

T.C.
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı

**DEĞİŞİCİ EPİTEL HÜCRELİ YÜZEYSEL
MESANE KANSERLERİNDE EPİDERMAL
BÜYÜME FAKTÖRÜ, TRANSFORMİNG
BÜYÜME FAKTÖRÜ α ve EPİDERMAL
BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRÜ
EKSPRESYONU ve PROGNOSTİK ÖNEMİ**

UZMANLIK TEZİ

T. 48015

Dr. MUSTAFA LEVENT ERTON

İstanbul, 1995

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BOKUMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

SAYFA

Giriş ve Amaç	3
Genel Bilgiler	5
Gereç ve Yöntem	9
Bulgular	15
Tartışma	29
Sonuç	32
Özet	33
Kaynaklar	34

GİRİŞ ve AMAÇ

Mesane kanseri, erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden biridir ¹. A.B.D. istatistiklerine göre mesane kanserinin erkekler arasında üçüncü, kadınlar arasında onuncu en yaygın tümör olduğu belirtilmektedir ². Mesane tümörleri genel olarak yüzeysel ve kas tutulumu olan derin tümör olmak üzere ikiye ayrılmakta olup, her iki kanser tipinin de kendine özgü klinik seyri vardır. Tüm mesane tümörlerinin yaklaşık % 70-85'i yüzeysel tümörlerdir ³. Yüzeysel mesane tümörlerinin en önemli özelliklerinden birisi transüretal tümör rezeksiyonunu takiben yüksek oranda tekrarlama şansının olmasıdır. Tekrarlama sıklığı %50 ile 80 arasında değişmektedir ⁴. Yüksek tekrarlama sıklığının esas nedeni neoplastik değişimden sorumlu olan olayların tüm üroepiteli etkilemesidir. Ayrıca, her yeni mesane tümörünün, derin tümör haline gelmesi mümkündür. Yüzeysel mesane tümörleri, tekrarları sırasında % 25-30 olguda derin tümör haline gelme olasılığına sahiptir ⁵.

Yüzeysel mesane tümörlerinin yüksek tekrarlama sıklığı ve ileri evre tümöre ilerleme riskinin olması, araştırmacıları bu hastalığa ait prognostik etmenlerin belirlenmesi amacıyla yoğun çalışmalar yapmaya yöneltmiştir. Prognostik etmenlerin belirlenmesi, riskli grupların saptanması ve bu gruplara uygun tedavi seçeneklerinin ortaya konulması açısından büyük önem taşımaktadır ⁶. Konuya ilişkin yapılan pek çok klinik ve patolojik araştırma sonucu elde edilen bilgilerin ışığı altında bugün için var olan yöntemlerin, hastaların bireysel olarak prognozunu saptamada tam olarak güvenilir olmadığı görülmektedir. Buna karşın, bir grup olarak tümörler ele alındığında bazı çıkarımlarda bulunmak mümkün olmaktadır. Örneğin tümörün tekrarlama yönünden en önemli bağımsız risk faktörlerinden birisi, tümörün birden çok sayıda oluşudur ⁴. Tümör evresi ise hastalığın ileri evre hastalık haline gelmesi yönünden en önemli prognostik etmen olarak görünmektedir ⁴. Tümör derecesi (grade) bir diğer önemli prognostik etmendir. Bu bir histolojik bulgu olup, 1922 yılından bu yana mesane tümörlerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır ⁷. Tümör derecesinin prognostik değerini kısıtlayan en büyük etken, aynı tümörde farklı patolojiler tarafından farklı değerlendirmelerin yapılmasıdır ⁸. Tümör evre ve derecesinin birlikte kullanıldığı durumlarda, tümör tekrarı ve hastalığın ileri evre hastalık haline gelmesi yönünden, prognostik önemleri çok daha belirginlik kazanmaktadır ⁹.

Hastalığın prognozunu etkileyen diğer bir faktör ise alınan random biyopsilerde neoplastik değişimin saptanmasıdır. Normal görünen mukozadan alınan random biyopsi sonuçlarının tümörün tekrarlama üzerine olan etkisi çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur ¹⁰⁻¹³.

Belirtilen bütün bu prognostik etmenlerin önemi göreceli olup, hastadan hastaya değişiklik göstermektedir ¹⁴. Bu nedendir ki sayılan tüm bu tümör özellikleri, tek tek hastaların prognozunu ne olacağının saptanmasını her zaman tam olarak sağlayamamakta, daha güvenilir prognostik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır ¹⁴. Son yıllarda, içinde mesane tümörlerinin de yer aldığı değişik kanserler üzerinde yoğunlaştırılan moleküler biyolojik çalışmalar sonucunda, büyüme faktörlerinin, onkogenlerin, kromozom kayıplarının ve tümör süpresör genlerin prognostik önemi konusunda önemli bilgiler sağlanmıştır.

Büyüme faktörleri ve büyüme faktör reseptörleri, onkolojide son yıllarda üzerinde en fazla durulan alanlardan birini oluşturmaktadır. Büyüme faktörlerinin en önemlilerini oluşturan Epidermal Büyüme Faktörü, Transforming Büyüme Faktörü Alfa ve bu iki faktörün bağlanarak etkilerini gösterdikleri Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü'nün mesane tümörlerinin oluşumu ve prognozunda ki önemini bildiren pek çok çalışma yapılmış olmakla beraber bu etkinin hangi mekanizma ile ortaya çıktığı tam olarak belirlenememiştir ¹⁵⁻²².

Bu çalışmada, büyüme faktörleri olan *Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor; EGF)* ve *Transforming Büyüme Faktörü α (Transforming Growth Factor α ; TGF α)*, ile bu faktörlerin bağlanarak etkilerini gösterdikleri *Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR)*'nün, yüzeysel mesane tümörlerindeki ekspresyonu ve elde edilen verilerin söz konusu tümörlerin prognozunu saptamada ne derece etkili olduğu, diğer prognostik parametreler ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Uzun zamandır bilinen bir gerçek, neoplastik transformasyona uğramış hücre kültürlerinin, transforme olmamış hücre kültürlerine oranla, büyüme faktörlerinin temel kaynağı olan seruma, çok daha düşük konsantrasyonlarda ihtiyaç göstermesidir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinin kendi sınırsız büyümelerini desteklemek üzere, büyüme faktörlerini sentezleyip, salgıladıkları gösterilmiştir^{23,24}.

Bu büyüme faktörlerinin en önemlilerinden birisi Epidermal Büyüme Faktörü'dür. Epidermal Büyüme Faktörünün (EGF), ilk olarak tanımlanmasından bu yana bir düzineden daha fazla, polipeptid yapıda büyüme faktörü saptanmıştır, Bu büyüme faktörlerinin hepsi değişik hücre kültürlerinde hücre çoğalmasını arttırıcı özelliğe sahiptirler. Büyüme faktörlerinin fizyolojik rolleri tam olarak bilinmemekle beraber, embriyogenez süresince hücre çoğalması ve/veya farklılaşmasının düzenlenmesinde, büyüme ve yara iyileşmesinde rolleri olduğuna inanılmaktadır²⁵⁻²⁹. Büyüme faktörleri hedef hücrelerdeki mitojenik etkilerini, hücre yüzeyinde yer alan özel reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirirler. EGF ilk sentez edildiğinde 13.000 dalton ağırlığındadır. Daha sonra proteolitik yıkım sonucu aktif şekli olan 6.000 dalton molekül ağırlığında, yapısında 3 disülfid köprüsü içeren, 53 amino asitten oluşmuş bir peptid zinciri haline gelir³⁰. İlk olarak 1962 yılında Cohen tarafından erkek farelerin submaksiller tükürük bezlerinden izole edilen EGF³¹, Gregory tarafından insan idrarında yüksek miktarda ve biyolojik aktif formunda saptanmış ve pek çok değişik hücre tipinde hücre büyüme ve bölünmesini arttırdığı gösterilmiştir³². EGF'in fizyolojik rolü tam olarak bilinmemekle beraber hücre çoğalmasında, farklılaşmasında, embriyogenez esnasında hücre yaşama kontrolünde ve normal doku dağılımında rol aldığı kabul edilmektedir. İn vitro ortamda EGF çeşitli hücre tiplerinde ve özellikle epitelyal hücrelerde mitozu arttırmaktadır. Deneysel olarak submaksiller bezleri alınan farelerin EGF düzeylerinde bir değişiklik olmaması, EGF'nin pek çok farklı bölgede sentezlendiğini ve parakrin yolla etkisini gösterdiğini düşündürmektedir³³⁻³⁵. EGF'nin in vivo yarılanma ömrü 1.5 dakika olduğundan çok hızlı bir yapım ve yıkım döngüsüne sahiptir³⁶.

Transforming Büyüme Faktörü α (TGF α), yapı olarak EGF'e benzeyen^{37,38} ve aynı reseptöre bağlandığından EGF ile yarışan diğer bir büyüme faktörüdür^{39,40}. Elli amino asit uzunluğundaki insan TGF α 'sı, 160 amino asitten oluşmuş olan prekürsörünün proteolizi sonucunda aktif hale gelmektedir³⁸. Retrovirüslerin, yada

kimyasal ajanların etkisi sonucu transformasyona uğramış veya spontan transformasyon gösteren hücre kültürlerinden çevre ortama TGF α salınımının olduğu gösterilmiştir ⁴¹. Fetusun gelişimi esnasında TGF α sentezi olduğunu gösteren bulgular olmasına karşın, bilinen hiçbir normal erişkin hücre TGF α salgılamamaktadır ^{42,43}. Bu bulgularla TGF α 'nın, EGF'nin embriyonik versiyonu olarak fonksiyon gösterdiği sonucuna varılmıştır ⁴⁴. TGF α 'nın değişik tümör hücreleri tarafından salgılanması, bu büyüme faktörünün hücre transformasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Sporn ve arkadaşları TGF α ve diğer büyüme faktörlerinin tümör oluşumunda oynadıkları rolün otokrin bir mekanizma ile ortaya çıktığını, yani, belirtilen faktörleri sentezleyip salgılayan transforme hücre kültürlerinin, bu yolla kendi varlıklarının devamını sağladıklarını bildirmişlerdir ^{32,45}.

Polipeptid hormonlar ve büyüme faktörleri, hücre çoğalması üzerindeki etkilerini, özel yapıda olan reseptörleri aracılığı ile yaparlar. Hücre çoğalmasının temelinde yatan mekanizmayı anlamak için öncelikle bu reseptörlerin yapısal ve işlevsel organizasyonunu ve ortaya çıkan ikincil iletilicileri (secondary messenger) anlamak gerekir. Büyüme reseptörleri bir veya daha çok faktörün bağlanabileceği bölgeleri içeren hücre dışı bölüm, hidrofobik transmembran bölümü ve hücre içi bölüm olmak üzere üç parçadan oluşmaktadır. Büyüme faktör reseptörleri iki gruba ayrılabilir.

I- Tirozin kinaz aktivitesi gösteren reseptörler; EGF- TGF α , Platelet-derived growth factor, Fibroblast growth factor ve Insulin-like growth factor reseptörleri bu gruptadır ve herbirinin yapısal ve işlevsel özellikleri birbirine benzemektedir.

II- Protein G üzerinden etkilerini gösteren reseptörler; trombin, vasopressin, serotonin, bombesin ve angiotensin reseptörleri .

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), molekül ağırlığı 175.000 dalton olan, 1186 amino asitten oluşmuş bir trans-membran glikoproteindir ve üç parçadan oluşmaktadır ^{46,47}. Hücre dışı kısmı sisteinden zengin iki bölge içermekte olup, bu bölgeler EGF ve TGF α gibi büyüme faktörlerinin bağlandıkları bölgelerdir. Büyüme faktörünün bağlanması ile reseptörün yapısında değişiklik olur. Reseptörün hidrofobik transmembran bölümünü oluşturan 23 amino asitlik parçanın yegane görevi reseptörün hücre yüzeyinde yer almasını sağlamaktır, zira bu bölümde meydana gelen

mutasyonlar reseptörün işlevi üzerinde bir değişikliğe yol açmaz ⁴⁴. Reseptörün hücre içi kısmı ise üç farklı bölgeden meydana gelmektedir;

a) Plasma membranının iç yüzünde yerleşmiş olan 40 amino asitten meydana gelmiş parça, fosfatidilinositol-4-monofosfat kinaz ve fosfatidilinositolkinaz enzimleri ile etkileşim içindedir. Her iki lipid kinazlar fosfoinositid yapımından sorumlu olup, oluşan fosfoinositid, fosfolipaz C enzimi tarafından fosfat inositol ve diacil gliserol yapımında kullanılır. EGF'ün reseptör ile bağlanması sonucu, her iki lipid kinaz, EGFR tarafından fosforilize edilerek aktif hale getirilir. Bu etkileşim sonucu ikincil iletiler ortaya çıkar ve yukarıda sözü edilen enzimler fosforilize edilerek aktif hale geçer. Bu aktivasyonun sonucu olarak enzimler hücre fonksiyonları etkilerken, ortaya çıkan ikincil iletiler hücre çekirdeğinde bulunan DNA'nın özel bölgelerine bağlanarak gen transkripsiyonunu artırır ve hücre çoğalmasına yol açarlar.

b) Elli amino asitten oluşan diğer bir parça ise, katalitik parçanın hemen arkasında yer alır ve reseptörün ligand ile bağlanmasından sonra hücre içine alınıp yıkımından sorumludur (down regulation).

c) Reseptörün karboksil ucunda yer alan 164 amino asitten oluşan kısım benzer şekilde, reseptörün katalitik aktivitesini ve hücre içine alınmasını düzenler ⁴⁸.

EGFR pekçok değişik hücre tipinde, insan tümörlerinde ve kanser hücre kültürlerinde saptanmıştır. Artmış reseptör düzeyleri meme kanserinde ^{49,50}, gliomada ⁵¹, akciğer kanserinde ⁵², mesane kanserinde ^{53,54} ve kadın genital organ tümörlerinde ^{20,55,56} belirlenmiştir. Sağlıklı ve malignite dışı patoloji bulunan üroepitelde yalnızca bazal tabaka hücrelerinde saptanan EGFR, düşük dereceli değişici epitel hücreli karsinom olgularının % 92.3'ünde ve yüksek dereceli kanser olgularının %100'ünde yüzeysel hücre tabakalarında da belirlenmiştir ¹⁶. EGFR normal üroepitelde yer aldığı halde, neden bazı durumlarda tümöral oluşuma bir geçiş olduğu halen araştırma konusudur. Normal üroepitelde var olan reseptörlerin, idrarda yer alan EGF'e karşı daha az duyarlı olmaları öne sürülen sebeplerden bir tanesidir. Bunun olası nedenlerinden biri, idrarda var olan büyüme faktörlerinin etkilerini arttıracak diğer büyüme faktörlerinin ortamda yer almamasıdır. Oysa, değişici epitel hücreli karsinom olgularında kanser dokusunun, benzer koşullar altında, EGF'e çok daha kuvvetli yanıt vermesi, bir çeşit otonomi kazanmasına bağlı olabilir. Araştırmalar sonucu elde edilen veriler, kanser hücreleri tarafından hücre çoğalmasını arttırıcı başka büyüme faktörlerinin sentez ve salınımı sonucu olarak bu olayın ortaya çıktığını düşündürmektedir ^{57,58}.

Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR) ekspresyonunun, tümör evresi ile ilişkili olarak arttığının gösterilmesinden ²¹ sonra, yüzeysel mesane tümörlerinin progresyonu ve tekrarlaması üzerinde EGFR ekspresyon düzeyinin önemli olduğuna dair çalışmalar yapılmıştır ⁵⁹. Bu çalışmalarda EGFR ekspresyonundaki artışın, tümör hücrelerinin genetik düzensizliğine bağlı olarak, geç dönemde ortaya çıktığı belirlenmiştir ⁶⁰. Gullick ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada EGFR ekspresyonunun arttığı olgularda, Transforming Büyüme Faktörü α 'da da artma olduğu gösterilmiştir ⁶⁰. Theodorescu ve arkadaşları artmış EGFR ekspresyonu olan hücrelerin, Epidermal Büyüme Faktörünün mitojenik etkilerine karşı daha fazla duyarlı olduğunu göstermişlerdir ⁶¹. EGFR'ın mesane kanserlerinde ki prognostik önemini bildiren pek çok çalışma olmasına karşın, EGF ve TGF α 'nın mesane kanserlerinde ki prognostik önemini gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile mesane tümörlerinde söz konusu büyüme faktörleri ve reseptörlerinin prognoz açısından etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvurarak Eylül 1989 ile Haziran 1994 tarihleri arasında ilk kez mesane tümörü tanısı alan ve tedavileri bu merkezde yapılan, en az 12 aylık izlemleri olan hastalar retrospektif olarak çalışma kapsamına alındı. Bu hastaların arşiv dosyaları incelendi ve çalışma grubu, yeterli bilgileri içerenler arasından seçildi. Aynı hastaların tümörlerinin patolojik incelemesi için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan doku kesitleri ve parafin blokları kullanıldı.

Hastaların tümörlerinin evrelendirmesi UICC (Union Internationale Contre le Cancer)'nin tanımladığı TNM sınıflandırma sistemi kriterlerine göre yapıldı ⁶².

Tümörlerin histolojik derecelendirilmesi, Mostofi sistemine göre yapıldı ⁶³. Bu sisteme göre tümörler I ile III arasında derecelendirildi. Çalışma grubuna sadece değişici epitel hücreli kanser olguları alındı.

Primer tümör tedavisi, yüzeysel mesane tümörlerinde ilk adım olarak endoskopik rezeksiyon (TUR-mt) ile sağlandı. Hastalar genel anestezi altında iken, rezeksiyona başlanmadan önce pelvik bimanuel muayene yapıldı. Endoskopik girişim esnasında, mesanenin normal görünen duvarlarından, ayrıca şüpheli alanlardan "cold punch" biyopsiler alındı. Rezeksiyonu takiben, tümörün tamamen rezekte edildiğinden emin olmak ve patolojik evreyi kesinleştirmek için tümör tabanından ve tümör komşuluğundan da "cold punch" biyopsi alındı.

Hastaların izlemi ilk yıl 3 ayda bir, ikinci yıl 6 ayda bir ve daha sonra da yılda bir kontrol sistoskopileri yapılarak sağlandı. Kontrol sistoskopilerinde tümör saptanması halinde yukarıda sıralanan işlemler aynen tekrarlandı. Görülmemesi halinde ise random "cold punch" biyopsiler alındı.

Hastalarımızın bu çalışma için prognostik olarak değerlendirilen parametreleri Tablo 1'de belirtilmiştir. İncelenen parametreler arasında başlıca iki grup ilişki araştırılmaya çalışılmıştır;

1- EGFR, EGF ve TGF α ekspresyonu ile tümöre ait morfolojik ve histolojik özellikler arasındaki ilişki; primer tümörün boyutu, primer tümör sayısı, primer tümörün derecesi ve primer tümöre eşlik eden histopatolojik değişiklikler (karsinoma in situ, displazi, skuamöz metaplazi, vasküler invazyon).

2- EGFR, EGF ve TGF α düzeyleri ile tümör davranışı arasındaki ilişki: tümör tekrarı, ilk tümör tekrarına kadar geçen süre, tekrar sıklığı, derece artışı, evre artışı.

Hasta grubu içinde hiç karsinoma in situ olgusu yoktu. Birden fazla tümörü olan hastalarda en büyük tümörün boyutları dikkate alındı. Tümör tekrar oranı, hastalarda izlem süresi içinde tümör saptanan sistoskopi sayısının izlem süresine bölünmesi ile hesaplanan değerin % olarak ifade edilmesi ile belirlendi⁶⁴.

Tablo. 1. Hastalarımızda incelediğimiz parametreler.

1- Yaş, Cinsiyet
2- İlk tümör büyüklüğü (cm)
3- İlk tümör sayısı
4- İlk tümör derecesi
5- İlk tümöre ek anomali (karsinoma in situ, displazi, skuamöz metaplazi)
6- Tümör tekrarı (var/yok)
7- Tümör tekrarına kadar geçen süre (ay)
8- Tümör tekrar sıklığı
9- Tekrarlayan tümörün derecesi
10- Tekrarlayan tümörün evresi
11- İzlem süresi

Patolojik Çalışma

Çalışma grubundaki hastalara ait parafin bloklardan alınan seri kesitlerden bir tanesi hematoksilin eosin ile boyanarak çalışma grubuna alınan hastaların tümörleri yeniden değerlendirilerek karakterize edildi. Çalışma kapsamına, pozitif kontrol olarak, EGFR için prostat dokusu ve EGF için parotis bezi dokusu ile 3 adet normal mesane mukozası dahil edildi.

İmmünohistokimyasal Çalışma

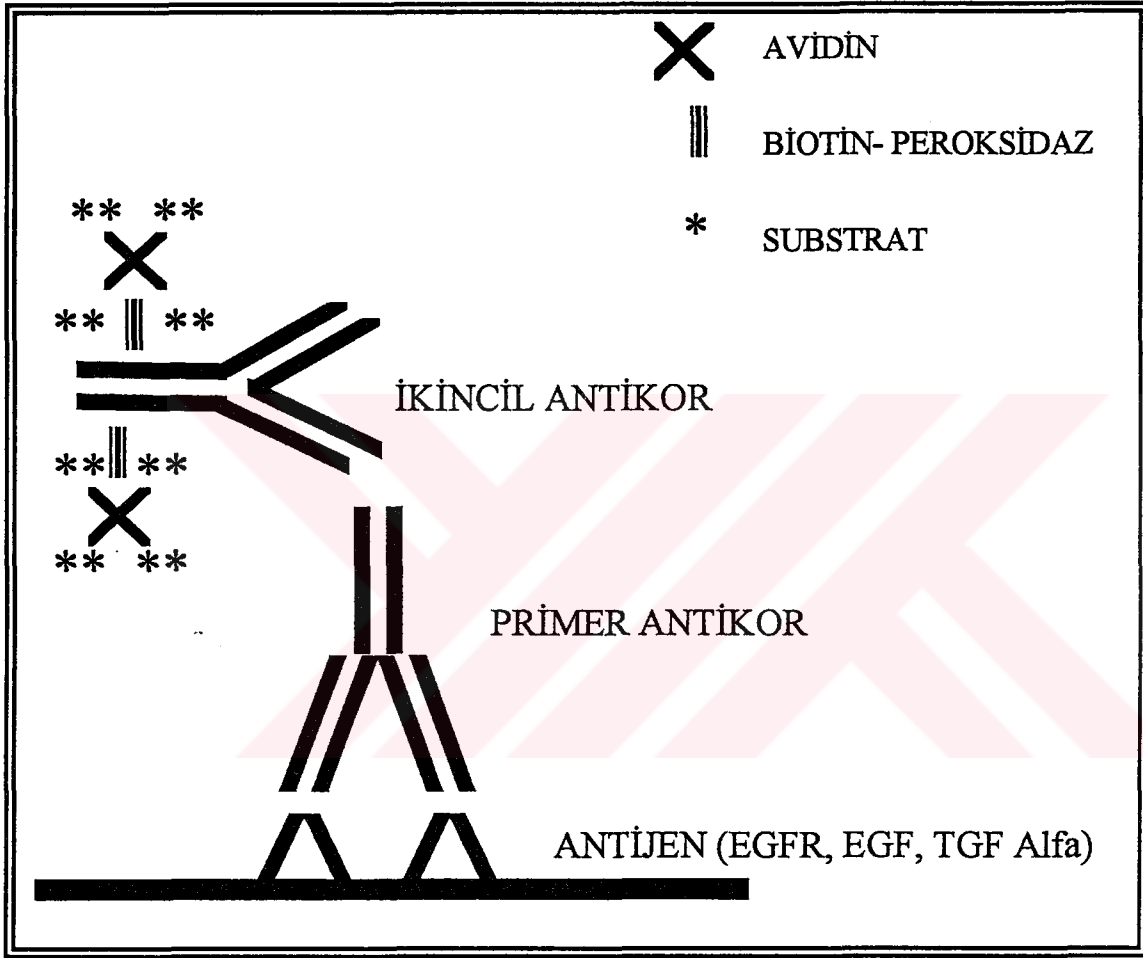
Parafin bloklardaki dokulardan elde edilen kesitler Poly-L-Lysin ile kaplı lamalar üzerine yapıştırıldı. İmmünohistokimyasal belirleme için Oncogene Science (OSI®) firmasınca üretilen antikor ve diğer araçlar kullanıldı. Uygulanan yöntem, ilk kez 1981 yılında ortaya çıkan ve bir indirekt immünperoksidaz tekniği olan avidin-biotin-peroksidaz kompleks (ABC) yöntemidir⁶⁵. Bu yöntemin simgesel olarak ayrıntısı Şekil. 1'de gösterilmiştir. Bu çalışmada izlediğimiz yöntem ise EGFR ve EGF-TGF α için ayrı ayrı olmak üzere Tablo 2 ve Tablo 3'de gösterilmiştir.

OSI® immünohistokimyasal çalışma sistemleri, EGFR, EGF ve TGF α 'nın, doku kesitlerindeki lokalizasyonunu belirler. Özetle, immünperoksidaz boyanma için, parafin doku kesitleri ilk olarak OSI®, primer antikorlar [EGFR (Ab-4), poliklonal tavşan IgG; EGF (Ab-3), poliklonal tavşan IgG; TGF α (Ab-2), monoklonal fare IgG_{2a}] ile inkübe edildi. Dokuya bağlanan primer antikorlar, biotin ile işaretlenmiş, at veya tavşanlarda oluşturulmuş olan sekonder antikorlar ile inkübe edildikten sonra, hazırlanan avidin-biotin horseradish peroksidaz makromoleküler kompleks ve substrat ile reaksiyona sokuldu. Bu yöntem ABC tekniği olarak adlandırılmakta olup, var olan en duyarlı immünperoksidaz yöntemidir. Ayrıca, negatif kontrol olarak OSI® negatif kontrol antikorunu kullanıldı.

EGFR'nin benign prostat dokusunda yoğun olarak bulunması⁶⁶ ve EGF için ise tükürük bezlerinin en önemli kaynaklardan birini oluşturması nedeni ile bu dokular pozitif kontrol olarak kullanıldı.^{30,31}

EGFR, EGF ve TGF α 'nın mesane tümör kesitlerindeki değerlendirmesi dört kategori üzerinden yapıldı; 0 = hiç boyanma olmaması, 1 = zayıf boyanma, 2 = orta derecede boyanma, 3 = kuvvetli boyanma, olarak sınıflandırıldı.

İstatistiksel değerlendirme "Student t Test" ve "ANOVA" testleri ile yapıldı.



Şekil 1. Avidin-biotin-peroksidaz kompleks yönteminin şematik gösterimi

Tablo. 2. EGFR'n immünohistokimyasal olarak "OSI® Avidin-biotin-peroksidaz" yöntemi ile belirlenmesi (boyanması) için uygulanan yöntem.

Parafin bloklardan 5 mikronluk kesitler alınarak lamlar üzerine yapıştırılması,
Lamların kuru fırın üzerinde, 60 °C'de 10 dakika bekletilmesi,
Oda sıcaklığında 3 defa 10 dakika süre ile ksilol solüsyonunda bekletme,
2 defa 10 dakika süre ile absolü alkolde bekletme,
2 defa 10 dakika süre ile % 95 alkolde bekletme,
Distile su ile yıkama,
5 dakika süre ile %0.1 H₂O₂ / Di H₂O çözeltisinde bekletme,
Fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
5 dakika süre ile oda sıcaklığında %0.1 tripsin ile enzimatik işleme tabi tutulması,
3 defa 2 dakika süre ile fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
Lamların üzerine doku kesitlerini kapatacak şekilde blokan serum damlatılıp, oda sıcaklığında 20 dakika bekletme,
2 defa 5 dakika süre ile fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
Lamların üzerine doku kesitlerini kapatacak şekilde 1/100 sulandırılmış primer antikor damlatılıp,
4 °C'de 6 saat, nemli ve karanlık ortamda bekletme,
3 defa 5 dakika süre ile fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
Lamların üzerine biotin bağlanmış ikincil antikor damlatılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletme,
3 defa 5 dakika süre ile fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
Lamların üzerine avidin-biotin-horseradish perodofaidase kompleksi damlatılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletme,
5 dakika fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
Lamların üzerine diaminobenzidin damlatılıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletme,
Distile su ile yıkama,
Mayer'in hematoksileni ile 5 dakika süre ile zıt boyama yapma,
Distile su ile yıkama,
1 dakika % 95 alkolde bekletme,
1 dakika absolü alkolde bekletme,
1 dakika ksilol solüsyonunda bekletme,
Lamların hava ile kurutulması,
Lamların suda erimeyen kapama maddesi ve lamel kapatılarak mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmesi.

Tablo. 3. EGF ve TGF α 'ın immünohistokimyasal olarak "OSI® Avidin-biotin-peroksidaz" yöntemi ile belirlenmesi (boyanması) için uygulanan yöntem.

Parafin bloklardan 5 mikronluk kesitler alınarak lamalar üzerine yapıştırılması,
Lamların kuru fırın üzerinde, 60 °C'de 10 dakika bekletilmesi,
Oda sıcaklığında 3 defa 10 dakika süre ile ksilol solüsyonunda bekletme,
2 defa 10 dakika süre ile absötü alkolde bekletme,
2 defa 10 dakika süre ile % 95 alkolde bekletme,
Distile su ile yıkama,
5 dakika süre ile %0.1 H₂O₂ / Di H₂O çözeltisinde bekletme,
Fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
5 dakika süre ile oda sıcaklığında %0.1 tripsin ile enzimatik işleme tabi tutulması,
3 defa 2 dakika süre ile fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
Lamların üzerine doku kesitlerini kapatacak şekilde blokan serum damlatılıp, oda sıcaklığında 20 dakika bekletme,
2 defa 5 dakika süre ile fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
Lamların üzerine doku kesitlerini kapatacak şekilde 1/50 sulandırılmış primer antikor damlatılıp,
4 °C'de 16 saat, nemli ve karanlık ortamda bekletme,
3 defa 5 dakika süre ile fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
Lamların üzerine biotin bağlanmış ikincil antikor damlatılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletme,
3 defa 5 dakika süre ile fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
Lamların üzerine avidin-biotin-horseradish perodofaidase kompleksi damlatılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletme,
5 dakika fosfat tampon çözeltisinde yıkama,
Lamların üzerine diaminobenzidin damlatılıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletme,
Distile su ile yıkama,
Mayer'in hematoksileni ile 5 dakika süre ile zıt boyama yapma,
Distile su ile yıkama,
1 dakika % 95 alkolde bekletme,
1 dakika absötü alkolde bekletme,
1 dakika ksilol solüsyonunda bekletme,
Lamların hava ile kurutulması,
Lamların suda erimeyen kapama maddesi ve lamel kapatılarak mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmesi.

BULGULAR

Çalışma grubunda yer alan 21 hastanın 17'si erkek, 4'ü kadındı. Hastaların yaşları ortalama 65 ± 12.9 (34 - 90) idi. Hastalar ortalama olarak 22.8 (12 - 54) ay izlendi. Hastalardan yedisinde tek tümör saptanırken (%33) , 14 hastada birden çok tümör rezeke edildi (%66). Rezeke edilen tümörlerin boyutları 1 ile 5 cm arasında değişmekte idi (ort. 2.6 cm). Rezeksiyon sonrası uygulanan tedaviler Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4 Rezeksiyon sonrası uygulanan tedavi yöntemlerinin dağılımı.

Tedavi Yöntemi	Hasta Sayısı	(%)
İzlem	7	(33)
İntravezikal Epirubicin	8	(38)
İntravezikal BCG	4	(19)
İntravezikal Epirubicin + Interferon α	2	(10)

Çalışma kapsamına alınan tümör örneklerinin yinelenen histopatolojik değerlendirilmesi sonucunda, çalışmaya alınan 21 hastanın tümünde lamina propria tutulumunun olduğu (pT1) saptandı. On hastada tümör derecesi 2 (G2) olarak saptanırken (% 48), 11 hastada tümör derecesi 3 (G3) olarak saptandı (% 52). Hastaların takipleri esnasında toplam 9 hastada tümör tekrarı olduğu gözlemlendi (% 43). Üç hastada tümör iki defa tekrarladı. Tümör tekrarı, ilk tümör derecesi 2 olan hastaların % 40'ında (4/10) ve ilk tümör derecesi 3 olan hastaların % 45'inde (5/11) saptandı (p=0.83).

Tümör tekrarı erkek hastaların % 35'inde (6/17) görülürken, kadın hastalarda bu oran % 75 (3/4) olarak saptandı (p=0.37).

Tümör tekrarı olan hastalarda ortalama yaş 66.4 iken tekrar olmayan olgularda yaş ortalaması 62.0 olarak saptandı (p=0.45)

İlk tümörü soliter olan hastalarda tümör tekrar oranı % 50 (7/14) iken, birden çok tümörü olan hastalarda bu oran % 29 (2/7) olarak bulundu.

Toplam 9 hastamızda tümör boyutu 3 cm ve daha büyük iken, 12 hastada tümör 3 cm'den daha küçük idi. Tümör boyutu 3 cm ve daha büyük olanlarda tümör tekrar oranı % 56 (5/9) iken, tümör boyutu 3 cm'den daha küçük olanlarda tümör tekrar oranı % 33 (4/12) olarak saptandı ($p=0.54$).

İmmünohistokimyasal yöntem ile büyüme faktörlerinin ve reseptörünün (EGF, TGF α ve EGFR), tümör hücrelerindeki ekspresyonu değerlendirildi. Tümörlerin heterojenitesine bağlı olarak, aynı tümörün farklı bölümlerinde farklı derecede boyanma olduğu görülerek, her üç parametrenin ekspresyonu, boyanma kuvvetine ve boyanan hücre yüzdesine göre ifade edildi. Her üç parametrenin, çalışılan tümörlere göre dağılımı Tablo 5'de gösterilmiştir.

Bu araştırmada immünohistokimyasal çalışma sonucu, tümör örneklerinde saptanan en kuvvetli boyanma, tümörün ekspresyon değeri olarak kabul edildi.

Çalışma kapsamına alınan olguların % 100'ünde (21/21) EGFR kuvvetli boyanma gösterirken (Şekil 2,3), bu oran EGF için % 48 (10/21) ve TGF α için % 48 (10/21) olarak hesaplandı. Tümörlerin histolojik dereceleri göz önüne alındığında, G2 ve G3 tümörler arasında, büyüme faktörleri ve reseptör ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Kuvvetli EGF ekspresyonu gösteren 10 olgunun 8'inde (% 80) tümör tekrarı gözlenirken, kuvvetli ekspresyon olmayan 11 olgunun yalnızca 1 tanesinde (% 9) tümör tekrarı saptandı. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık saptandı ($p<0.005$). Benzer şekilde, kuvvetli TGF α ekspresyonu saptanan 10 olgunun 8'inde tümör tekrarı gözlenirken, kuvvetli TGF α ekspresyonu saptanmayan 11 olgunun 1 tanesinde (% 9) tümör tekrarı saptandı. Bu iki grup arasında da istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık saptandı ($p<0.005$).

Tümör tekrarı yönünden değerlendirildiğinde, tümör tekrarı gösteren olguların % 89'da (8/9) kuvvetli (3+) EGF ekspresyonu saptanırken (Şekil 4,5), tümör tekrarı görülmeyen olgularda bu değer % 17 (2/12) olarak saptandı. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). TGF α ekspresyonu değerlendirildiğinde, tümör tekrarı bulunan olgularda kuvvetli (3+) boyanma (Şekil 6,7) olguların % 89'da (8/9) saptanırken, tümör tekrarı olmayan olgularda bu oran % 17 (2/12) olarak bulundu. EGF ile boyanmada olduğu gibi iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptandı ($p<0.05$).

İncelenen tümörlerin büyük bir bölümünde özellikle büyüme faktörlerinin ekspresyonunun oldukça heterojen bir yapı gösterdiği saptandı. Bu nedenle, protein ekspresyonunun genel düzeyinin tam olarak saptanabilmesi ve tümörlerde gözlenen reseptör ve büyüme faktörleri ekspresyonundaki heterojeniteden (Şekil 8,9) kaynaklanan değerlendirme problemlerini ortadan kaldırmak üzere, boyanan hücrelerin yüzdesi ve bu hücrelerin boyanma yoğunluklarının bir arada değerlendirilebilmesi için, her iki değişkenin bir arada ağırlığını yansıtan bir yöntem geliştirildi. Buna göre hesaplanan Boyanma Katsayısı'nın diğer prognostik faktörler ile ilişkisi Tablo. 6'da gösterilmiştir. Tümör tekrarı olan olguların % 67'inde (6/9), EGFR, "Boyanma Katsayısı" 2 ve daha fazla iken, bu oran tümör tekrarı olmayan olgularda da % 67 (8/12) olarak bulundu. Tümör tekrarı olan olguların % 89'unda (8/9) EGF Boyanma Katsayısı 0-1 arasında iken, tekrar olmayan olgularda bu değer % 67 (8/12) olarak hesaplandı (p=0.51).

Tümör tekrarı olan olguların % 89'unda (8/9) TGF α Boyanma Katsayısı 0-1 arasında iken, tümör tekrarı olmayan olgularda % 75 (9/12) olarak bulundu (p=0.81).

EGF ve TGF α Boyanma Katsayıları, birlikte değerlendirildiğinde; tümör tekrarı olan olguların % 78'inde (7/9) EGF + TGF α < 1 iken, tümör tekrarı olmayan olgularda bu değer % 42 (5/12) olarak bulundu (p=0.23).

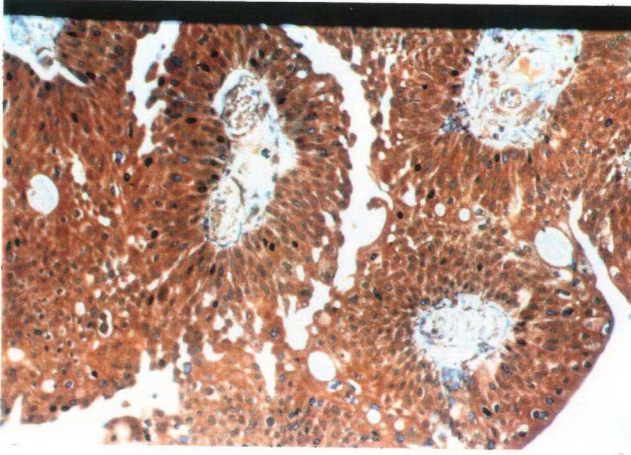
İlk tümör boyut ve sayısı ile, çalışılan EGFR, EGF ve TGF α ekspresyonu sonuçları arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı (p>0.05)

Değerlendirmeler sırasında bazı tümörlerde stromada ve damar çeperinde de büyüme faktörü ekspresyonu olduğu gözlemlendi. Bu nedenle EGFR, EGF ve TGF α ekspresyonu, tümör hücrelerinde değerlendirildikten sonra, EGF ve TGF α ekspresyonu ayrı bir değerlendirme ile tümör stromasında ve damar duvarında da incelendi. Çalışma grubuna alınan olguların % 52'inde (11/21), stroma ve/veya damar duvarında EGF ve % 38'inde (8/21) TGF α ekspresyonunun olduğu saptandı (Şekil 10,11,12). Gerek EGF, gerekse TGF α ekspresyonu ile, tümör evre, derece, boyut, sayı ve nüks oranı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Stroma ve damar duvarında ki EGF ve TGF α ekspresyonu ile, tümör tekrar ilişkisi Tablo. 7'de gösterilmiştir.

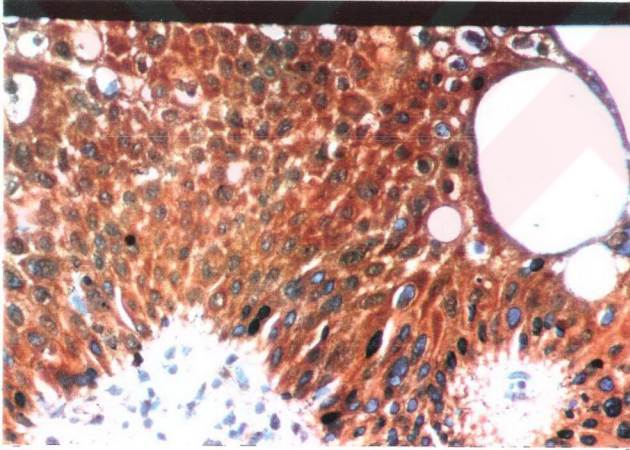
Kontrol grubu olarak alınan normal mesane dokusunda, EGFR ekspresyonunun değerlendirilmesinde, yüzeysel epitel hücrelerinde (3+) boyanma saptanırken, bazal tabaka hücrelerinde (1+) boyanma saptandı. EGF, alınan kontrol grubunda, gerek mukozada, gerekse stromada (1+) boyanma gösterdi. TGF α ise

normal mesane mukoza ve stromasında boyanma olmadı. Negatif kontrol antikoru ile yapılan boyamalar tümör dokularında boyanma olmadığı gözlemlendi (Şekil 13,14,15).

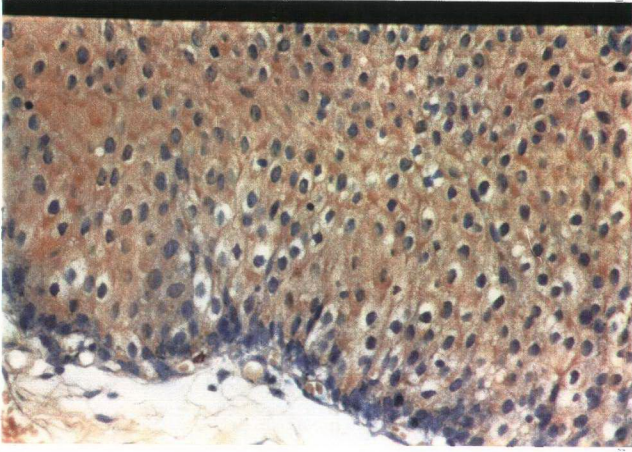




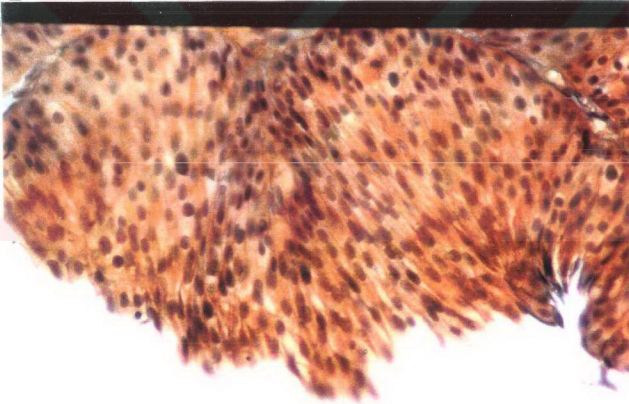
ŞEKİL 2. T1G3 Tümörde (3+) EGFR Boyanması. x 200



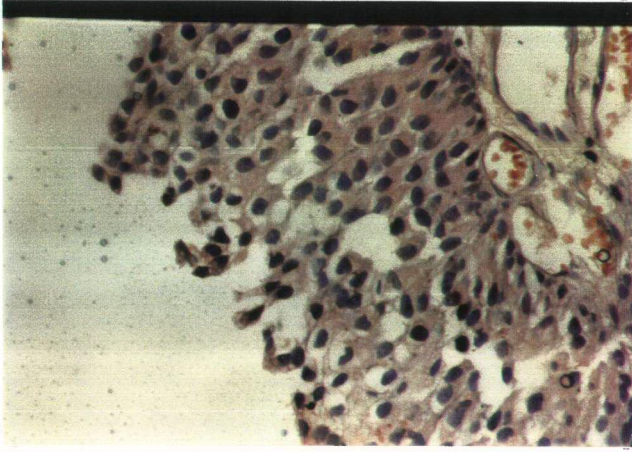
ŞEKİL 3. T1G3 Tümörde (3+) EGFR Boyanması. x 400



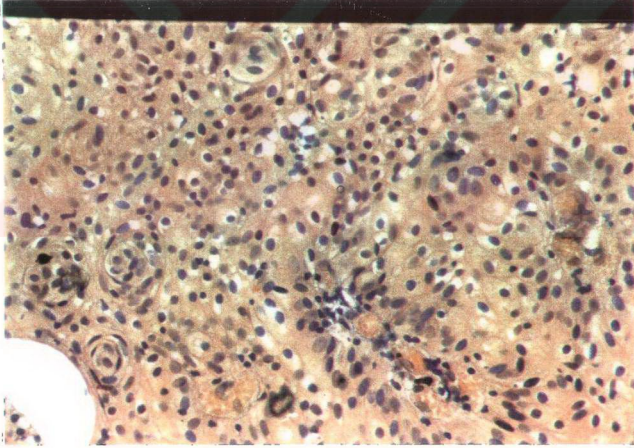
ŞEKİL 4. T1G2 Tümörde (2+) EGF Boyanması. x 200



ŞEKİL 5. T1G2 Tümörde (3+) EGF Boyanması. x 400



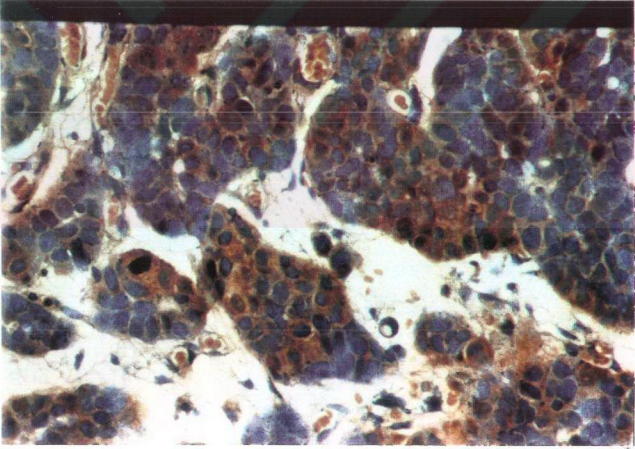
ŞEKİL 6. T1G3 Tümörde (1+) TGF α Boyanması. x 400



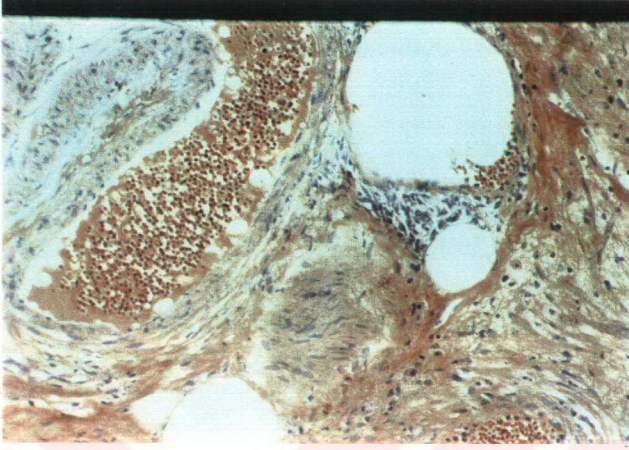
ŞEKİL 7. T1G2 Tümörde (2+) TGF α Boyanması. x 200



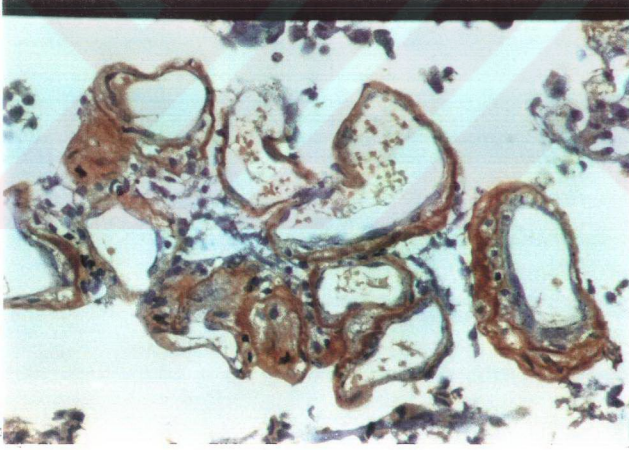
ŞEKİL 8. T1G3 Tümörde Heterojen EGFR Boyanması. x 400



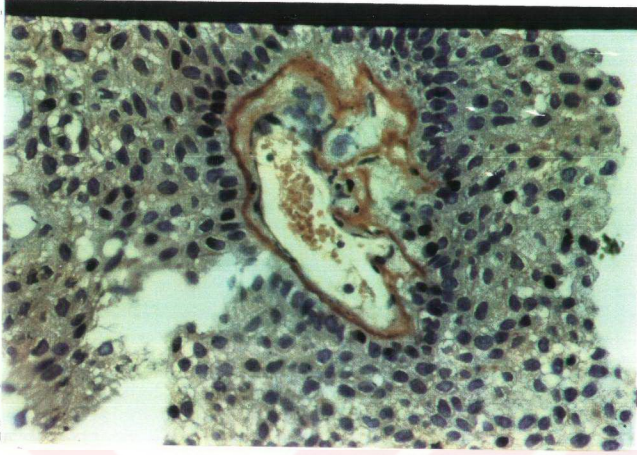
ŞEKİL 9. T1G3 Tümörde Heterojen EGFR Boyanması. x 400



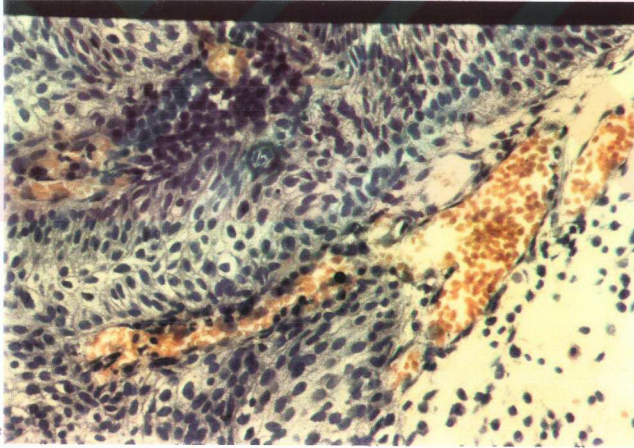
ŞEKİL 10. T1G3 Tümör Stromasında TGF α Boyanması. x 100



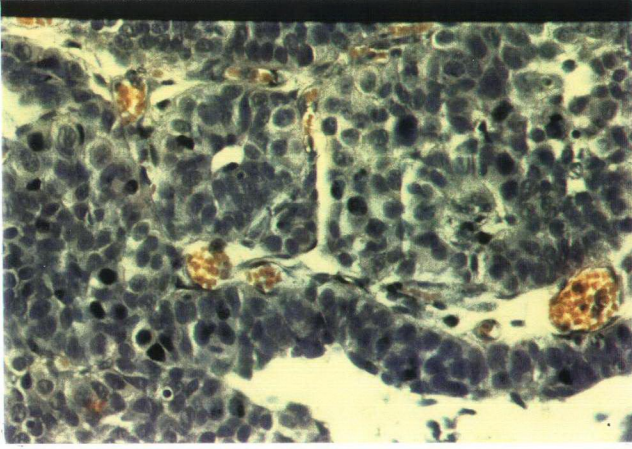
ŞEKİL 11. T1G3 Damar Duvarında TGF α Boyanması. x 400



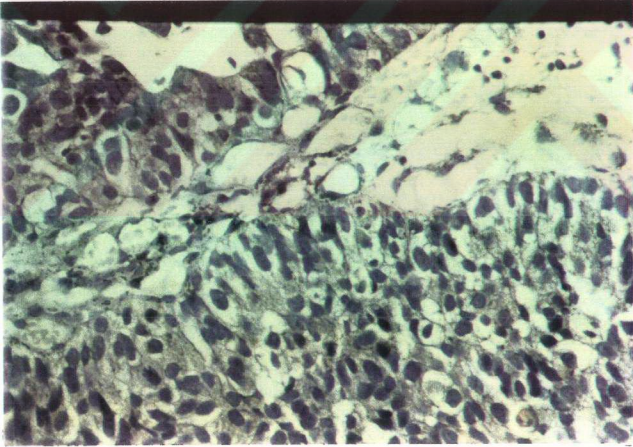
ŞEKİL 12. T1G3 Damar Duvarında EGF Boyanması. x 400



ŞEKİL 13. T1G3 Tümörde EGFR (-) Kontrol Boyanması. x 200



ŞEKİL 14. T1G3 Tümörde EGF (-) Kontrol Boyanması. x 400



ŞEKİL 15. T1G3 Tümörde TGF α (-) Kontrol Boyanması. x 400

Tablo. 6. EGFR, EGF ve TGF α Ekspresyonunun Diğer Prognostik Faktörler ile Karşılaştırılması

Hasta No.	Evre	Derece	Tümör Boyutu (cm)	Tümör Sayısı	EGFR *	EGF *	TGF α *	Tümör Tekrar Oranı %
1	T1	G2	3	1	2.95	2.3	1.2	3
2	T1	G2	1.5	1	1.7	0.56	0.3	3.7
3	T1	G2	2	1	3	0.55	0.5	0
4	T1	G2	2	5	2.2	1.25	1.2	0
5	T1	G2	2	3	2.75	1.6	1.6	0
6	T1	G2	2	4	1.7	0.36	0.33	13.3
7	T1	G2	3	1	2.8	0.02	0.94	5.6
8	T1	G2	3	3	2.1	0.1	0.7	0
9	T1	G2	2	1	2.1	0	0.8	0
10	T1	G2	1	1	2.3	1.1	0.95	0
11	T1	G3	5	1	2.8	1.04	0.84	1.9
12	T1	G3	4	2	3	0.3	0.9	0
13	T1	G3	2	1	3	1.6	0.2	0
14	T1	G3	1	1	2.4	0	0.04	3
15	T1	G3	5	4	2.9	0.7	0.04	5.6
16	T1	G3	2	1	2.95	0.6	1.45	0
17	T1	G3	3	1	1.7	0	0	0
18	T1	G3	4	1	1.5	0.11	0.66	16.7
19	T1	G3	4	1	1.9	0.05	0.05	0
20	T1	G3	1.5	3	1.5	0.1	0.3	0
21	T1	G2	1.5	1	2.55	0.03	0.86	8.3

* Boyanma Katsayısı = $\frac{\text{Boyanma Yoğunluğu} \times \text{Boyanan Hücre Yüzdesi}}{100} = (0 - 3)$

100

Tablo. 7. Stroma ve Damar Duvarının EGF ve TGF α Ekspresyonu ile Tümör Tekrarı İlişkisi

Hasta No.	Evre	Derece	EGF		TGF α		Tümör Tekrar Oranı %
			Stroma	Damar Duvarı	Stroma	Damar Duvarı	
1	T1	G2	+	-	-	-	3
2	T1	G2	-	-	-	-	3.7
3	T1	G2	-	-	-	-	0
4	T1	G2	+	+	-	-	0
5	T1	G2	+	+	+	+	0
6	T1	G2	+	-	+	+	13.3
7	T1	G2	+	+	+	+	5.6
8	T1	G2	+	-	-	-	0
9	T1	G2	-	-	-	+	0
10	T1	G2	-	-	+	-	0
11	T1	G3	-	-	-	-	1.9
12	T1	G3	-	-	-	-	0
13	T1	G3	+	+	-	-	0
14	T1	G3	-	-	-	-	3
15	T1	G3	+	+	-	-	5.6
16	T1	G3	-	-	-	+	0
17	T1	G3	-	-	+	-	0
18	T1	G3	-	+	-	-	16.7
19	T1	G3	-	-	-	-	0
20	T1	G3	-	+	+	+	0
21	T1	G2	-	-	-	-	8.3

TARTIŞMA

Mesane tümörlerinin prognozu büyük ölçüde, ilk tümörün evresine bağlıdır. Kas tabakasının tümör tarafından tutulduğu olgularda hayat beklentisinde önemli bir azalma ortaya çıkmaktadır. Bu grup hasta içinde, derin kas tutulumu olan veya çevre tutulumu olan olgularda prognoz daha da kötüleşmektedir.

Kas tutulumu olmayan olgularda, uzun dönem de prognoz çok daha iyi olmakla birlikte, bu hastaların % 50-80'de tümör tekrarı saptanmaktadır ⁴. Kas tutulumunun ortaya çıktığı tümör tekrarları, bu grup hastalardaki en önemli ölüm nedenidir. Tümörün progresyonunu öngörmek açısından, ilk tümörün lamina propria tutulumu göstermesi (pT1) en önemli unsurdur ^{67,68}. Tümör boyutu, tümör sayısı ve tümörün histolojik derecesi diğer önemli prognostik etmenler olmakla beraber, hiçbiri bu grup hastaların prognozunu belirlemede anlamlı sensitivite ve spesifiteye sahip değildir.

Epidermal Büyüme Faktör Reseptörleri, pekçok değişik hücre tipinde ^{21,58-60} ve sağlıklı üroepitelin bazal hücre tabakası ^{17,52} ile üroepitel hücre kültürlerinde saptanmıştır ¹⁵. Mesanenin değişici epitel hücreli kanserlerinde de EGFR belirlenmiş olup ^{49,52,53}, tümörün artan evre ve histolojik derecesine paralel olarak EGFR ekspresyonunda da artma saptanmıştır. Ayrıca, yüzeysel tümörler ile invaziv tümörler arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ^{15,53}. EGFR ekspresyonu ile tümör boyutu ve tümör sayısı ile tümör tekrar oranı arasında anlamlı ilişki olduğu da bildirilmiştir ²¹.

Bu çalışma ile değerlendirilen toplam 21 hastaya ait tümörlerin hepsinde EGFR kuvvetli boyanma göstermiştir ve bu oran daha önceki çalışmalarda belirtilen % 92.3-100 değerleri ile uyumluluk göstermektedir ¹⁶. Kontrol grubu olarak aldığımız sağlıklı üroepitelde (1+ / 2+) boyanma olduğu görülmüştür. Bu bulgunun olası sebebi, mesane duvarındaki vasküler destek sisteminin stromada yer alıp mukozada olmaması nedeni ile, beslenmeden giderek uzaklaşan yüzeysel üroepitel hücrelerinin, gerek yara iyileşmesi, gerekse hücre yenilenmesi için idrarda biyolojik olarak aktif formda bulunan EGF'den maksimum oranda yararlanma eğilimi olabilir.

Çalışma grubuna aldığımız olgularda, EGFR ekspresyonu ile tümör derecesi, tümör sayısı, tümör tekrar oranı ve tümör tekrarı süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p>0.05). Ancak tümör örnek sayısının nisbeten az olması kesin bir yargıyı güçleştirmektedir. Çalışma grubundaki olguların tümü lamina propria tutulumu gösterdiğinden, EGFR ekspresyonu ile tümör evresi arasındaki ilişki araştırılamamıştır.

Olguların tümünün orta derecede ve az farklılaşmış tümörler olduğu ve tümünün pT1 evresinde bulunduğu göz önüne alındığında, saptanan yüksek orandaki kuvvetli boyanma, bu tümörlerin bildirilen doğal gidişi ile paralellik göstermektedir.

Kanser hücrelerinin otokrin yolla kendileri için gereken büyüme faktörlerini kendilerinin salgıladıkları uzun süredir bilinmektedir. Pekçok değişik tipte tümör hücresi, değişik yapıda büyüme faktörleri salgılamaktadır⁶⁹. Hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda neoplastik hücrelerin, diploid hücrelere göre, büyüme faktör kaynağı olan seruma çok daha az ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir. Bu bulgular ve neoplastik hücre kültürlerinde mitojenik büyüme faktörlerinin sentezlendiğinin gösterilmesi, büyüme faktörlerinin otokrin bir mekanizma ile etkili olduğu görüşünü ortaya çıkarmıştır⁷⁰.

Literatürdeki bu bilgileri destekleyecek şekilde, çalışma grubuna dahil edilen olguların % 86'ında (18/21) farklı oran ve boyanma kuvvetinde olmakla beraber, EGF ekspresyonu tespit edilmiştir. TGF α 'nın kontrol grubu olarak alınan sağlıklı üroepitelde ekspresyonu olmadığı saptanırken, çalışma grubundaki olguların % 95'inde (20/21) farklı oran ve boyanma kuvvetinde TGF α ekspresyonu olduğu gözlenmiştir.

Olguların genel boyanma özelliği göz önüne alındığında, EGF ve TGF α ekspresyonu ile tümör derecesi, tümör sayısı, tümör tekrar oranı ve tümör tekrar süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. ($p>0.05$) Buna karşın tümör örneklerinde kuvvetli (3+) EGF ve TGF α ekspresyonu ile tümör tekrarı arasında son derece anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Kuvvetli (3+) boyanma gösteren hücreler, ileri derecede artmış EGF ve TGF α ekspresyonu gösteren hücreler olup, bu hücrelerin salgıladıkları büyüme faktörlerinin, kendi hücre membranlarında yada çevre hücrelerde yer alan büyüme faktör reseptörleri ile etkileşime girmesi sonucu tümör hücrelerinde proliferasyonun ortaya çıkması, diğer bir deyişle tümör hücrelerinin otokrin ve/veya parakrin yolla kendileri için gereken büyüme faktörlerini kendileri oluşturarak varlıklarını devam ettirmeleri, büyük bir olasılık olarak görünmektedir. Bu gözlemler Parker ve Grizzle'nin renal hücreli karsinom üzerinde yaptığı çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir⁷¹.

Kuvvetli EGF ekspresyonu saptanan 10 olgunun 8'inde (% 80) tümör tekrarı saptanırken, kuvvetli EGF ekspresyonu olmayan olgularda bu oran % 9 (1/11) olarak bulunmuş, ve her iki değer arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir fark

olduğu görülmüştür ($p<0.005$). Benzer Şekilde kuvvetli TGF α ekspresyonu olan olguların % 80'inde (8/10), tümör tekrarı saptanırken, kuvvetli TGF α ekspresyonu olmayan 11 olgunun % 9'unda (1/11) tümör tekrarı saptanmış ve her iki değer arasında da istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.005$).

Çalışma grubunda EGFR, EGF ve TGF α ekspresyonu dışında, ikinci bir değerlendirme tümör stromasının ve damar duvarının EGF ve TGF α ekspresyonu üzerinde yapılmıştır. Çalışmaya alınan olguların % 67'sinde (14/21), tümör dokusunun stromasında ve/veya damar duvarlarında, her iki büyüme faktörünün, ayrı ayrı, yada birlikte ekspresyonunun olduğu grlmştir. Tümör stromasında büyüme faktörlerinin varlığı daha öncede bildirilmiştir ⁷². Bu çalışmada bir defa daha ortaya konulan bu olay mesane tümöründe otokrin/parakrin bir sistemin varlığını destekleyen diğer bir bulgudur. Bu gözlemin diğer önemli yönü de epitel kökenli tümör hücreleri ile stroma arasında karşılıklı bir etkileşimin varlığına işaret etmesidir. Düz kas hücreleri ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin kendilerinde yada çevre dokularda büyüme ve çoğalmayı sağlamak üzere çeşitli maddeleri salgıladıkları gösterilmiştir ⁷³. Ancak bugüne kadar mesane tümörlerinde damar duvarında büyüme faktörü sentezine dair herhangi bir bilgi yoktur. Bu nedenle araştırmanın bu konuya ilişkin verileri son derece büyük önem taşımaktadır. Literatürde ilk defa olarak bu çalışma ile damar duvarında EGF ve/veya TGF α 'nın eksprese edildiğinin gösterilmesi bazı tümörlerde görülen ve henüz tam olarak detayları bilinmeyen damar invazyonunun mekanizmasının aydınlatılmasında önemli bir aşama sağlayabilir.

SONUÇ

Araştırmaya alınan mesane tümörü örneklerinin hepsinde yüksek düzeyde EGFR ekspresyonu saptanırken, kuvvetli EGF ve TGF α ekspresyonu olguların % 48'inde (10/21) saptanmıştır. Çalışma kapsamına alınan 21 olgudan tümör tekrarı gösterenlerin % 89'unda (8/9) kuvvetli EGF ekspresyonu saptanmışken, tümör tekrarı olmayan 12 olgunun % 17'inde (2/12) kuvvetli EGF ekspresyonu saptanmıştır ($p<0.05$). Benzer şekilde kuvvetli TGF α ekspresyonu tümör tekrarı saptanan 9 olgunun % 89'unda (8/9) saptanmışken, tümör tekrarı olmayan olgularda bu oran % 17 (2/12) olarak bulunmuştur ($p<0.05$). İncelenen tümör dokularının bir bölümünde, daha önceden değişik araştırmalarda da gösterildiği gibi tümör stromasında büyüme faktörü ekspresyonu olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında, literatürde ilk defa olarak bu çalışma ile tümör stroması içinde yer alan damarların bir bölümünün duvarından da EGF ve TGF α sentez edildiği saptanmıştır. Ancak olgu sayısının kısıtlı olmasından dolayı tümör dışı büyüme faktör ekspresyonu ile tümör tekrarı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Sonuç olarak, bu bulgular, yüzeysel mesane tümörlerinde, büyüme faktörlerinin, otokrin ve/veya parakrin salgılanmasının, hastalığın prognozunu belirlemede önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Değişik histopatolojik özelliklere sahip olan, daha geniş sayıda olgunun dahil edildiği prospektif çalışmalar, hastalığın prognozunda, tümör hücrelerinden ve/veya tümör stromasından salgılanan büyüme faktörlerinin etkisinin, ve özellikle, bu çalışmada belirlenen damar duvarı kaynaklı büyüme faktörlerinin, damar duvar invazyonu açısından öneminin belirlenmesinde yardımcı olacaktır.

ÖZET

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvurarak Eylül 1989 ile Haziran 1994 tarihleri arasında ilk kez mesane tümörü tanısı alan ve tedavileri hastanemizde yapılan, en az 12 aylık izlemleri olan toplam 21 yüzeysel mesane tümörü (pT1) olgusunda, immünohistokimyasal yöntemlerle EGFR, EGF ve TGF α ekspresyonu değerlendirildi. Elde edilen verilerin söz konusu tümörlerin prognozunu saptamada ne derece etkili olduğu, diğer prognostik parametreler ile karşılaştırmalı olarak araştırıldı. Çalışma grubundaki olguların % 100'ünde (21/21) kuvvetli EGFR ekspresyonu saptanmakla beraber, EGFR ekspresyonu ile ilk tümörün özellikleri (tümör büyüklüğü, sayısı ve patolojik derecesi) ve tümör nüksü arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Olguların % 48'inde (10/21) artmış EGF ekspresyonu ve yine % 48'inde (10/21) artmış TGF α ekspresyonu saptandı. Tümör tekrarı olan ve olmayan olgularda kuvvetli (3+) EGF ekspresyonu incelendiğinde, iki grup arasında anlamlı farklılık mevcut idi ($p<0.05$). Benzer şekilde kuvvetli (3+) TGF α ekspresyonu, tümör tekrarı olan ve olmayan grup arasında da anlamlı derecede farklı idi ($p<0.05$). Bu bulgular, yüzeysel mesane tümörlerinin tekrarlamasında, tümör hücrelerinin salgıladıkları büyüme faktörlerinin otokrin ve/veya parakrin yolla kendi üzerlerinde bulunan EGFR ile etkileşime girerek bu hücreler için önemli bir destek sistemi oluşturduğunu düşündürmektedir. Ayrıca bu çalışmada, ilk defa olarak, tümör stroması yanında damar duvarlarından da büyüme faktörlerinin salgılandığı gösterilmiştir. Ancak bu gözlemin prognoz üzerine etkisini saptayabilmek için daha çok sayıda hasta içeren uzun süreli çalışmalara gereksinim olduğu açıktır.

KAYNAKLAR

- 1- Silverberg, E. and Lubera, J.:Cancer statistics, 1987. CA,37:2, 1987.
- 2- Feldman, A.R., Kessler, R., Myers, M.H., and Naughton, M.D.:The prevalence of cancer. estimates based on Connecticut Tumor Registry. New. Eng. J. Med., 315:1394, 1986.
- 3- American Cancer Society: Cancer Facts and Figures (1986). American Cancer Society, 1987.
- 4- Lutzeyer, W.,Rubben, H., and Dahm,H.:Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. J. Urol., 127:250, 1982.
- 5- Heney, N.M.,Ahmed, S.,Flanagan, M.J.,Frable, W.,Corder, M.P., Hafermann, M.D., and Hawkins, I.R.:Superficial bladder cancer: progression and recurrence. J. Urol., 130:1083, 1983.
- 6- Herr, H.W.,Badalament, R.A., Amato, D.A., Laudone, V.P.,Fair, W.R., and Whimore, W.F.Jr.:Superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-guerin: a multivariate analysis of factors affecting tumor progression. J. Urol., 141:22, 1989.
- 7- Broders, A.G.:Epithelioma of the genitourinary organs. Ann. Surg., 75:574, 1922
- 8- Ooms, E.C.M., Essed, E., Veldhuizen, R.W., Alons, C.L., Kurver, P., and Boon, M.:The prognostic significance of morphometry in T1 bladder tumours. Histopathology, 5:311, 1981.
- 9- Kern, W.H.:The grade and pathologic stage of bladder cancer. Cancer, 53:1185, 1984.
- 10- Loening, S., Narayama, A., Yoder, L., Slymen, D., Weinstein, S., Penick, G., and Culp, D.:Longitudinal study of bladder cancer with cytology and biopsy. Br. J. Urol., 50:496, 1978.
- 11- Soloway, M.S., Murphy, W., Rao, M.K., Cox, C.:Serial multiple-site biopsies in patients with bladder cancer. J. Urol., 120:57, 1978
- 12- Smith, G., Elton, R.A., Beynon, L.L., Newsam, J.E., Chisholm, G.H., and Hargreave, T.B.:Prognostic significance of biopsy results of normal-looking mucosa in cases of superficial bladder cancer. Br. J. Urol., 55:665, 1983.
- 13- Wolf, H., and Hogaard, K.:Urothelial dysplasia concomitant with bladder tumours as a determinant factor for future new occurrences. Lancet, 16:134, 1983.

- 14- Badalament, R.A., Ortolano, V, and Burgers, J.K.:Recurrent or aggressive bladder cancer: Indications for adjuvant intravesical therapy. *Uro. Clin. N. Ame.*, 3:485, 1992.
- 15- Messing, E.:Growth factors in human bladder tumours. *J. Urol.*, 131:111A, 1983.
- 16- Messing, E.M.:Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res.*, 50:2537, 1990.
- 17- Messing, E.M., Hanson, P., Ulrich, P. and Erturk, E.:Epidermal growth factor-Interactions with normal and malignant urothelium:in vivo and in situ studies. *J. Urol.*, 138:1329, 1987.
- 18-Messing, E.M., Reznikoff, C.A.:Normal and malignant human urothelium:in vitro effects of epidermal growth factor. *Cancer Res.*, 47:2230, 1987.
- 19- Lau, J.L.T., Fowler, J.E.Jr. and Ghosh L.:Epidermal growth factor in the normal and neoplastic kidney and bladder. *J. Urol.*, 139:170, 1988.
- 20- Messing, E.M.:Transforming growth factor from human bladder cancer. *Surg. Forum*, 35:662, 1984.
- 21- Neal, D.E., Sharples, L., Smith, K., Fennely, J., Hall, R.R., and Harris, A.L.:The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*, 65:1619, 1990.
- 22- Neal, D.E., Mellon, K.:Epidermal growth factor receptor and bladder cancer: A review. *Urol. Int.*, 48:365, 1992.
- 23- De Larco, J.E.:Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:4001, 1978.
- 24- Sporn, M.B, Todaro, G.J.:Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.*, 303:878, 1980.
- 25- Cochran, B.H., et al.:Expression of the c-fos oncogene and a newly discovered c-fox is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science*, 226:1080, 1984.
- 26- Greenberg, M.E.:Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogenes. *Nature (Lond.)*, 311:433, 1984.
- 27- Kelly, K., et al.:Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, 35:603, 1983.
- 28- Kruijer, W., et al.:Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature (Lond.)*, 312:711, 1984.
- 29- Müller, R., et al.:Induction of c-fos gene and protein by growth factor precede activation of c-myc. *Nature (Lond.)*, 312:716, 1984.

- 30- Cohen, S.:The epidermal growth factor. *Cancer (Phila.)*, 51:1787, 1983.
- 31- Cohen, S.:Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J.Urol. Chem.*, 237:1555, 1962.
- 32- Gregory, H.:Isolation and structure of urogastrone and its relation ship to epidermal growth factor. *Nature (Lond.)*, 257:325, 1975.
- 33- Elder, J.B., Williams, G., Lacey, E., and Gregory, H.:Cellular localiation of human urogastrone/epideral growth factor. *Nature (Lond.)*, 271:464, 1978.
- 34- Fallon, J.H., Loughlin, S.E., Morrison, R.S., and Bradshaw, R.A.:Epidermal growth factor immünoreactive material in the central nervous system: location and develoment. *Science (Wash. DC)*, 224:1107, 1984.
- 35- Shikata, H., Utsumi, N., Hiramatsu, M., Minami, N., Nemoto, N., and Shidata, T.:Immünohistochemical localization of nerve growth factor and epidermal growth factor in guinea pig prostate gland. *Histochemistry*, 80:411, 1984.
- 36- Gregory, H., Walsh, S., and Hopkins, C.R.:The identification of urogastrone in serum, saliva and gastric juice. *Gastroenterology*, 77:313, 1979.
- 37- Marquardt, H., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., and Todaro, G.J.:Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science (Wash. DC)*, 223:1079, 1984.
- 38- Derynck, R., Roberts, A.B., Winkler, M.E., Chen, E.Y., and Goeddel, D.V.: Human transforming factor- α : precursor structure and expression in *E.coli*. *Cell*, 38:287, 1984.
- 39- Todaro, G.J., Fryling, C., and De Larco, J.E.:Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5258, 1980.
- 40- Massague, J.:Epidermal groth factor-like transforming growth factor. II: Interaction with epidermal growth factor receptors in human placenta membranes and A431 cells. *J. Biol. Chem.*, 258:13614, 1983.
- 41- Todaro, G.J., Lee, D.C., Webb, N.R., Rose, T.M., and Brown, J.P.: Rat type- α transforming growth factor: structure and possible function as a memrane receptor. In:*Cancer Cells*, Vol. 3. pp.51-58. Cold Spring Harbor. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1985.
- 42- Lee, D.C., Rochford, R.M., Todaro, G.J., and Villareal, L.P.:Developmental expression of rat transforming growth factor- α mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, 5:3644, 1985.

- 43- Twardzik, D.R.:Differential expression of transforming growth factor- α during prenatal development of the mouse. *Cancer Res.*, 45:5413, 1985.
- 44- Martin, P.M., Dong, X., Berthois, Y.: The role of growth factors in tumor biology. *Handbook of Chemotherapy in Clinical Oncology*, pp.36-50, 1993.
- 45- Sporn, M.B., Roberts, A.B.:Autocrine growth factors and cancer. *Nature (Lond.)*, 313:747, 1985.
- 46- Carpenter, G.:The biochemistry and physiology of the receptor-kinase for epidermal growth factor. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 31:1, 1983
- 47- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E. & 5 others:Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307:521, 1984.
- 48- Cochet, C., et al.:C-kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor stimulated tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 259:2553, 1984.
- 49- Fitzpatrick, S.L., Brightwell, J., Wittliff, J.L., Barrows, G.H., and Schultz, G.S.: Epidermal growth factor binding by breast by tumour biopsies and relationship to estrogen and progesterin receptor levels. *Cancer Res.*, 44:3448, 1984.
- 50- Sainsbury, J.R.C., Farndon, J.R., Sherbet, G.V., and Harris A.L.:Epidermal growth factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet*, *I*:364, 1985.
- 51- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A., and Schlessinger, J.:Amplification , enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature (Lond.)*, 313:144, 1985.
- 52- Harris, A.L., and Neal, D.E.:Epidermal growth factor and its receptor in human cancer. In M. Sluyser (ed)., *Growth factors and oncogenes in breast cancer*, Chapt. 4, pp 60-90. Chichester, United Kingdom:Ellis Horwood. Ltd., 1987.
- 53- Neal, D.E., Marsh, C., Bennet, M.K., Abel, P.D.,Hall, R.R., Sainsbury, J.R.C., and Harris, A.L.:Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet*, *I*:366, 1985.
- 54- Berger, M.S., Greenfield, C., Gullick, W.J., Haley, J., Downward, J., Neal, D.E., Harris, A.L., and Waterfield, M.D.:Evaluation of epidermal growth factor receptors in bladder tumours. *Br. J. Cancer*, 56:533, 1987.

- 55- Bauknecht, T.:The evidence and evaluation of epidermal growth factor receptors and EGF-like receptors as prognostic agents in ovarian carcinoma. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 10C:161, 1986
- 56- Gullick, W.J., Marsden, J.J., Whittle, N., Ward, B., Bobrow, L., and Waterfield, M.D.:Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas. *Cancer Res.*, 46:285, 1986.
- 57- Messing, E.M., Bubbers, J.E., de Kernion, J.B., and Fahey, J.L.:Growth stimulating activity produced by human bladder cancer cells. *J. Urol.*, 132:1230, 1984.
- 58- Messing, E.M., Bubbers, J., de Kernion, J.B., and Fahey, J.:Growth stimulating activity produced by human bladder cancer cells. *Surg. Forum*, 4:683, 1983.
- 59- Lipponen, P., Eskelinen, M.: Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Bri. Jour. Cancer*, 69:1120, 1994.
- 60- Gullick, W.J., Hughes, C.M., Mellon, K., Neal, D.E., Lemoine, N.R.:Immünohisto- chemical detection of the epidermal growth factor receptor in paraffin-embedded human tissues. *Jour. Pathology*, 164:285, 1991.
- 61- Theodorescu, D., Cornil, I., Sheehan, C., Man, M.S., Kerbel, R.S.: Ha-ras induction of the invasive phenotype results in up-regulation of epidermal growth factor receptors and altered responsiveness to epidermal growth factor in human papillary transitional cell carcinoma cells. *Cancer Research*, 51:4486, 1991.
- 62- UICC:International Union Against Cance:TNM Classification of Malignant Tumors, ed. 3. Geneva. UICC.1978.
- 63- Mostofi, F.K.:Histological Typing of Urinary bladder Tumors. International histological classification of tumors, no. 10. Geneva, WHO, 1973.
- 64- Heney, N.M.:Natural history of superficial bladder cancer. *Urol. Clin. N. Amer.*, 19:429, 1992.
- 65- Hsu, S., Raine, L., and Fanger, H.:Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immünooxidase Techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 29:577, 1981.
- 66- Türkeri, L.N., Sakr, W.A., Wykes, S.M., Grignon, D.J., Pontes, J.E., and Macosca, J.A.:Comparative analysis of epiermal growth factor receptor gene expression and protein product in benign, premalignant, and malignant prostate tissue. *The Prostate* 25:199, 1994.
- 67- Lutzeyer, W.,Rubben, H., and Dahm,H.:Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. *J. Urol.*, 127:250, 1982.

- 68- Heney, N.M., Nocks, B.N., Daly, J.J., Prout, G.R.Jr., Newall, J.B., Griffin, P.P., Perrone, T.L., and Szyfelbein, W.A.: Ta and T1 bladder cancer: localization, recurrence and progression. *Br. J. Urol.*, 54:152, 1982.
- 69- Stoscheck, C.M. and King, L.E. Jr.: Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Res.*, 46:1030, 1986.
- 70- Neal, D.E.: Peptide growth factors in bladder and prostatic cancer. *European Urol. Update Ser.*, 3:18, 1994.
- 71- Parker, M.L.W., Grizzle, W.E.: Immunohistochemical localization of EGF, TGF α and the EGF receptor in renal cell carcinoma. *United States and Canadian Academy of Pathology*, 64A, 1993.
- 72- Gleave, M., Hsieh, J.T., Gao, C., von Eschenbach, A.C., and Chung, L.W.K.: Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Res.*, 51:3753, 1991.
- 73- Steers, W.D.: Smooth muscle physiology. *AUA update ser.*, 30:237, 1994.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
TOKİMANTASYON MERKEZİ