,9,13,14).

Yapılan bir çalışmada sistektomi materyallerinin mikroskopik incelemesinden sonra tespit edilen patolojik stage ile klinik stage karşılaştırılmış ve klinik stage'in %15'ten %61'e kadar varan oranlarda yanlış olduğu, özellikle B1, B2 ve C stage'li olgularda klinikte düşük stage olduğu tespit edildiği belirtilmiştir (14). Malign tümörlerin çoğunda prognozun belirlenmesinde önemli bir faktör olan stage'in diğer parametrelerle birlikte değerlendirildiğinde daha güvenilir sonuçlar vereceği düşünülmektedir. Bu düşünceden yola çıkarak Lipponen ve ark. 229 mesane DEHK olgusunda yaptıkları bir çalışmada yüksek grade'li, non-papiller ve kas invazyonu gösteren olgularda AgNOR sayısının fazla olduğunu ileri sürmüşlerdir (15). Aynı araştırmacılar, 89 mesane tümörü olgusunda yaptıkları başka bir çalışmada, AgNOR sayısının histolojik grade, klinik stage ve klinik gidiş ile korelasyon gösterdiğini, ancak mesane kanserlerinde AgNOR indeksi yönteminin değerinin sınırlı olduğunu ve yönteminin öneminin tam olarak kabul edilmesinden önce ilave çalışmalarına ihtiyaç duyulduğunu ifade ettiler (16). Zambelli ve ark. 1993 yılında 18 mesane DEHK olgusunda Ki-67 ve AgNOR indekslerinin grade, stage ve klinik sağkalım ile ilişkisini araştırmışlar, Ki-67'nin grade ve stage ile ilişkili, sağkalım ile ilişkisi olduğunu, AgNOR'un ise çalışmaya dahil edilen hiçbir parametre ile ilişkisinin olmadığını görmüşlerdir (17).

Tümörün proliferasyon hızının bir göstergesi olarak kabul edilebilecek olan mitoz sayısının prognozla ilişkisi bilinmektedir. Bugün, mitoz sayısı için uygulanan pek çok yöntemden biri olan, Simpson ve ark. nın önerdiği MI hesaplama yönteminde, gecikmiş fiksasyon, kesitlerin kalın olması, sayım için seçilen alanda yangı ve desmoplastik reaksiyonun yoğun olması, hatalı sonuçlara yol açabilmektedir. Bunu önlemek ve birimler arasında standardizasyonu sağlayabilmek için kullanılan objektif aksamlarının aynı olması ve ortak bir protokol oluşturulması gerekmektedir (12,18,19). Lipponen ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada klinik stage'in mesane DEHK'lerinin prognozunu belirlemede en önemli tek kriter olduğunu, bunu ikinci sırada mitotik indeksini izlediğini, nükleer morfometrinin ise tek başına değerinin sınırlı olduğu sonucuna varmışlardır (20).

Çalışmamızda MI ile stage arasında anlamlı bir ilişki bulunmasına rağmen, histopatolojik tekniğin laboratuvar koşullarından ve kişisel faktörlerden etkilendiği göz önüne alınmak kaydıyla, sadece MI değerleri dikkate alınarak prognoz hakkında kesin yorumda bulunmayı mümkün kılacak bir eşik değeri olmadığı saptandı.

Mesane DEHK olgularında her iki yöntemi karşılaştırmak ve stage ile korelasyon ve regresyonunu incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada, her iki yöntemin de gerek teknik, gerek değerlendirme açısından birçok faktörden etkilenmesi nedeniyle prognoz hakkında kesin yorumda bulunmayı mümkün kılacak bir eşik değeri saptanamadı. Ancak yine de AgNOR ve MI ortalama değerleri göz önüne alındığında anlamlı birer parametre oldukları, fakat yöntemlerin daha iyi standardize edilmesi ve daha geniş serilerde klinikopatolojik başka parametrelerle birlikte çalışılması gerektiği sonucuna varıldı.

## KAYNAKLAR

1. Witjes JA, Kiemeny LA, Oester GO et al. Prognostic factors in superficial bladder cancer. *Eur Urol* 1992; 21: 89-97.
2. Nochomovitz LE. *Bladder Biopsy Interpretation*. First Ed. New York: Raven Press, 1992; 73-126.
3. Eğilmez R, Düzcan E. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda kanser sıklığı üzerine bir çalışma. *Türk Neoplazi Dergisi* 1992;1(2): 37-42.
4. Someran A. *Kidney and urinary passages*. In: Karcioğlu ZA. *Practical Surgical Pathology*. Lexington, Massachusetts/Toronto: DC, Health and Company 1985;395-413.
5. Lucien E, Nochomovitz and Nabila E. *The renal pelvis, ureter urinary bladder and urethra*. In: Silverberg SG, ed *Principles and Practice of Surgical Pathology*. New York: Churchill Livingstone 1990; 1485-1512.
6. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology: Urinary Tract* 8 th ed. St. Louis: The C.V. Mosby Company 1994;898-917.
7. Coran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic Basis of Disease: the lower urinary tract*. 5 th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1994; 991-1005.
8. Victor E, Reuter and Mayron R, Melamed D. *The lower urinary tract*. In: Stephan S. Sternberg ed. *Diagnostic Surgical Pathology*. New York: Raven 1979-85.
9. Peterson RO. *Urologic Pathology. Urinary bladder*. 2 th ed. Philadelphia: JB. Lippincott Company 1992; 260-395.
10. Jewett HL, Strong GH. *Infiltrating carcinoma of the bladder: relation of depth of penetration of the bladder wall to incidence of local extension and metastasis*. *J urol* 1946;55:366-372.
11. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. *How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach*. *J Pathol* 1989; 158: 185-8.
12. Simpson JF, Dutt PL and Page DL. *Expression of mitosis per thousand cell and cell density in breast carcinomas*. *Hum Pathol* 1992; 23: 608-11.
13. Ebstein JI, Amin MB, Reuter VR et al. *The World Health Organization/International Society of Urologic Pathology Consensus Classification of urothelial (Transitional cell) neoplasms of the urinary bladder*. *Am J Surg Pathol* 1998, 22(12): 1435-1438.
14. Friedl GH, Parija GC, Nagy GK. *The pathology of human bladder cancer*. *Cancer* 1980; 45: 1823-31.
15. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Nordling S. *Nucleolar organizer regions (AgNORs) as predictors in transitional cell bladder cancer*. *Br J Cancer* 1991;

