



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BÖBREK KANSERLİ HASTALARIN AgNOR PARAMETRELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sinem GEÇGEL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Recep ERÖZ

DÜZCE, 2020

BEYAN

Bu yaptığım tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazım aşamasına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak göstererek bunları kaynaklar listesine eklediğimi, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Bu tez Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından 2018.04.03.848 numaralı proje ile desteklenmiştir.

06/07/2020

Sinem GEÇGEL



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince değerli bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşarak eğitimime katkıda bulunan, tez çalışmamda bana her daim yol göstererek ufkumu açan, insani değerleri, hoş görüşü, etik değerleri ve derin tevazusu ile ömür boyu saygıyla anacağım ve hiç unutmayacağım hocam sayın Doç. Dr. Recep ERÖZ' e, daima minnetle anacağım, her söylediği kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım misafir perverliği ile birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum desteklerini her zaman yanımda hissettiğim ve tüm nezaketi ile öğrencisi olmaktan her zaman mutluluk duyduğum değerli hocam sayın Prof. Dr. Hüseyin YÜCE' ye, ders dönemindeki engin öngörüsü ve katkılarından dolayı sayın Doç. Dr. Görkem DÜLGER'e ve yüksek lisans tezime katkı sağlayan materyal ve örneklerin temini konusunda bize yardımcı olan Dr. Öğrt Üyesi Sinem ÇOŞKUN'a ve Atike BAHÇIVAN' a teşekkür ederim.

Çalışma sürecinde tüm zorlukları aşmamda bana yardımcı olan ve hayatımın her döneminde desteklerini benden esirgemeyen sevgili dostlarıma ve hayatımdaki en büyük şansım olarak nitelendirdiğim başta rahmetli babam olmak üzere canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

06/07/2020

Sinem GEÇGEL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	i
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	i
TABLolar LİSTESİ	ii
ŞEKİLLER LİSTESİ	iii
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1.GİRİŞ VE AMAÇ	6
2.GENEL BİLGİLER	8
2.1.Böbrek Kanseri	8
2.2.Epidemiyolojisi	8
2.3.Etiyoloji ve Risk Faktörleri	10
2.3.1.Genetik faktörler	10
2.3.1.1.mikroRNA	11
2.3.2.Çevresel faktörler	11
2.3.3.Prognostik faktörler	12
2.4.Böbrek Kanseri Evreleri	13
2.5.Böbrek Kanserlerinin Sınıflandırılması	15
2.5.1.Berrak hücreli renal hücreli karsinom	15
2.5.2.Papiller renal hücreli karsinom	16
2.6.Böbrek Kanserinin Tedavisi	16
2.7.Çekirdekçik	17
2.7.1.Hücre Çekirdeği	17
2.7.2.Çekirdekçikte rRNA'ların sentezi ve işlenmesi	18
2.8.Çekirdekçik Oluşturan Bölgeler (Nucleolar Organizer Regions; NORs)	18
2.9.NOR Proteinleri	19
2.9.1.Nukleolin (C23 Proteini)	20
2.9.2.Nükleofosmin (B23 Proteini, Neumatrin ya da No38)	20
2.9.3.NOPP 140	21
2.9.4.RNA polimeraz-I alt birimleri	21
2.9.5.UBF (Transkripsiyon Faktörü)	21
2.9.6.135 KDA'LUK AgNOR Proteini	21

2.9.7.Tümör Patolojisinde interfaz AgNOR'ları	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1.Gereçler.....	24
3.2.Yöntem.....	26
3.2.1.Çalışma gruplarının belirlenmesi.....	26
3.2.2.Böbrek kanser hücresi kesitinin alınması	26
3.2.2.1.Böbrek kanser hücresi içeren doku kesiti preparatı hazırlanması ve fiksasyon aşaması	26
3.2.3. Gruplara göre böbrek hücrelerindeki interfaz NOR aktivitelerinin değişiminin değerlendirilmesi	29
3.2.4. Kamera ataçmanlı ışık mikroskobu yardımı ile interfaz NOR'larının analiz işlemleri	29
3.2.5.Bilgisayarda interfaz NOR'larının ölçüm işlemleri.....	29
3.2.5.1.Böbrek kanseri hücre görüntülerinin elde edilmesi	29
3.2.5.2.Elde edilen görüntülerin analiz işlemi	31
3.2.5.2.1.NOR bölgelerinin belirlenmesi	31
3.2.5.2.2.Böbrek kanseri hücre çekirdek alanının belirlenmesi.....	34
3.2.5.2.3.Ölçütlerin hesaplanması.....	34
3.3.İstatistiksel Analiz Yöntemi.....	34
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
6. KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	60

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

ABD	Amerikan Birleşik Devletleri
AgNO₃	Gümüş Nitrat
BHK	Böbrek Hücreli Kanser
BHRK	Berrak hücreli Renal Hücreli Karsinom
CAP	American Patologlar Koleji
DMSO	Dimetil sülfoksit
HRK	Hereditör Renal Karsinom
KİDEM	Kanser İzlem ve Denetleme Merkezi
MS	Kütle spektrometresi
NOR	Nukleolus Organizör Region= Çekirdekçik Oluşturan Bölgeler
PRHK	Papiller renal hücreli karsinom
RHK	Renal Hücreli Karsinom
RPI	RNA polimeraz I
rRNA	Ribozomal RNA'lar
rDNAs	Ribozomal genlerin
SL1	Promotor seçici faktör
snoRNPs	Small nukleolar ribonukleoproteinler
snRNPs	Small nukleolar ribonukleoproteinler
SPME	Katı faz mikroekstraksiyon
TAA/ÇA	Toplam AgNOR alanı/Çekirdek alanı
TNM	Tümör evreleme sistemi
UBF	Transkripsiyon Faktörler

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Böbrek hücreli kanserlerde prognostik faktörler.....	13
Tablo 2. Renal neoplazilerin 2016 DSÖ sınıflaması,renal hücreli tümör alt tipleri.....	15
Tablo 3. Kontrol grubunun ortalama TAA/ÇA oranı ve ortalama AgNOR sayısı değeri.....	37
Tablo 4. Berrak hücreli karsinom (BHRK) grubunun ortalama TAA/ÇA oranı ve ortalama AgNOR sayısı değeri.....	38
Tablo 5. Papiller renal hücreli karsinom (PRHK) grubunun ortalama TAA/ÇA oranı ve ortalama AgNOR sayısı değeri	38
Tablo 6. Tüm grupların ortalama TAA/ÇA oranı ve ortalama AgNOR sayısı değerinin kıyaslanması.....	39
Tablo 7. Grupların ortalama TAA/ÇA oranı ve ortalama AgNOR sayısı açısından ikili kıyaslanması.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. AgNOR boyama işlemi yapılmış normal hücre, berrak hücreli karsinom ve papiller renal hücreli karsinomun karşılaştırılması.....	28
Şekil 2. Analiz işleminde kullanılan kamera ataçmanlı ışık mikroskobu ve bilgisayar düzeneği.....	30
Şekil 3. Analiz işleminde kullanılan kamera ataçmanlı ışık mikroskobu.....	30
Şekil 4. Analiz işleminde kullanılan program ve analiz edilecek berrak hücreli karsinom.....	31
Şekil 5. NOR bölgeleri belirenmiş berrak hücreli karsinom hücre çekirdeği.....	32
Şekil 6. Çekirdek alanı belirlenmiş berrak hücreli karsinom hücre çekirdeği.....	33
Şekil 7. Çekirdek ve NOR bölgelerin belirlenmesi.....	33
Şekil 8. Çekirdek ve NOR bölgelerin hesaplanma sonucu.....	34
Şekil 9. Her bir gruptaki bireylerin ortalama TAA/ÇA oranı değerleri.....	40
Şekil 10. Her bir gruptaki bireylerin ortalama AgNOR sayısı değerleri.....	41
Şekil 11. Grupların ortalama TAA/ÇA değerleri arasındaki kıyaslamayı gösteren grafik	41
Şekil 12. Grupların ortalama AgNOR değerleri arasındaki kıyaslamayı gösteren grafik	42

ÖZET

BÖBREK KANSERLİ HASTALARIN AgNOR PARAMETRELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sinem GEÇGEL

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı Doç. Dr. Recep ERÖZ

Temmuz 2020, 60 sayfa

Biz bu çalışmada insan böbrek kanseri hücrelerindeki her bir hücrenin toplam AgNOR Alanı/ Çekirdek Alanı değerlerini (TAA/ÇA) ve ortalama AgNOR sayılarını bir bilgisayar programı kullanarak hesaplamayı amaçladık. Ayrıca AgNOR parametrelerindeki değişikliklerle tümörün prognozu arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığını belirlemeye çalıştık. Çalışmamıza normal hücre (kontrol grubu), Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom(BHRK) ve Papiller Renal Hücreli Karsinom(PRHK) olarak 3 grubu dahil ettik. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD'ında böbrek kanseri tanısı almış (BHRK ve PRHK) hastaların parafin bloğa gömülmüş tümörlü dokularından ve yine malignite nedeniyle nefrektomi materyalinin sağlıklı hücrelerinin bulunduğu dokularından 5µm'lik kesitler temiz bir lama alınarak deparafinize edilip fiksasyon yapıldıktan sonra AgNOR boyama işlemi yapıldı. AgNOR boyama sonrası, böbrek hücrelerinin ortalama AgNOR sayısı ile TAA/ÇA alanı değerleri hesaplanmıştır. Kontrol grubunun ortalama TAA/ÇA (0,834±0,192) ve ortalama AgNOR sayısı(1,158±0,372) değeri, PRHK grubunun ortalama TAA/ÇA (1,041±0,418) ve AgNOR sayısı (1,288±0,490) değerinden anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla Z=-6,390 ve p=0.000; Z=-4,038 ve p=0,000). Kontrol gurubunun hem ortalama TAA/ÇA (0,834±0,192) hemde ortalama AgNOR sayısı (1,158±0,372) değeri, BHRK gurbunun TAA/ÇA (1,143±0,395) ve ortalama AgNOR sayısı (1,495±0,553) değerinden anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla Z=-11,627 ve p=0.000; Z=-9,603ve p=0,000). Buna ilaveten, BHRK grubunun TAA/ÇA (1,143±0,395) hemde ortalama AgNOR sayısı (1,495±0,553) değeri, PRHK grubunun TAA/ÇA (1,041±0,418) ve ortalama AgNOR sayısı (1,288±0,490) değerinden anlamlı derecede yüksekti. Sonuç olarak hastalığın daha erken dönemlerinde teşhisi ve prognozu hakkında bilgiler edinebilmek için AgNOR yöntemi indirek bir belirteç olarak kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: AgNOR, Berrak hücreli renal hücreli karsinom, Böbrek kanseri, Çekirdek, Papiller renal hücreli karsinom

ABSTRACT

INVESTIGATION OF AgNOR PARAMETERS IN PATIENTS WITH KIDNEY CANCER

Sinem GEÇGEL

Master Thesis, Medical Biology and Genetics

Thesis advisor Doç. Dr. Recep ERÖZ

July 2020, 60 pages

In this study, we aimed to calculate the total AgNOR area / Nuclear area values (TAA / NA) and average AgNOR numbers of each cell in Human Kidney Cancer Cells using a computer program. We also tried to determine if there was a relationship between changes in AgNOR parameters and the prognosis of the tumor. In our study, we included 3 groups as normal cell (control group), Clear Cell Carcinoma (BHRK) and Papillary Renal Cell Carcinoma (PRHK). 5µm sections of the tumor tissues embedded in the parafin block (clear cell carcinoma and papillary carcinoma) of the patients with kidney cancer and tissues containing healthy cells of the nephrectomy material due to malignancy are deparaffinized and fixated, then AgNOR staining process was performed. After AgNOR staining, average AgNOR number and TAA / ÇA area values of kidney cells were calculated. The control group's mean TAA / ÇA (0.834 ± 0.1192) and average AgNOR number (1.158 ± 0.372) value was significantly lower than the BHRK group's TAA / ÇA (1.143 ± 0.395) and average AgNOR number (1.495 ± 0.553) respectively ($Z = -11.627$ and $p = 0.000$; $Z = -9.603$ and $p = 0.000$). In addition, the BHRK group's TAA / ÇA (1.143 ± 0.395) and the average AgNOR number (1.495 ± 0.553) and the TAA/ÇA ($1,041 \pm 0,418$) and average number of AgNOR (1.288 ± 0.490) of the PRHK group were significantly higher than that of the PHRK group. As a result, AgNOR method can be used as an indirect marker to obtain information about the diagnosis and prognosis of the disease at an earlier stage.

Key words: AgNOR, Clear cell carcinoma, Kidney cancer, Nucleus, Papillary renal cell carcinoma,

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser günümüzde görülen en önemli sağlık meselelerinden biri olup, devamlı görülüp öldürücü olması gerekçesiyle de bir halk sorunu haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 Kanser Raporuna göre dünyada yılda 12,8 milyon kişide yeni kanser vakası görülmektedir. Kanser görüldüğü kişi sayısındaki artış hızı aynı şekilde devam ettiği sürece, 2025 senesinde dünya çapında kansere yakalanan kişi sayısının 25 milyonu aşacağı beklenmektedir. Nitekim günümüzde kanserle alakalı yapılan çalışmalar her geçen gün hızla artmakta, daha faydalı ve yan etkisinin daha az olduğu tedavi arama çalışmaları sürmektedir¹.

Böbrek kanseri çok sık görülen ve ölümcül olan bir kanser türüdür. Bu kanser türü, ateş, idrarda kan görülmesi, sırt bölgesinin sağ ya da sol tarafında geçmeyen ağrı, hastanın yan tarafında ya da karnında kitle belirginleşmesi ile karakterizedir². Hastalık ürolojik kanserlerin en ölümcül olanıdır ve yetişkin malignitelerin %3 lük kısmını oluşturur. Erkeklerin kadınlara oranı yaklaşık olarak 3/2 dir³. Hastalığın en sık görülen tipi renal hücreli karsinomdur. Çoğunlukla 60-70 yaşlarında ortaya çıkmakta olup, son 20 yılda böbrek kanseri sıklığında belirgin bir artış gözlenmiştir².

Hücre çekirdeğindeki çekirdekçik organize edici bölgeler (NOR), insan ve diğer ökaryotların kromozomlarında yerleşmiş olan çekirdekçik oluşturan DNA bölgeleridir. Bu bölgeler rRNA sentezledikleri için rDNA olarak da bilinirler. NOR'lar insanda beş çift akrosentrik kromozomunun (13, 14, 15, 21, 22. kromozomlar) ikincil boğumu olarak bilinen satellit köklerinde bulunurlar ve çekirdekçik oluşumunda rol alırlar. Çekirdekçik aktif zonunda (fibrillar ve yoğun fibrillar merkezi) NOR proteinleri bulunmaktadır⁴⁻⁶. Bu proteinler interfazda transkribe edilen NOR bölgeleri olarak isimlendirilir. Bu transkripsiyon işleminde rol alan proteinler Argrophyllic (gümüş seven) özelliklerinden dolayı AgNOR olarak isimlendirilirler. Bu proteinler gümüş nitrat tarafından seçici olarak boyanır. Gümüşle boyanan, hücre çekirdeklerinde saptanan AgNOR artışının, hücrenin çoğalma hızı ile ilgili bilgi vermesi nedeniyle, bu proteinlerin kanserin gelişme potansiyeli hakkında bilgi verebileceği beklenmektedir⁷.

Hücrenin proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesi, tümörlerin histolojik sınıflandırılmasına yardımcı olması açısından önemlidir⁴. Histopatoloji'de, interfaz AgNOR proteinlerinin analizleri preneoplastik ve neoplastik lezyonların ayrılmasında sık olarak kullanılmaktadır⁸. AgNOR proteinleri birçok kanser türünde hücresel proliferasyonun bir indikatörüdür⁹⁻¹¹. Bu bölgelerin aktiviteleri direk olarak protein

sentezi ile ilişkilidir. Bu nedenle, aktif NOR sayıları, artan hücresel aktiviteyle artar. Burada bahsedilen metot kullanılarak yapılmış olan daha önceki çalışmalarda ortalama AgNOR sayısı ve Total AgNOR Alanı/Çekirdek alanı (TAA/ÇA) oranının papiller tiroid kanserinde benin tiroid nodüllerine göre anlamlı derece de arttığı tespit edilmiştir⁹. Malin ve benin özellikteki farklı lezyonların ayırımında kullanılacak yeni yaklaşım ve markırların tanımlanması tanı başarısının güçlendirilmesi ve güvenilirliği açısından çok önemlidir. Daha önce yapılmış olan diğer çalışmalarda malin ve benin lezyonlarının ayırımında çekirdekte bulunan AgNOR lekelerinin toplam alanı hesaplanırken, bizim kullandığımız yöntem de her hücre için toplam AgNOR alanının toplam çekirdek alanına oranı (TAA/ÇA) hesaplanmaktadır. Kanserli hücrelerde gen ekspresyonunun yanı sıra genin ürünü ve hücrenin morfolojisi (çekirdeğin hacmi, çekirdek vb.) de değişmektedir. Bu sebeptendir ki çekirdek içindeki AgNOR alanı ve çekirdek alanının ayrı hesaplanması protein sentez kapasitesiyle ilgili daha iyi bilgiye ulaşmayı sağlar. Böylece TAA/ÇA oranının tespit edilmesi ile hücrelerin metabolik ve proliferatif aktiviteleri hakkında daha net bilgiler elde edilebilmektedir. Bizim kullandığımız bu teknik aynı zamanda uygulaması kolay ve ucuz bir tekniktir.

Kanser alanında uygulanan tedaviler geçmişten günümüze kadar farklı teknikler kullanarak veya sistemli ilaç uygulamaları ile gelişme kaydetmiştir. Diğer kanser türleri gibi, böbrek kanseri de hasta kişinin kendi hayatıyla birlikte yakınlarınkinide etkileyen baş etmesi oldukça zor bir hastalıktır. Bunun yanında hastanede yatış süreleri, hastalıkta uygulanan tedaviler, yan etkileri, bu korkuyla endişeyi arttırmaktadır. Bu çalışmada böbrek kanserli bireylerin parafine gömülmüş doku örneklerinde AgNOR protein miktarlarını değerlendirmeyi kararlaştırdık.

Bununla beraber bildiğimiz kadarıyla literatürde insan böbrek kanseri hücreleri ile ilgili AgNOR sayısı ile bizim yeni yaklaşımımız olan toplam AgNOR alanı/Çekirdek alanı değerlerinin (TAA/ÇA) araştırıldığı hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle biz bu çalışmanın yapılmasını kararlaştırdık. Bu araştırma sonucunda elde edilen veriler sayesinde hastalığın daha erken bir dönemde tanısının konulması, histopatolojik değerlendirmelere ilave olarak hastalığın alt gruplarının ayrılması ve prognozu hakkında bilgi edinilmeye çalışılacaktır. Böylece hastalığın daha erken dönemlerde teşhisi ile, hekime daha erken dönemde hastalıktan kaynaklı müzdariplikleri ortadan kaldırmak için bir tedavi stratejisinin uygulanılmasına katkı sağlanabileceği gibi, hastalığın prognozu daha kötüye gitmeden hastanın tedavisi yapılabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Böbrek Kanseri

Sağlık Bakanlığına bağlı Kanser Savaş Daire Başkanlığına hizmet için İzmir Sağlık Müdürlüğü çerçevesinde çalışma yapan Türkiye'nin ilk nüfus temelli kanser kayıt merkezi KİDEM (Kanser İzlem Denetleme Merkezi)'in sağladığı bilgiler neticesinde böbrek kanseri, yurdumuzda gözlenen bütün kanserlerin %1,8 kısmını meydana getirmektedir. Her sene 190.000 civarında yeni olguya teşhis konulmaktadır¹².

Türkiye'de erkeklerde de kadınlarda da bu kanser çeşidi 13. sırada bulunmaktadır. Böbrek tümörlerinde 1980 yıllarından beri ciddi bir artış görülmektedir. Bunun yanı sıra böbrek kanseri hastalığı için 40 yaş kritik olabilir. Bu yaşa bağlı olarak artış görülmekte, bu artış 75 yaşına kadar devam edebilmektedir. Afrika ve Asya gibi ülkelerde ise hastalığın görülme sıklığı azalmaktadır.

Böbrek hücreli kanserler (BHK) böbrek tubulus epitelinden gelişmeye başlarlar. Tanıda kullanılan görüntüleme yöntemlerinde karşılaşılan gelişmeler sayesinde, 10 yıllık yaşam oranı %65 seviyesine kadar çıkmıştır¹³. Bu alanda gerçekleştirilen tedaviler, geçmişten bu güne kadar değişik yöntemler kullanılarak veya sistemli ilaç tedavileri sayesinde ciddi derecede gelişim göstermiştir. Böbrek kanseri oldukça fazla gözlenen ve ölüme sebep olan bir kanser türüdür. Bu kanser çeşidi, hastanın ve yakın çevresinin hayatını yakından etkileyen ciddi bir hastalıktır. Tedaviler, olası yan etkiler ve hastanede yatış süresi de korku ve kaygıyı arttırmaktadır. Böbrek hücreli kanserler, radyoterapi ve kemoterapiye direnç gösterdikleri için, nefrektomi en iyi sonuç alınan tedavidir¹⁴. Erken teşhis ve tedavi neticesinde, ciddi bir sağlık sorunu olan böbrek kanserinde önemli başarılar sağlanmaktadır. Erken teşhis için birçok belirteç (ki67, PCNA vb) kullanılmaktadır⁹⁻¹¹. Bununla birlikte daha az biyolojik materyal kullanılarak, daha yüksek spesifite ve sensitifiteye sahip yeni tanı belirteçlerinin ve yaklaşımların geliştirilmesi hastalıkla daha etkin bir mücadele için önem arz etmektedir.

2. 2. Epidemiyolojisi

BHK, olgun solid tümörlerinin %3'lük kısmını, tüm parankimal böbrek tümörlerinin %85'ine yakın kısmını oluşturmaktadır. Ürolojik kanserler içerisinde prostat ve mesane tümörlerinin ardından 3. sırada görülürler. Beşinci ve yedinci dekatlarda erkeklerde daha fazla gözlemlenir. Üriner sistem sebepli tümörlere bağlı ölümlerde BHK'ler %40'ın üstündeki oranı ile mortalitesi en yüksek ürolojik kanserdir. Bu oran, prostat ve

mesane kanserinde %20 civarındadır¹⁵. En fazla gözlenen malign böbrek tümörü olan renal hücreli karsinomlar, ürolojik tümörler arasında 3.sıradadır¹⁶. Yetişkinlerde gözlenen bütün malign tümörlerin %2'sini, tüm böbrek tümörlerinin ise %80'ini meydana getirirler¹⁷. Çoğunlukla 55-60 yaşlar civarında ve erkeklerde kadınların iki katı sıklıkla gözlenir¹⁸.

Renal hücreli karsinom hastaları genel olarak kötü prognoza sahiptir. 5 yıllık yaşam müddeti %50, 10 yıllık yaşam müddeti ise %33'dür^{17,19}. Hastalarda %40 oranında nüks gözlenmektedir¹⁹. Olguların %50'sinde erken teşhis konmasına rağmen, metastaz tespit edilmiştir¹⁷.

Böbrek tümörleri malign, benign veya enflamatuvar karakterde olabilir. Malign böbrek tümörlerinin yaklaşık %85-%90'ını BHRK oluşturmaktadır²⁰. Böbrek tümörü gözlenme sıklığında Danimarka ve İsviçre'de bir azalma söz konusudur. Bununla birlikte son 20 senede dünya genelinde ve Avrupada yıllık %2'lik artış mevcuttur²¹. Avrupa Birliği'nde 2012 yılında 84400 yeni BHK olgusu ve 34700 ölüm belirtilmiştir²². Görüntüleme şekillerinin yaygın kullanılması ile teşhis konulma sıklığı artış göstermekte ve daha küçük tümörlere daha erken dönemde teşhis konulabilmektedir²³⁻²⁵. Daha erken dönemde teşhis konulmasına rağmen BHK'nin mortalitesi ciddi oranda azalmamıştır²⁶. Mortalitesi en yüksek ürolojik kanserdir (%30-%40). Böbrek kanseri için Amerikan Kanser Derneği'nin 2014 yılı için yapmış olduğu tahmin 63,920 yeni olgu (39,140'ı erkek , 24,780'i kadın) ve 13,860 kişinin (8900'ü erkek ve 4960'ı kadın) bu hastalıktan hayatını kaybedeceği yönündedir²⁷. Dünya Sağlık örgütünün International Agency for Research on Cancer Globocan 2018 Türkiye verilerine göre Türkiye de 81 milyon kişiden 210537'sinde yeni kanser vakası tespit edilmiştir. Bunlardan 116710 kişi hayatını kaybetmiştir. Türkiye de en çok görülen kanser %16,5 oranında Akciğer kanseri ve bunu %10,6 oranında göğüs kanseri takip etmektedir. Böbrek kanseri ise %2,2 oranında 14. Sırada yer almaktadır. Böbrek kanserine yakalanan 4728 kişiden 2484 ü hayatını kaybetmiştir²⁸. BHK ileri yaş hastalığıdır. En fazla rastlandığı yaş aralığı 70-74 yaşlarıdır. Erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 2:1 oranında daha fazla gözlenmektedir^{29,30}. Dolayısı ile erkeklerde gözlenen risk kadınlardakine göre daha fazladır. Hastaların büyük kısmı sporadik olup %2 olgu ise aileseldir³¹. Birinci derece akrabalarında BHK olan insanlarda riskin 4,3 kat arttığı ortaya konulmuştur³².

2. 3. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Böbrek kanseri tek başına seyreden bir kanser türü değildir. Terapiye farklı cevap veren genetik ve histolojik sebeplerle farklı kanser türleri ile beraber görülmektedir. Hastalığa sahip kişilerde gözlemlenen terapiye karşı yanıt çeşitliliği değişik genlerde gözlemlenen mutasyonlar sebebiyle meydana gelmektedir³³.

Renal hücreli karsinomlarda gerçekleştirilen çalışmalar olmasına rağmen halen etiyojisi net olarak bilinmemektedir³⁴. Kromozom anomalileri, hormonlar, çeşitli bakteriyel enfeksiyonlar, obezite, genetik yapı, çevresel atıklar, kimyasal ajanlar, mesleki alanlarda görülen kimyasal ajanlar etiyojide araştırılmıştır^{34,35}.

Etiyojisinde en önemli faktör sigara olmakla birlikte bu erkek olguların %39'unda etkili olmaktadır. İçme suyunda bulunan arseniğin tehlikeyi arttırdığı belirtilmektedir. Bunlardan farklı olarak çok fazla sayıda çevresel kimyasal ajanın sorumlu olabileceği göz önünde bulundurulmuş olup bu ispatlanmamıştır. Bunlar serbest kadmiyum, organik çözücüler, pestisitler ve mantar toksinleridir. Bazı östrojen muadillerin hayvanlarda böbrek tümörlerine sebep olduğu gözlenmiştir. Son dönemlerde Böbrek kanseri ilerleyişinde hipertansiyonun etkisinin olduğunu gösteren bir çok verilere ulaşılmıştır³⁶.

Diyalize uzun süre maruz kalan hastalarda böbrek kanseri gelişiminin yıllık insidansı genel popülasyona oranla oldukça anlamlı olarak artış gösterir. Bunların dışında ailesel öykü, vücut kitle indeksinin fazlalığı, hipertansiyon öyküsü, sigara içimi, sık idrar yolları iltihabı gibi sebepler etiyojide araştırılmış ve bu kişilerde renal hücreli karsinom sıklığının arttığı izlenmiştir^{37,38}.

2. 3. 1. Genetik Faktörler

Protoonkogenler, büyüme faktör reseptörlerini kodlayan genler ve tümör baskılayıcı genler gibi birçok gende rastlanan nokta mutasyonları, heterozigotluk kaybı, delesyonlar ve amplifikasyonlar gibi genetik değişiklikler kanser oluşumunda etkili faktörlerin başında gelmektedir. Böbrek kanseri hücrelerinde de bu genlerin birçoğunda genetik farklılıklar meydana gelmekte ve hastalığın olduğundan daha agresif bir şekil almasına neden olmaktadır. Böbrek kanserlerinin takribi %2-3'ü bazı herediter karsinom sendromlarıyla alakalı olmakla beraber böbrek karsinomlarının çok büyük çoğunluğu genetik yatkınlık olmadan sporadik şekilde görülürler. Hastaların büyük bir kısmı sporadik olup, olguların yaklaşık %2'si ise ailesel faktörlerdir. Birinci derece akrabaları

arasında BHK görülen şahıslarda riskin 4,3 kat fazla olduğu bilgisi verilmiştir. Böbrek kanseri tanısı konulan hastalarda, hastalardaki muhtemel genetik değişikliklerin saptanması neticesinde tümör hareketinin yorumlanması tedaviye vereceği yön açısından da oldukça önemlidir. Bu sebeple, böbrek kanseri tanısı konulan kişilerdeki muhtemel genetik değişikliklerin tespiti ve bu değişiklikler çerçevesinde yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Böbrek kanserinin meydana gelişinde, gende meydana gelen delesyonların ve p16 mutasyonun önemi diğer kanser türlerinde olduğu gibi gösterilmiştir. Belirlenen tüm bu genetik prognostik etkenler ve değişiklikler dışında son dönemlerde literatürde yapılan incelemeler neticesinde böbrek tümörü gelişiminde etkin rol oynayan yeni küçük RNA molekülleri tespit edilmiştir. 17-21 nükleotid uzunluğunda olan ve gen regülasyonunda aktif olarak görev alan mikroRNA'lar bu RNA moleküllerinin başında gelmektedir³⁹.

2. 3. 1. 1. mikroRNA

Böbrek kanserlerinde hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak görev görebilen mikroRNA'lar bulunmaktadır. MikroRNA'lar birçok hücresel fonksiyonun düzenlenmesinde etken bir roldedirler. Bu özellikleri sebebi ile mikroRNA'lar kanser gibi multistep bir süreçte de önemli görevlere sahiptirler. Bir hücrede olması gerekenden farklı bir büyüme gözleendiğinde ve apoptoz yetisini kaybettiğinde genel olarak kanser oluşumuna sebep olur. Yapılan çalışmaların çoğu mikroRNA'ların apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde ve hücre büyümesinde etkin olduklarını göstermiştir. MikroRNA profillemeye çalışmalarının sonucu olarak miR-28, miR-185, miR7-2, miR-224, miR-142-3p, miR-185, miR-34a, miR-21, miR-155, miR-210, miR592, miR-122, miR-215, miR-17 ve let-7f-2 gibi pek çok mikroRNA'nın normal böbrek dokusuna kıyasla böbrek kanserli hücrelerde upregüle edildiği tespit edilmiştir⁴⁰. Bu farklılıklar sebebiyle mikroRNA'lar günümüzde yapılan çalışmalar neticesinde böbrek tümörlerinde genetik marker olarak önemli bir yere sahiptirler.

2. 3. 2. Çevresel faktörler

BHK görülme insidansının artması ve daha erken dönemde teşhis konulmasına karşın mortalite oranlarının hala düşmediği açıkça görülmektedir. Çevre kaynaklı ve düzeltilebilir etkenler malignitelerin gelişiminde etkindir. Bu etkenlerden uzak durulması ile riskte azalma gözlenebilmektedir. BHK görülme sıklığındaki artışın azaltılması için etiyojide rol oynayan risk etkenlerinin belirlenerek bunlarla mücadele edilmesi ve risk grubunda bulunan kişilerin bilgilendirilmesi alınacak önlemlerdendir.

Tütün kullanımı, dozuna bağlı olarak BHK gelişim riskini arttırmaktadır. Pasif olarak maruz kalındığında dahi önemli olduğu vurgulanmaktadır. Tütün kullanımının bırakılmasından sonraki uzun yıllarda risk azalmaktadır. Tütün kullanımına dair alınacak önlem, profilaksi için alınabilecek en etkin yöntemdir. Obezite ve kan basıncının yüksek oluşu diğer önemli faktörlerdir. Obezite için önlem alınması, kan basıncı yüksekliğinin etkili tedavisi alınabilecek diğer koruyucu önlemlerdendir. Mesleki faktörlerin varlığı bu iş alanında çalışan işçilerin ve işverenlerin bilgilendirilmesi ve iş güvenliği konusu ile ilgili gerekli tedbirlerin alınmasında fayda sağlayacaktır⁴¹.

2. 3. 3. Prognostik faktörler

Prognostik faktörlerin değerlendirilmesinde bir takım kriterler belirlenmiştir. “American Joint Committee on Cancer” prognostik faktörlerin; bağımsız ve anlamlı olmasının klinik olarak önemli olduğunu ve tedaviyi yönlendirebilecek şekilde olması gerektiğini belirtmiş, “National Institute of Health” bu kriterlere tekrarlanabilir, klinik uyumu sağlanmış, ucuz ve klinikte uygulanabilir olması maddelerini de ilave etmiştir^{42,43}. “College of American Pathologists” ise bu kriterleri; biyolojik veya klinik geniş serilerde çalışılmış, literatürle iyi desteklenmiş ve/ veya tedavide kullanılabilir ve diğerleri olmak üzere üç ana grupta toplamıştır⁴⁴.

Böbrek hücreli kanser vakalarında hasta ile alakalı prognostik faktörler; semptomların varlığı, sedimentasyon, düşük performans durumu, CRP, kansızlık, kilo kaybı, alkalen fosfataz yüksekliği, serum ferritin düzeyi ve hiperkalsemidir. Tümörle alakalı prognostik etkenler ise; histolojik tip, evre, tümör çapı, nükleer derece, cerrahi sınırlar, metastaz, proliferasyon belirleyicileri, lenfovasküler invazyon, p53 v.s. şeklinde özetlenebilir. Bu prognostik etkenlerin CAP kriterlerine uygun dağılımı (Tablo 1) de verilmiştir⁴⁵. BHK’lerin moleküler genetik özelliklerinin ayrıntılı olarak öğrenilmesi, bireysel hasta prognozunun belirlenmesi ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi yönünde umut vaat etmektedir.

Tablo 1. Böbrek hücreli kanserlerde prognostik faktörler⁴⁵

CAP I	HASTA İLE İLİŞKİLİ	Semptomatik Tümör
		Düşük Performans Durumu
		Sedimentasyon
		CRP
		Kilo Kaybı
		Alkalan Fosfataz
		Hiperkalsemi
	TÜMÖR İLE İLİŞKİLİ	Evre
		Derece
		Histolojik tip
		Sarkomatoid yapı
		Cerrahi Sınır
		Metastaz (Sayısı,rezektabilite,lokalizasyon)
		Toplayıcı duktus Karsinomu
CAP II		Nükleer morfometri
		Anöploidi
		Ki-67 indeksi
		AgNOR
		P53
CAP III		Bcl-2
		Büyüme Faktörleri
		Adezyon molekülleri
		Anjiyogenez
		Sitokinler
		Sitogenetik
		Diğerleri

CAP: Amerikan Patologlar Koleji

CRP:C-Reaktif proteini

2. 4. Böbrek Kanseri Evreleri

Hastalığın anatomik dağılımı göz önünde bulundurularak yapılan TNM (Tümör evreleme sistemi) evrelendirmesi en yaygın kullanılan sistemdir⁴⁶. Prognoz, böbreğe sınırlı tümörlerde daha iyidir⁴⁷. Sağkalım oranı 5 yıllık oranlara bakıldığında Evre I, II, III ve IV için %91, %74, %67 ve %32' olarak bildirilmiştir⁴⁸.

TNM evrelemesinde önemli bir kriter de tümör çapıdır. Bununla beraber sınır değeri ile alakalı çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. TNM 1997 evrelemesinde, tümörler büyüklüklerine göre 2,5 cm ve 7 cm olarak 2 gruba ayrılmıştır. Belirlenen sınırlar, TNM 2002 evrelemesinde 4 cm ve 7 cm olarak belirtilmiş ve 4 cmden küçük tümörlere nefron

koruyucu cerrahi müdahale uygulanabileceği belirtilmiştir⁴⁹. Fakat, çap ile alakalı literatürde belirtilen farklı boyutlar vardır ve bu cerrahinin 4 cm'den büyük tümörlere de uygulanabileceği bildirilmektedir⁵⁰.

TNM 2002 evrelemesinde T3a içerisinde perinefrik veya böbrek sinüs yağ dokusuna invaze tümörler ve adrenal metastazı yapan tümörler beraber yer almıştır. Fakat, T3 evresindeki olgulara göre prognozlarının adrenal metastazlı olgulardan daha kötü olduğunu, buna rağmen T4 olgularından farkının olmadığı bildirilmektedir⁵¹.

1997 evrelemesinden farklı olarak TNM 2002 evrelemesinde, böbrek sinüs invazyonu T3 olarak yer almıştır. Böbrek sinüs ve böbrek sinüs ven invazyonunun BHK'lerde ana invazyon yolu olduğu, 1997 evrelemesinde T1 veya T2 olarak yer alan olguların %28'inde böbrek sinüs invazyonu olduğu ve 2002 evrelemesinde T3a olarak rapor edilmesi gerektiği belirtilmiştir⁵². Fakat, bu gruptaki olguların prognozu hususunda çalışmalara ihtiyaç vardır. BHK'ler için de birçok derecelendirme yöntemi bulunmuştur.

En yaygın kullanılan derecelendirme yöntemi Fuhrman derecelendirmesidir⁵³. Bu derecelendirme nükleolus ve çekirdek özelliklerini temel alır. Yapısal veya hücresel atipiyi kullanmaz. Literatürde bulunan sistemlerin derece geçişlerindeki sınır noktaları değişiklik gösterir. Derecenin belirlenmesi gerektiği gruplar; metastaz gösterenler, cerrahi tedavi sonrası hastalıksız olanlar ve arada kalanlardır. Derecelendirmedeki bir başka sıkıntı histolojisi farklı tümörlerin beraber değerlendirilmesidir. Doku tespiti arasında farklı olması da tespit yetersizliğine bağlı olarak, nükleollerin kaybolması, hiperkromazini, kromatinin yoğunlaşmasının azalması gibi nedenlerle hatalara ve uyumsuzluklara neden olmaktadır. Ayrıca açık olmayan bir konuda tümörün farklı bölgelerinden kötü dereceye sahip olanın derecelendirilmesidir. "Kötü derece ile tanımlanan alan özel bir bölgemi?", "Belirli bir yüzdeyi bulundurmalı mı?" gibi sorular cevap beklemektedir. Yaşanan tüm sorunlara rağmen, önerilen derecelendirme sistemleri prognostik bilgi vermektedir. Derece, metastaz, lokal nüks, patolojik evre ve en önemlisi yaşam süresi ile ilişkilidir⁵⁴⁻⁵⁸. Histolojik derece, aynı evredeki veriler değerlendirildiğinde de, olguları prognostik gruplara ayırabilmektedir.^{48,59}.

2. 5. Böbrek Kanserlerinin Sınıflandırılması

Böbrek hücreli kanserler, morfolojik olarak sınıflandırılmışlar. Onkositomlar 1976'da farklı bir tür şeklinde tanımlanmış⁶⁰, papiller böbrek hücreli kanserler de yine aynı sene ayrıntılı olarak tanımlanmıştır⁶¹. Kromofob böbrek hücreli kanser, 1985'de Thoenes ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır⁶². 1986 yılında ise Toplayıcı duktus kanseri tanımlanarak bildirilmiştir⁶³. 1986'da Thoenes ve arkadaşları böbrek hücreli kanserlerin sitomorfolojik tiplendirmesini yapmıştır⁶⁴. Daha sonra Metanefrik adenomlar tanımlanmıştır. Son 10 yıl içerisinde geniş seriler yayınlanmıştır⁶⁵. Daha önce ayrı bir tür olarak adlandırılıp sınıflandırılan sarkomatoid BHK, tüm alt türlerde (berrak hücreli, papiller, kromofob BHK ve toplayıcı duktus kanseri) görülebildiği için artık ayrı bir tür olarak değil, bu türlerin bir dediferansiasyonu (anaplastik transformasyonu) olarak kabul edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Renal neoplazilerin 2016 DSÖ sınıflaması, renal hücreli tümör alt tipleri ¹²

Berrak hücreli renal hücreli karsinom
Düşük malign potansiyeli multiloküler kistik
Renal neoplazm
Papiller renal hücreli karsinom
Hereditör leiomyomatozis ve renal hücreli karsinoma-ilişkili renal hücreli karsinom
Kromofob renal hücreli karsinom
Toplayıcı kanal karsinomu
Renal modüller karsinom
Mit ailesi translokasyon renal hücreli karsinomlar
Süksinat dehidrogenaz-eksikliği ilişkili renal hücreli karsinom
Müsinöz tübüler ve içsi hücreli karsinom
Tübülökistik renal hücreli karsinom
Edinsel kistik hastalık ilişkili renal hücreli karsinom
Berrak hücreli papiller renal hücreli karsinom
Renal hücreli karsinom, sınıflandırılmayan
Papiller adenom
Onkositom

2. 5. 1. Berrak hücreli renal hücreli karsinom

BHRK'larda neoplastik hücreler duru veya eozinofilik sitoplazmalıdır. Eozinofilik sitoplazmalı olanlar için "Granüler Hücreli BHK" terimi kullanılmıştır. Ancak, eozinofilik sitoplazmalı hücreler başka türlerde de gözlenebildiği için bugün bu

terminoloji kullanılmamaktadır⁶⁶. Olguların yarısına yakını erken evrede belirlenmektedir (Evre 1-2). Perirenal veya sinüs yağ invazyonu ve böbrek veni invazyonu yarıya yakın olguda gözlenir⁵². Daha sık olarak vena cava aracılığıyla akciğerlere yayılım gösterir. Bunların dışında lenfatik yayılım veya retrograd emboli şeklinde vertebralara yayılım gösterebilir. BHRK'da farklı yerlerde ve geç metastazlar sık rastlanır. Evre ve derece prognozda en önemli faktördür.

2. 5. 2. Papiller renal hücreli karsinom

Tubulopapiller ya da papiller yapı gösteren BHK'lerdir. Tüm BHK'lerin %10'luk kısmını oluşturlar. Nekrozikanam vekistik dejenerasyona sık rastlanır. Tümör tamamen nekroza uğradığında, canlı tümör hücresi saptamak çok zor olabilir. Morfolojik olarak 2 tip papiller BHK tanımlanmıştır.

Tip 1, bazal membrana yerleşen tek sıralı küçük hücrelerden, Tip 2 ise psödostratifiye geniş eozinofilik sitoplazmalı nükleer atipisi fazla hücrelerden meydana gelir. Papiller BHK'lerde en sık 7 ve 17. kromozom trizomisi ile Y kromozomu kaybı tespit edilir. Bunların dışında, 12, 16 ve 20. kromozom trizomisi de gözlenebilir⁶⁷. 5 mm'den ufak, benzer morfolojideki tümörlere papiller adenom denmektedir¹². Papiller adenomlarda da papiller BHK'de olduğu gibi Y kromozomu kaybı, 7 ve 17. kromozom trizomisine rastlanmıştır⁶⁷. Bu sebeple de bu lezyonun papiller BHK öncüsü olduğu belirtilmektedir. Papiller adenomlarda izlenen 12, 16 ve 20. kromozom trizomileri ise progresyon göstergesidir.

Papiller BHK, berrak hücrelilere göre daha iyi prognozludur. Papiller BHK'nin morfolojik subtiplerinden Tip 1'in daha iyi prognozlu olduğu, Tip 2'nin ileri evre, derece ve progresyon ile ilişkili olduğu belirtilmektedir^{68,69}. Nekroz olan olgular ise daha iyi prognozludur^{59,70}.

2. 6. Böbrek Kanserinin Tedavisi

Böbrek kanseri, küçümsenmeyecek sıklıkta karşılaşılan ve insidansı yıldan yıla artış gösteren bir kanser çeşididir. Yılda 54.000'den fazla hasta Amerika Birleşik Devletleri'nde böbrek kanseri tanısı almaktadır. Yıl bazında yaklaşık 13.000 hastanın mortalite nedeninin böbrek kanseri olduğu belirtilmektedir⁷¹. Böbrek kanseri, tüm erişkin kanserlerinin %3'ünü oluşturmaktadır ve 72 insandan birinin hayatı boyunca böbrek kanserine yakalandığı düşünülürse, bu hastalığın hiç de seyrek görülen bir malignite olmadığı anlaşılabılır⁷². Erken tanı ve tedavi böbrek kanserinde oldukça

önemlidir. Bilgisayarlı tomografi ve farklı görüntüleme teknilerinin kullanımındaki artış, böbrek tümörlerine teşhis konulmasını kolaylaştırmıştır. Bu nedenle hem böbrek tümörlerinin insidansında, hem de erken dönemde tespit edilen tümör yüzdesinde ki artış gözden kaçmamaktadır. Teşhis esnasında hastaların %30'unda metastaz mevcutken, tanı anında organa kısıtlı tümörü olan hastaların da %30'u takipte metastazla karşımıza çıkmaktadır⁷³. Lokalize böbrek tümörü olan hastaların 5- 10 yıllık sağ kalma oranları %95 civarı iken, hastalığın ileri evrelerinde 2 yıllık sağ kalma oranı %18 civarı olarak belirtilmektedir⁷⁴. Bu kanser çeşidi tek bir hastalık olarak görülmemeli ve ona göre değerlendirilmelidir. Böbrek kanseri tanımlanırsa, böbrekte karşılaşılabilen pek çok çeşit kanser tipini barındıran ortak bir üst başlık olarak düşünülmelidir⁷⁵. En sık rastlanan histolojik tipi berrak hücreli renal hücreli karsinomdur (%75). Daha sonra papiller renal hücreli karsinom (%10), üçüncü sırada ise kromofob renal hücreli karsinom (%5) gelmektedir⁷⁶. Farklı histolojik alt çeşitlerin, farklı genetik temellerinin ortaya konması ile tedavi esnasında başarının artacağı öngörülebilir.

Böbrek kanseri, herediter ve sporadik olacak şekilde iki alt başlıkta toplanabilir. Böbrek kanseri olan kişilerin %3-5'inden herediter formlar sorumludur⁷⁷. Ailesel renal kanser sendromu olan kişilerin sağ kalma oranını arttırmak ve morbiditeyi azaltmak için erken tarama ve sıkı kontrol programları ile takip edilmeleri gerekmektedir. Böbrek kanserinin genetik temeline ait bilgilerin birçoğuna, herediter formlarda yapılan çalışmalar aracılığı ile ulaşılmıştır. Sorumlu genlerin tespiti ve bu genlerin sporadik böbrek tümörleri ile alakasının ortaya konulması ile tümör patogenezi açıklanmakta ve potansiyel moleküler tedavilere şekil verilmektedir⁷⁸. Herediter renal kanserler (HRK), en başta fenotipe yönelik dikkatli gözlemler sonucunda tanımlanmış olup, son dönemdeki genetik araştırma yöntemleri ile spesifik gen mutasyonları meydana gelmiştir.

HRK'ların teşhisinde sendromun klinik özelliklerinin tanınması en mühim basamağı meydana getirmektedir⁷⁹.

2. 7. Çekirdekçik

2. 7. 1. Hücre Çekirdeği

Canlıların hücre çekirdeği; canlının sahip olduğu genom ve bu genetik yapılarla ilişkili bir şekilde işleyiş sergileyen DNA ve RNA onarım mekanizmaları, DNA duplikasyonu, RNA'ların sentezinden başlayarak, işlenmesi ve taşınması gibi bağıntıların gerçekleştiği

yerdir. Yapılan çalışmaların çoğu canlı hücrelerin içinde bulunan çekirdeğin o hücre de yer alan en mühim ve karmaşık organellerden olduğunu gösterir⁸⁰⁻⁸⁴.

Tümör hücrelerinde bulunan çekirdek yapısında gerçekleşen birçok değişiklik, patoloğlar için önemli teşhis ve prognostik faktörler olarak kullanılmaktadır⁸⁵⁻⁸⁷. Çekirdekta gerçekleşen değişiklikler ve kanser mekanizması arasındaki ilişki uzun yıllardır araştırılmış ve elde edilen veriler her geçen gün bu ilişki hakkında ki bilgi dağarcığımızın artmasına sebep olmuştur. Buna rağmen bu ilişki tamamen anlaşılamamış ve günümüzde de bu konuyla alakalı olan çok sayıda çalışmalar yapılmaktadır^{83,88,89}.

2. 7. 2. Çekirdekçikte rRNA'ların sentezi ve işlenmesi

Çekirdekçik, pre-ribozomal RNA'ların sentezinin yapıldığı ve bunların işlendiği çekirdek bölgesidir⁹⁰. Çekirdekçik oluşturan bölgeler; granüler bölge, ipliksi bölge, yoğun ipliksi bölge ve peri-intra nukleolar kromatin olmak üzere dört alt başlıkta tanımlanabilir. Çekirdekçik hücrelerde görülen tüm RNA'ların yarısından fazlasının sentezi ve işlenmesinden sorumludur⁹¹. Çekirdekçik, 1978 yılında Fontana tarafından çekirdek içerisindeki oval şekilli dört bölge olarak tanımlanmıştır. O dönemden bu yana çekirdekçik, birçok incelemenin konusu olmuştur. İçinde yer aldığımız periyot, çekirdeğin faaliyetlerinin ve organizasyonlarının anlaşılması ve bilim adamları tarafından öneminin kavranması açısından çekirdekçigin altın çağıdır. 1934 yılında McClintock, çekirdekçigin, çekirdekçik organize edici bölgenin (NOR) aktivasyon süresince telofazda organize olduğunu öne sürmüştür⁹². Yapılan araştırmalarda NOR'ların, Zea mays'ın 6. kromozomunun spesifik bir bölgesine uyum gösterdiğinin belirlenmesi, çekirdekçigin gen aktivitesiyle ilişkisinin olduğunun ilk olarak düşünülmesine neden olmuştur. 1950'lerde çekirdekçikte RNA'ların bulunduğu gösterilmiş ve 1960'larda in situ hibridizasyon yöntemleri çekirdekçik organize edici bölgedeki ribozomal genlerin (rDNAs) belirlenmesine imkan sağlamıştır^{93,94}. Yine çekirdekçigin küme halinde izolasyonu çekirdekçik komponentlerinin biyokimyasal karakterizasyonuna eşlik etmiş ve elde edilen bu bulgulardan hareketle ribozom biyogenezisinin çekirdekçikte gerçekleştiği ileri sürülmüştür⁹⁵.

2. 8. Çekirdekçik Oluşturan Bölgeler (Nucleolar Organizer Regions; Nors)

Çekirdekçik oluşturan bölgeler (NORs), ilk kez Heitz (1931) ve McClintock (1934) tarafından yapılan çalışmalar neticesinde tanımlanmıştır⁹⁶. İlk başlarda NOR'lar

mitozun sonunda meydana gelen çekirdekçiğin etrafındaki morfolojik bölgeler şeklinde ifade edilmiştir⁹². NOR'lar, 45S(18S + 5.8S + 28S) pre-ribozomal RNA gen kodlarının ard arda tekrarlanan ardışık kopyalarını bulundurur⁹⁷. İnsan haploid genomu, ortalama olarak 43.3 kb uzunluğunda 400 ribozomal gen ünitesi birimi içermektedir⁹⁸. Her bir ünite 13.3 kb transkribe edilebilen (18S + 5.8S + 28S) ve 30 kb transkribe edilemeyen bölgelerden meydana gelmektedir⁹⁹. Akrosentrik kromozomlardaki rDNA kümelerinin heterojenitesi ve hücre tipleri klasik moleküler yaklaşımlara mani olmaktadır¹⁰⁰.

Sakai ve arkadaşları, (1995), rDNA genlerinin ardışık tekrarlanma sayısının takribi olarak her bir kümede 70 olduğunu saptamışlardır. Bu rDNA genleri, DNA topoizomera I (Topo I), upstream binding faktör (UBF), RNA polimeraz I (RPI), ve promotor seçici faktör (SL1) gibi transkripsiyonel proteinler ile ilişki içerisinde^{101,102}. Çekirdekçik ve NOR'ların iyi bilinen Gümüş sevme (Argirofili) özelliği, AgNOR bantlama tekniğinin temelini meydana getirmektedir^{103,104}.

Nonhiston proteinleri sebebiyle gümüşle boyanan bu bölgeler, AgNOR proteinleri şeklinde isimlendirilmektedir⁶. Bunlar metafazda rDNA genlerinin etrafında ve esasen interfazda çekirdekçiğin ipliksi komponentinde yerleşmektedir, RPI ve UBF major metafaz AgNOR proteinleri olarak önerilmektedir¹⁰².

NOR'lar, insanlarda var olan beş çift akrosentrik kromozomun (13, 14, 15, 21 ve 22'nci çiftler) ikincil boğumu olarak belirtilen satellit saplarında yerleşen ve aktifken gümüş ile boyanabilen ribozomal gen bölgeleridir. NOR'lar ile alakalı olan proteinler, gümüş iyonlarını bağlayarak seçici olarak boyanabilen, asidik non-histon tipi proteinlerdir. Gümüş, transkripsiyonel olarak etkin olan ya da transkribe edilebilen rDNA kısımlarına bağlanır ve rRNA'nın nonhiston proteinlerine bağlı olarak kalır¹⁰⁵. Aktif transkripsiyon esnasında ribozomal RNA genleri (rRNA), RNA polimeraz I ile çekirdekçikte bulunur. İnsan diploid hücrelerinde NOR'lar, akrosentrik kromozomların kısa kollarında ribozomal RNA (rRNA) genleri için kodlanan ve ardışık olarak tekrarlanan çok sayıda ribozomal genlerin hemen hemen 300-400 kopyasını bulundurur¹⁰⁶.

2. 9. NOR Proteinleri

Hücre döngüsü süresi boyunca, döngünün en hareketli olduğu esnada en yüksek miktarda AgNOR proteini sentezlemektedir¹⁰⁷. Nukleolin ve protein B23, çeşitli memelilerin artan hücrelerindeki iki ana proteindir¹⁰⁸. Bu iki protein genel boyanmanın % 60-75'ini meydana getirir¹⁰⁹. Bunlara ilaveten Nopp 140, RNA Polimeraz-I Alt

Birimleri, UBF (Transkripsiyon Faktörü) ve 135 kDa'luk AgNOR proteininde bulunmaktadır.

2. 9.1. Nukleolin (C23 Proteini)

Nukleolin, sıklıkla görülen çekirdek fosfoproteinlerinden bir tanesidir ve çekirdekçiğin birçok fonksiyonu bu proteinler tarafından gerçekleştirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, nukleolinin, öncü rRNA'nın parçalanma başlangıcının gerçekleşebilmesi için zaruri olduğu gösterilmiştir¹¹⁰. Nukleolinin aynı esnada, pol II'nin transkripsiyonel düzenlenmesinden, immünoglobulin sınıfından genlerin çalışmasına kadar uzanan çeşitli ekstrasükleer işlevleri vardır¹¹¹. Nukleolin, ekspresyonu hücre siklusuna bağlı ana bir AgNOR proteindir. Bu proteinin ekspresyonu onun AgNOR boyanma miktarına bakarak saptanabilir¹¹².

Nukleolinin ekspresyon seviyesi dinlenme halindeki hücrelerde azalmaktadır¹¹³. Nukleolinin ekspresyonu hücre siklusu süresince düzenlenebilir ve bunun düzenlenmesi G1/S geçişinde bir artmayla, G2/M geçişinde de olası bir azalmayla alakalıdır. Bu sebeple nukleolinin ekspresyon seviyesinin belirlenmesi, hücre proliferasyon aktivitesinin değerlendirilmesi anlamı taşımaktadır^{114,115}.

2. 9. 2. Nükleofosmin (B23 Proteini, Neumatrin ya da No38)

Pre-ribozomal partiküllerin olgunlaşmasında ve nükleositol plazmik transport işleminde görevli olan, oldukça fazla bulunan bir çekirdekçiğ proteinidir. Yapılan araştırmalar, B23'ün ribozomların bir araya gelmesinde bir şaperon olarak faaliyet gösterdiğini desteklemiştir¹¹⁶.

İnterfazda major AgNOR proteinlerinden biri olan protein B23, 35–40 kDa'luk moleküler ağırlığıyla ribozomal olmayan RNA'ya bağlanmış bir fosfoproteindir. Ratlarda ve insanlarda B23, en az iki izoformda sentezlenir. Bunlar; B23'ün majör nükleolar formu olan 37–38 kDa'luk B23.1 ve 35–36 kDa'luk B23.2'dir. Bu her iki izoformu, tek bir gen tarafından kodlanmaktadır. Ultra yapısal düzeyde, B23 esas olarak ön ribozomların toplandığı çekirdekçiğ içi bir bölge olan granüler bölgede bulunur. Etkin olarak çoğalan hücrelerde bu bölge, çekirdekçiğ hacminin takribi %60'ını oluşturur. Aslında çoğalma görülmeyen hücrelerde (insan periferik kan lenfositlerinde olduğu gibi) bu bölge ciddi ölçüde küçülmüştür. Bu sebeple B23, hücre proliferasyon hızını göstermek için güvenilir bir immünohistokimyasal markıdır. Dolaylı olarak

nükleofosmin seviyesinin belirlenmesi, farklı hastalıklarda teşhis ve hastalığın ilerleyişini tahmin etmede yardımcı olabilir¹¹⁷.

2. 9. 3. NOPP 140

Çekirdekçik fosfoproteinlerinden bir diğeridir. Yapılan bir araştırmada, Nopp 140'ın small nucleolar ribonucleoproteinler (snoRNPs)'nin komponentleri olan çekirdekçik fibrilların proteini ve NAP57'nin yalnızca çekirdekçiğe değil, özdeş zamanda katlanmış cisimciklere (coiled body) rehberlik ederek, her iki yapı arasında işlevsel bir bağlaç olarak rol oynadığı gösterilmiştir¹¹⁸. Yine farklı araştırmalarda ise çekirdekçik ve katlanmış cisimcikler arasında snoRNPs¹¹⁹ ve small nuclear ribonucleoproteinler (snRNPs)¹²⁰ için bir trafik akışı olduğu tespit edilmiş ve gösterilmiştir.

2. 9. 4. RNA Polimeraz-I alt birimleri

180 kDa'luk AgNOR proteini, RNA polimeraz-I'in en büyük alt ögesidir. RNA polimeraz-I'ler, transkripsiyon ve transkripsiyonun aktif olmadığı durumlarda çekirdekçiklerdeki boyanmaya katılabilirler. Ribozomal genlerle birleşebilen mitotik AgNOR proteinleri, interfaz süresince AgNOR boyamanın asıl seviyesini meydana getirmektedir¹⁰².

2. 9. 5. UBF (Transkripsiyon Faktörü)

RNA polimeraz-I'in transkripsiyon faktörü olan 97–94 kDa'luk bir proteindir. RNA polimeraz-I yukarı kanat bağlanma faktörü'nün mitoz boyunca ribozomal genlerle birleşerek o şekilde kaldığı bilinmektedir¹⁰².

2. 9. 6. 135 KDA'LUK AgNOR Proteini

Kromozomal ekstraktlar, 135 kDa'luk bir AgNOR proteini bulundurular. Bu protein oldukça fosforlanmış olup, AgNOR proteini olarak tavsiye edilen ilk proteindir. Bu protein NOR'ların ana bir bileşenidir ve proliferasyonun bir markır'ı olduğu öne sürülmektedir ancak bu bağlantı tüm boyutlarıyla tam olarak aydınlatılmış değildir¹⁰².

2.9.7. Tümör Patolojisinde interfaz AgNOR'ları

AgNOR parametresinin, tümör patolojisinde ilk uygulaması Ploton ve arkadaşları tarafından yapılmıştır¹²¹. Bu araştırmacıların yaptığı araştırmalarda insan böbrek kanser hücrelerinin yüksek oranda AgNOR proteinleri ile karakterize edildiğini göstermişlerdir. Yapılan öncü çalışmadan sonra, interfaz AgNOR proteinlerinin çekirdek içerisindeki çeşitli dağılımlarını esas alarak, kanser hücrelerini normal

hücrelerden ayırt eden çok fazla çalışma yapılmıştır. Bu sebeple kanserli hücreleri hasta olmayan hücrelerden ayırmada interfaz AgNOR proteinlerine sıkça rastlanır⁹⁶. Melanokarsinomlar ve neoplastik hücreler (hem metastatik karsinoma hem mezotelioma) ve insan plöral effüzyonlarındaki reaktif hücreler arasında, interfaz AgNOR proteinlerinin değerleri açısından herhangi bir örtüşme bulunamamıştır¹²². Tümör patolojisinde AgNOR parametrelerinin en verimli uygulaması ise kanser hastalığının ilerleyişini tanımlama sebebiyle yapılmaktadır. İnterfaz AgNOR değerlerindeki farklılıkların, akciğer ve karaciğer kanserli hastalardaki tümör kütleindeki hızlı artışı ile alakalı olduğu gösterilmiştir^{123,124}. AgNOR yönteminin benign ve malign lezyonları ayırt edebilmek sebebiyle çok farklı neoplastik lezyonların patolojik materyalleri üzerinde başarılı bir şekilde uygulandığı iyi bilinmektedir^{125,126}.

AgNOR proteinleri birçok kanser türünde hücresel proliferasyonun bir indikatörüdür⁹⁻¹¹. Bu bölgelerin aktiviteleri doğrudan protein sentezi ile alakalıdır. Bu sebeple, aktif NOR sayıları, artan hücresel aktiviteyle artar. Burada bahsedilen yöntemi kullanarak yapılan daha önceki çalışmalarda, ortalama AgNOR sayısı ve TAA/ÇA oranının papiller tiroid kanserinde benin tiroid nodüllerine göre anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir¹⁰. Aynı zamanda yeni bir yaklaşım olarak total AgNOR alanının total çekirdek alanına oranının (TAA/ÇA oranının tespitinin) malin ve benin tiroid lezyonlarda hücrelerin proliferasyon aktivitesinin tespit edilebilmesi için oldukça uygun bir yöntem olduğu ve rutin sitopatolojiye katkı sağlayabileceği tespit edilmiştir^{9,10}. Farklı bir çalışmada bu yeni yaklaşımla bulunan cut-off değerlerinin foliküler adenom ve foliküler tiroid karsinomunun cerrahi öncesi ayırımına yardım edebileceği ve rutin sitopatolojiye katkı sunabileceği bildirilmiştir¹²⁷. Buna ek olarak ince iğne aspirasyon biyopsisinde örneğin doğru lokalizasyondan alınıp alınmadığını tespit etmek amacıyla, normal tiroid dokusundan benin nodülleri ayırmak için bir cut-off değeri elde edilmiştir¹¹.

Böbrek kanseri; hücre kinetiği çalışmak için kullanılan yöntemler olan Tritium-etiketli histootoradyografi, AgNOR boyama tekniği ve Ki67/MIB-1 immünohistokimyasal tekniklerinin kullanımı ile yavaş, orta ve hızlı proliferasyon gösteren tümörler olarak gruplara ayrılabilir. Bu teknikler klasik histoloji ve sitolojiye ilaveten düşük, orta ve yüksek dereceli derecelendirmelerin yapılabilmesi için önemli tamamlayıcı yöntemlerdir ve ön koşullar olarak karşımıza çıkmaktadır¹²⁸.

Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge doku belirteçleri olan Bcl-2 ve p53'ün ekspresyonundaki değişikliklerle ve DNA üzerinde gümüş boyalı çekirdekçik düzenleyici bölgelerin (AgNOR) varlığı ile böbrek adenokarsinomalarında belirtilebilir. Kanseri oluşumunu teşvik eden ve baskılayan mekanizmaların hesaba katılması ile kanser evresi ve derecesi ile ilişkilendirilebilecek bir matematiksel modelin geliştirilmesi, hastalık davranışını incelemek için yararlı olacaktır¹²⁹.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Gereçler

1. Etüv (Thermo Scientific)
2. Karbondioksitli (CO²) 'li inkübatör (SANYO)
3. Santrifüj (Heraeus)
4. Su banyosu (PolySciencet)
5. Vorteks (IKA MS1)
6. Mikroskop (Olympus, CX41)
7. Mikroskop ataşmanlı renkli dijital kamera video kamera ZEISS AxioCam ICc5 model)
8. Bilgisayar (DELL Optiplex 3020)
9. Mikroskop (Nikon Labophot 2, Olympus model CHK)
10. Fotomikroskop (Olympus)
11. Manyetik karıştırıcı (IKA cMAG HS7)
12. Laminar air flow kabin (NÜVE LN 120)
13. Hassas terazi (RADWAG AS 220/C/2)
14. Derin dondurucu (Ugur Derby)
15. Buzdolabı (Arçelik)
16. Otomatik pipet (Socorex Swiss, 1000µL)
17. Zaman ayarlayıcı
18. pH metre (Ino Lab)
19. Invert Mikroskop (WESCO)
20. Vortex (BiöCote Staurt)
21. Bilgisayar yazıcısı (Samsung CLP-315)
22. Bidistile su cihazı (PURE LAB flex)
23. Mikrotom (Shandon Finesse ME)
24. Isıtıcı tabla (Barnstead/Labline)

Sarf Malzemeler

1. İnsan böbrek kanser hücre kesiti
2. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
3. Metanol (Merck, 502K5275408)
4. Lamel yapıştırıcı (Entellan, Merck, 640171987)
5. İmmersiyon yağı (imersiol, Merck, 09406599)
6. Hidroklorik Asit (HCL,Merck,0070135)
7. Kurutma kağıdı
8. Ksilol (Carlo Erba, 492306)
9. AgNO₃ (Gümüş Nitrat) (Merck,30474310228)
10. Etanol (Merck, K21078586)
11. Jelatin (Merck, 39166778-839)
12. Formik asit (Merck, K39189264836)
13. pH Universal _ndikatör pH 0-14 (Merck)
14. Distile su
15. Çesitli cam laboratuar malzemesi
16. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü (Grainer, polystrene)
17. Filtre kâğıdı (Whatman Filter Papers 25mm)
18. Enjektör 2ml, 5ml, 10ml (Sterijen)
19. Pastör pipeti
20. Lam (Objektträger)
21. Lamel (Menzel-Glasser 24x32mm)
22. Alüminyum Folyo

3. 2. Yöntem

3. 2. 1. Çalışma gruplarının belirlenmesi

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya böbrek kanseri tanısı almış ve parafin blokları bulunan 16 hasta alınmıştır. Böbrek kanseri şüphesiyle opere edilmiş bireylerin parafine gömülmüş sağlıklı hücrelerinin bulunduğu böbrek hücreleri kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Bu grupların her biri için ayrı ayrı parafine gömülmüş böbrek hücrelerinden polilizin lama kesitler alınıp, deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra, hazırlanan bu preparatlar havada kurutularak 5 dakika metanolde fikse edilip, AgNOR boyama işlemi uygulanmıştır. Daha sonra insan böbrek kanseri hücrelerini içeren parafine gömülü dokulardan alınan kesitlerdeki hücrelerde AgNOR sayısı ile toplam AgNOR alanı / Çekirdek alanı (TAA/ÇA) değerleri bir bilgisayar programı (ImageJ version 1.47t, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) kullanarak hesaplanmıştır.

3. 2. 2. Böbrek kanser hücresi kesitinin alınması

Kullanılan Çözeltiler

%100'lük Etil Alkol

Bir şalenin içerisine %100'lük etil alkol konulmuştur.

%96'lık Etil Alkol

Absolute % 100'lük etil alkolden 96 ml bir mezüre alınıp, 4ml distile su ile üzeri 100 ml'ye tamamlanmıştır

%70'lik Etil Alkol

Absolute (%100)'lük etil alkolden 70ml bir mezüre alınarak üzeri 30 ml distile su ile 100ml'ye tamamlanmıştır.

Ksilol

Bir salenin içerisini dolcak şekilde ksilol konulmuştur.

3. 2. 2. 1. Böbrek kanser hücresi içeren doku kesiti preparatı hazırlanması ve fiksasyon aşaması

Çalışma hipotezine uygun olarak, daha önceden tespit edilmiş olan böbrek kanserli hastalara ait parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5 mikron'luk kesitler alınıp bir fırça yardımıyla su banyosu içerisine konulmuş ve buradan da bir polilizin lamin üzerine alınmıştır. Hazırlanan bu lam parafin bloğun erimesi için ısıtıcı bir tabla

üzerinde yaklaşık olarak 15 dakika bekletilerek parafin eritildikten sonra daha önceden hazırlanmış olan bir şalenin içerisindeki ksilole konulup 15 dakika bekletilerek deparafinizasyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra da sırasıyla azalan etil alkol serilerinde (%100, %96 ve %70'lik) 5'er dakika bekletilmiştir. Alkol serilerinden çıkarıldıktan sonra, 5 dakika distile suda bekletilip rehidrasyon işlemi tamamlanmış ve oda sıcaklığında kurutulup NOR boyama işlemine hazır hale getirilmiştir.

AgNOR Boyama İşlemi

Kullanılan Çözeltiler

% 50'lik AgNO₃ Çözeltisi

1g AgNO₃'ün 2 ml enjeksiyonluk bidistile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan bu çözelti kullanım aşamasına kadar +4 °C' de ve karanlıkta saklanmıştır.

% 1'lik Formik asit Çözeltisi

1 ml formik asitin üzeri distile su ile 100ml' ye tamamlanıp homojen dağılımı sağlanarak hazırlanmıştır.

% 2'lik Jelatinli Formik asit Çözeltisi

Oda sıcaklığında 98 ml % 1'lik formik asit içinde 2g jelatinin manyetik ısıtmalı karıştırıcı yardımıyla çözünmesiyle (% 2'lik jelatin) elde edilmiştir. Elde edilen karışım filtre kâğıdından süzülerek kullanım aşamasına kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

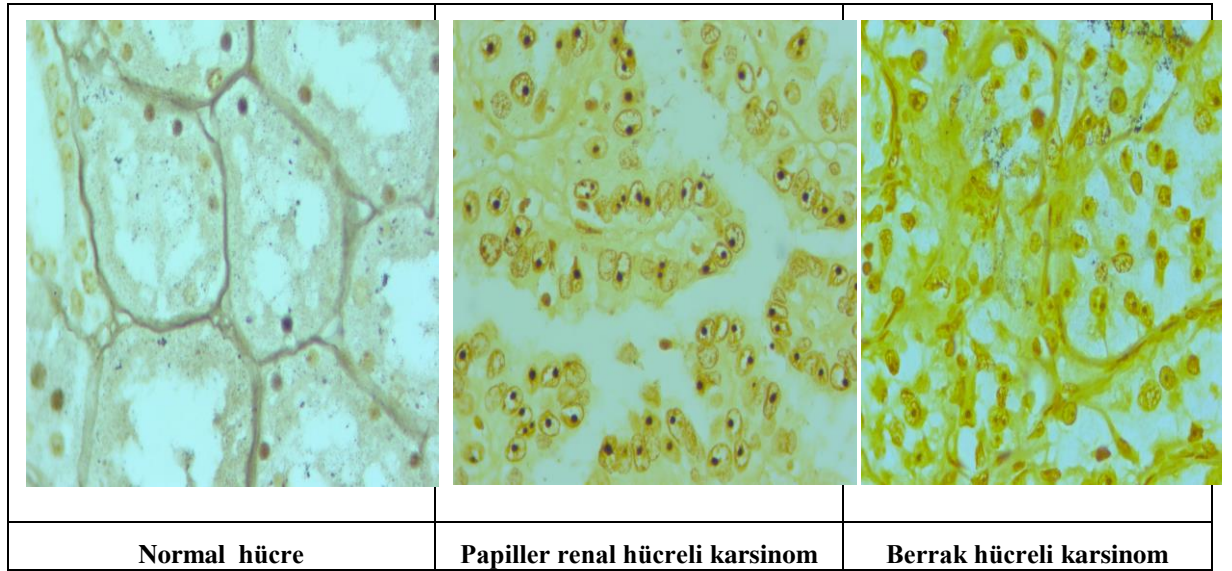
Gümüş Boyama Çözeltisi

Daha önce hazırlamış olduğumuz % 50'lik AgNO₃'den 1 ml (iki hacim), % 2'lik Jelatinli Formik asit'den 0.5 ml (bir hacim) alınarak, ışıktan korumak için etrafı alüminyum folyo ile kaplanmış bir tüp içerisinde pastör pipeti yardımıyla karıştırılarak hazırlanmıştır. Gümüş Boyama solusyonu her kullanımda yeniden hazırlanmıştır.

Böbrek kanseri hücre kesitinden elde edilen preparatlar Benn-Perle ve Lindnerin protokolunun^{130,131} hafif modifiye edilmiş hali ile AgNOR boyamaya tabi tutulmuştur.

Bizim kullandığımız bu teknikte, sıcaklık 37°C'ye çıkarılırken süre 15 dakikaya

düsürülmüştür. Böbrek kanseri hücrelerini içeren preparatlar ilk önce 10 dakika metanolde bekletilerek fiksasyon sağlanmış ve daha sonra oda sıcaklığında havada kurutulmuştur. Havada kurutulan preparatlar daha sonra içinde nemli ortam oluşturmak amacıyla su ile ıslatılmış kurutma kâğıdının bulunduğu petri kabının içerisine yerleştirilmiştir. Preparatların üzerine daha önceden boyama amacıyla hazırlamış olduğumuz gümüş boyama solüsyonundan pastör pipeti ile preperattaki hücre yoğunluğu göz önünde bulundurularak 3-4 damla damlatılmış ve üzerleri lamelle kapatılmıştır. Sonra hızlı bir şekilde petri kabının kapağı kapatılarak, etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılmış ve 37 °C'deki etüvde 15 dakika bekletilmiştir. 15. dakikanın sonunda etüvden çıkarılan preparatlar üzerlerindeki lameller düşünceye kadar distile su ile yıkanmış ve kurutma kağıdının üzerinde beklemeye alınmıştır. Sonuçta tüm preparat üzerindeki bütün bölgelerde hedeflediğimiz kalitede homojen AgNOR boyalı böbrek kanseri hücrelerini içeren preparatlar elde edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. AgNOR boyama işlemi yapılmış normal hücre, berrak hücreli karsinom ve papiller renal hücreli karsinomun karşılaştırılması

3. 2. 3. Gruplara göre böbrek hücrelerindeki interfaz NOR aktivitelerinin değişiminin değerlendirilmesi

Böbrek kanseri doku kesitine ait hücrelerdeki interfaz NOR aktivitelerinin değişimini tespit etmek için, AgNOR boyama işlemi uygulanmış her bir preparattan 50 interfaz çekirdeği incelenmiştir. Her üç grupta böbrek hücrelerinin interfaz NOR aktivitelerinin değişimi kamera ataçmanlı ışık mikroskobu ve bir bilgisayar programı yardımı ile değerlendirilmiştir.

3. 2. 4. Kamera ataçmanlı ışık mikroskobu yardımı ile interfaz NOR'larının analiz işlemleri

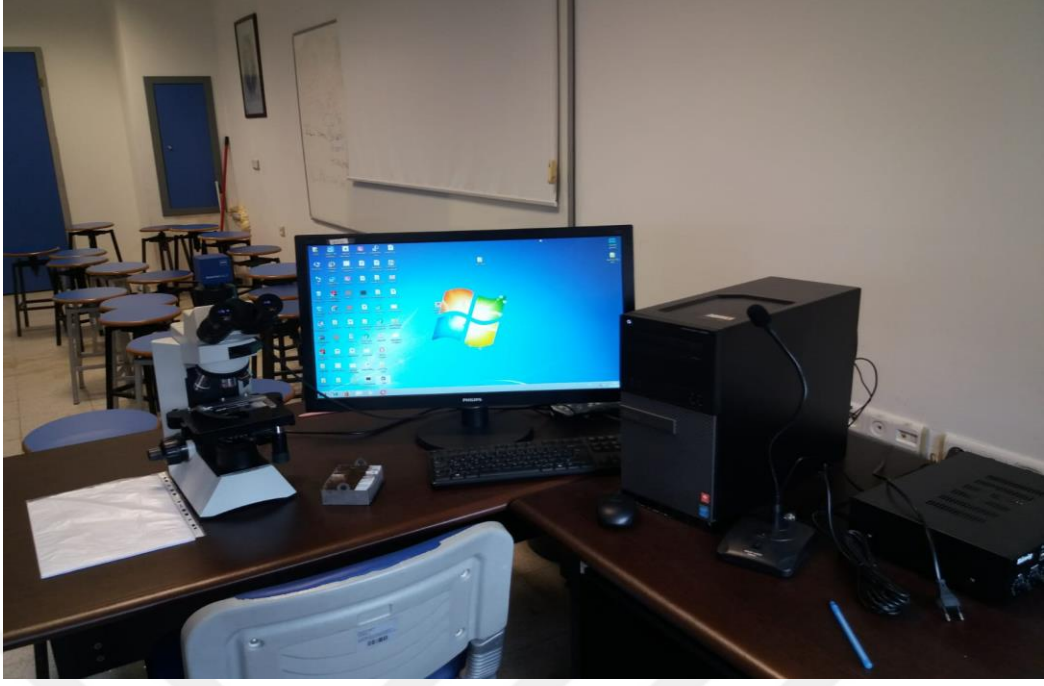
Belirlenmiş olan gruplara göre interfaz NOR aktivitelerindeki değişiklikleri belirlemek amacıyla, AgNOR boyama protokolüne göre boyanmış olan her bir preparattan 50 interfaz alanı, doğrudan kamera ataçmanlı bir ışık mikroskobu altında ve yüksek büyütmede (1000X) incelenmiştir. Gümüşle boyalı böbrek kanseri hücrelerinin AgNOR proteinlerinin, interfaz hücre çekirdeğine oranı, bu amaç için hazırlanan özel bir bilgisayar programı analizi yardımı ile ölçülmüştür. Buna ilaveten her bir bireyin 50 hücresindeki AgNOR sayıları sayılarak, ortalama AgNOR sayı değerleri hesaplanmıştır. Bilgisayarda ölçüm işlemleri için aşağıdaki basamaklar sırasıyla takip edilmiştir.

3. 2. 5. Bilgisayarda interfaz NOR'larının ölçüm işlemleri

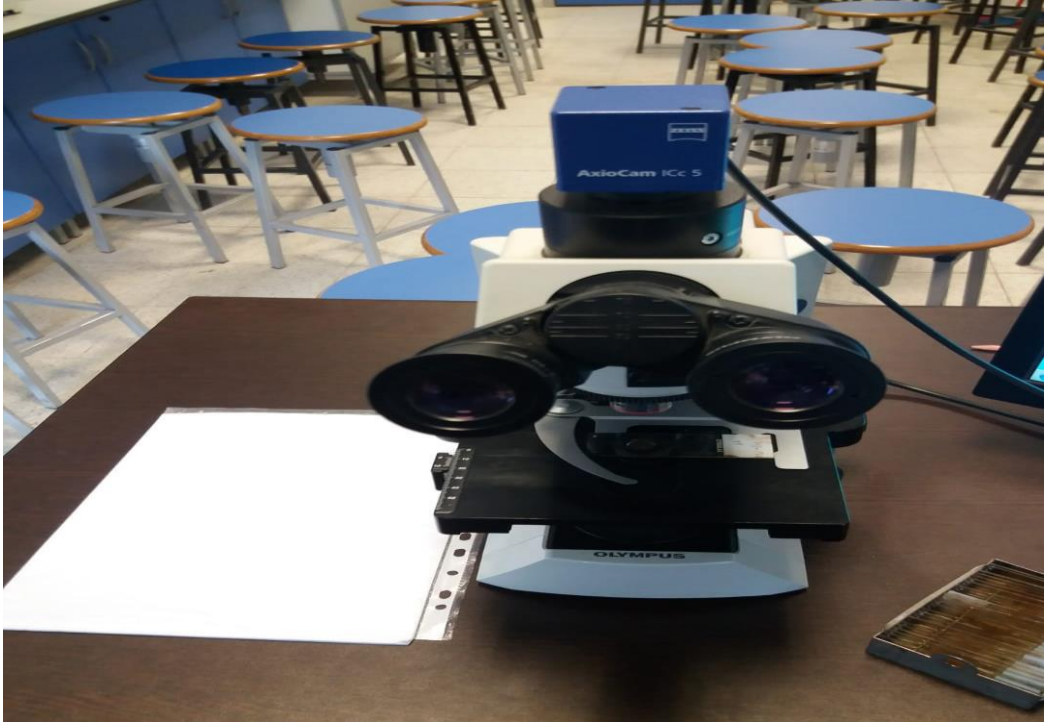
Böbrek kanseri hücre gruplarına göre, hücrelerdeki interfaz NOR aktivitelerinin değişimini değerlendirmek için, AgNOR boyalı her bir preparattan 50 interfaz alanı aşağıdaki basamaklar takip edilerek değerlendirilmiştir.

3. 2. 5. 1. Böbrek kanseri hücre görüntülerinin elde edilmesi

Analiz işleminde kullanılacak olan böbrek kanseri hücre çekirdeklerinin görüntüleri kamera ataçmanlı bir ışık mikroskobundan (100 x 10 büyütme) bilgisayar ortamına bir video kamera (LEICA DFC 420 C model) aracılığı ile aktarılmıştır (Şekil 2, 3). Kameradan alınan görüntüler, üzerinde analiz işlemi yapılmak üzere jpg türü resim formatında bilgisayara kaydedilmiştir.



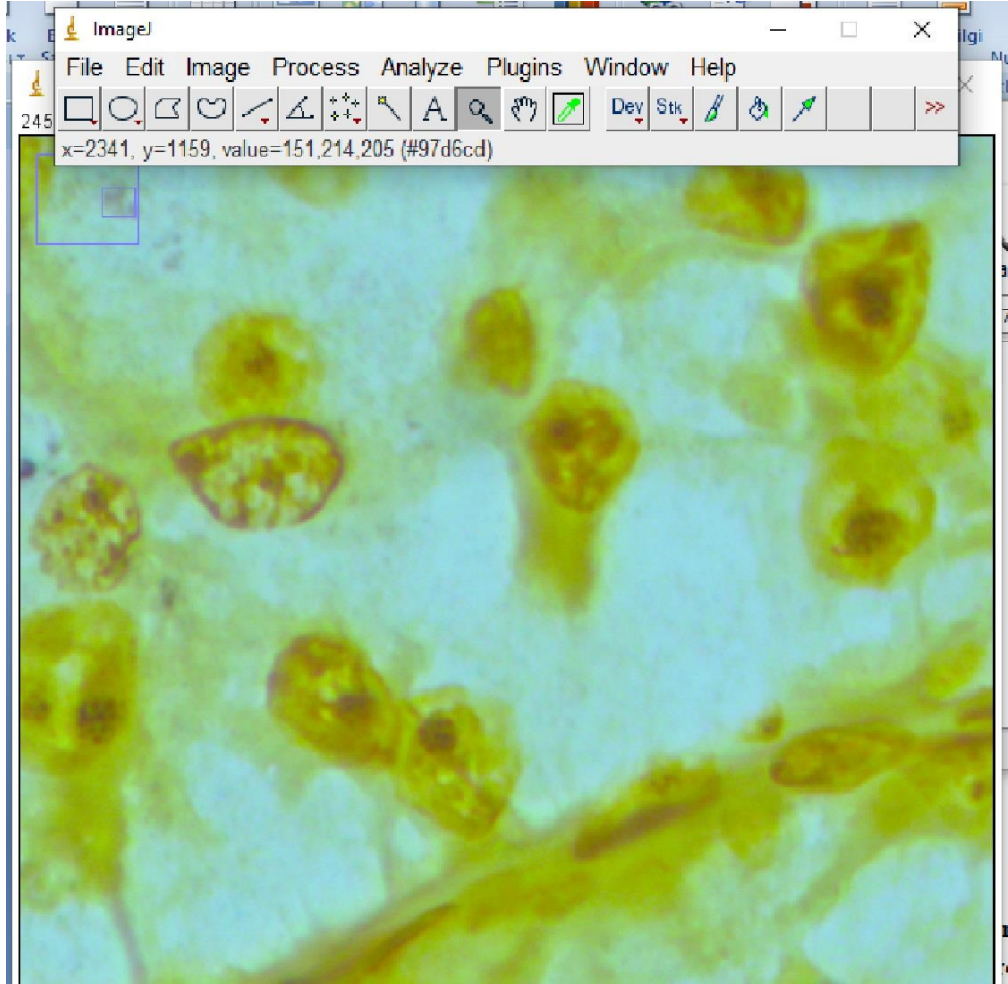
Şekil 2. Analiz işleminde kullanılan kamera ataçmanlı ışık mikroskobu ve bilgisayar düzeneği



Şekil 0. Analiz işleminde kullanılan kamera ataçmanlı ışık mikroskobu

3. 2. 5. 2. Elde edilen görüntülerin analiz işlemi

Standardize edilen görüntüler aynı programla (ImageJ version 1.47t, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) analiz edilmişlerdir. Analiz işleminde kullanılan programın görüntüsü Şekil 4’de görülmektedir.

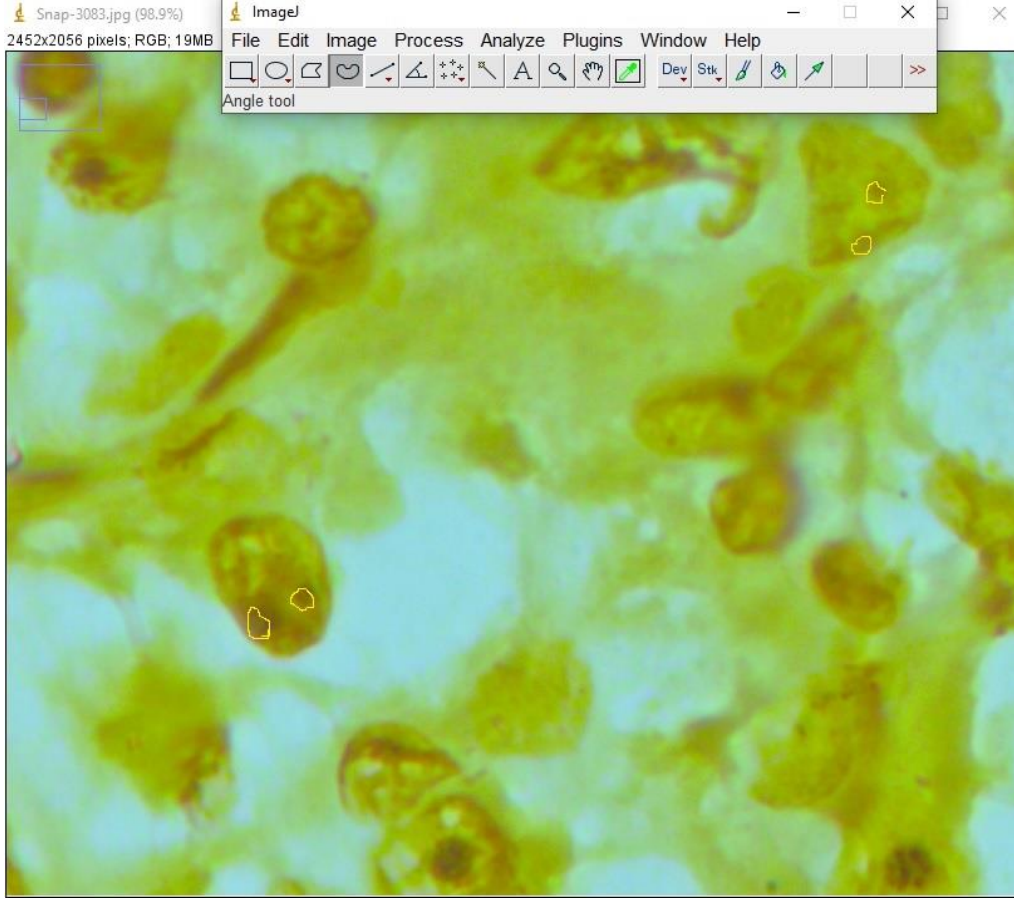


Şekil 3. Analiz işleminde kullanılan program ve analiz edilecek berrak hücreli karsinom.

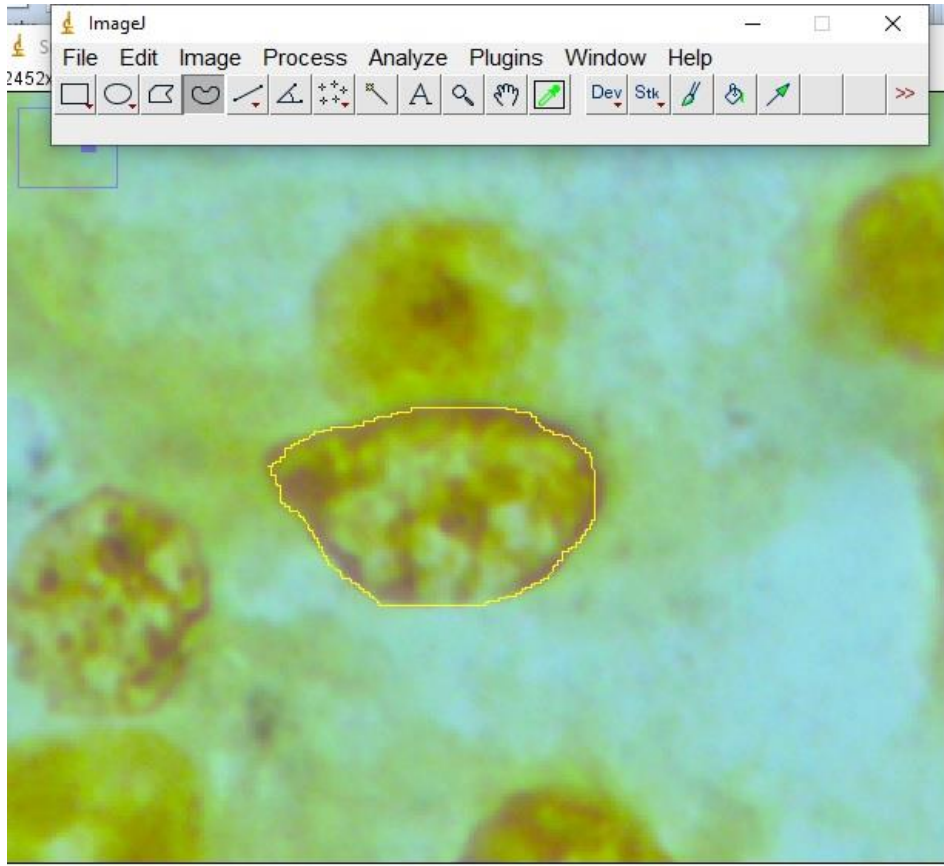
3. 2. 5. 2. 1. NOR bölgelerinin belirlenmesi

Analiz programı yardımıyla NOR içeren bölgelerin seçimi “freehand selection” paneli kullanılarak yapılmıştır. Bu yolla seçilen bölgeler dışında NOR bölgesi olduğu düşünülmeyen fazla seçilmiş diğer bölgeler ise programın sunduğu çeşitli araçlar sayesinde seçime dahil edilmemiş olup seçimin dışında bırakılmıştır. NOR bölgelerinin belirlenmesinde bilgisayar programı yol gösterici olarak kabul edilip analiz yapan kişinin kararları esas alınmıştır. (Şekil 5, NOR bölgeleri belirlenmiş bir böbrek kanseri hücre çekirdeğini göstermektedir. Daha sonra tespit edilen bu NOR bölgeleri hesaplanarak, çekirdek alanının belirlenmesine geçilmiştir (Şekil 6, 7). NOR bölgeleri hesaplanmış bir böbrek kanseri hücre çekirdeği Şekil 8’de görülmektedir. Her bir grup

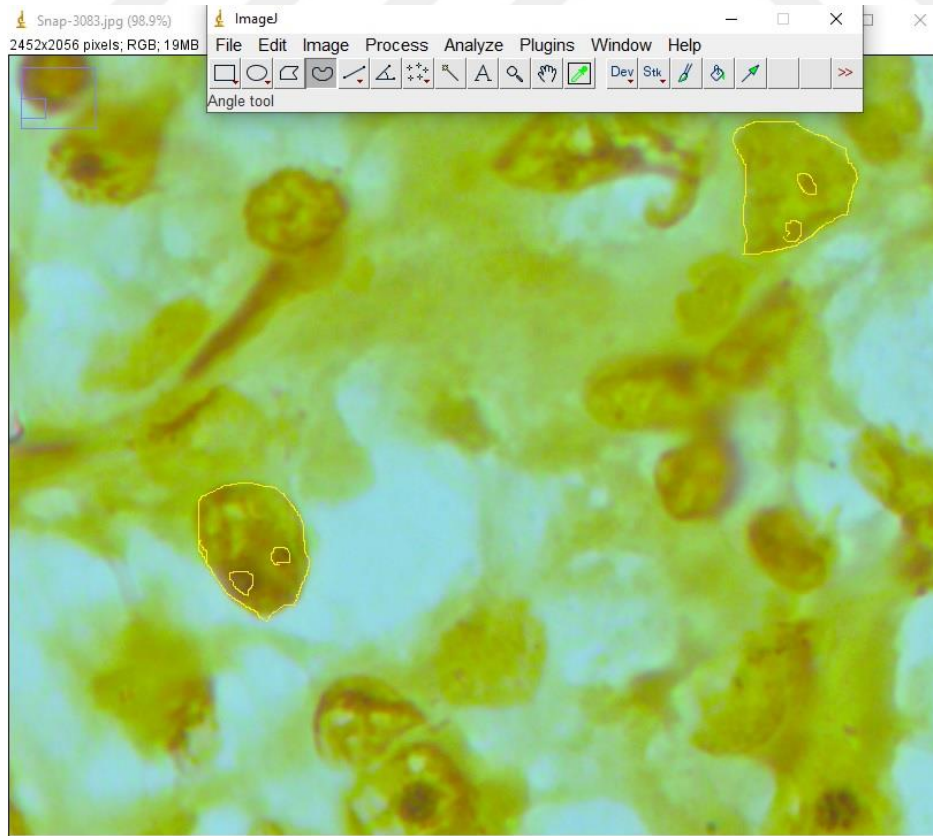
için ortalama AgNOR sayıları basitçe sayılıp, her bir böbrek kanseri hücresi için ayrı ayrı kaydedilmiştir.



Şekil 4. NOR bölgeleri belirenmiş berrak hücreli karsinom hücre çekirdeği.



Şekil 5. Çekirdek alanı belirlenmiş berrak hücreli karsinom hücre çekirdeği.



Şekil 6. Çekirdek ve NOR bölgelerin belirlenmesi.

3. 2. 5. 2. 2. Böbrek kanseri hücre çekirdek alanının belirlenmesi

Çekirdek alanının belirlenmesi için de NOR bölgesinin belirlenmesine benzer bir yol izlenerek yine “freehand toll” paneli kullanılmıştır. Özellikle sitoplazma gölgesi bulunduran bazı görüntülerde çekirdeğin ayırt edilmesi zor olması nedeniyle bu tür görüntülerde çekirdeğin sınırları dikkatli bir şekilde elle çizilip, programın belirlenen alanı çekirdek bölgesi olarak görmesi sağlanmıştır. (Şekil 7) çekirdek ve NOR bölgeleri belirlenmiş bir böbrek kanseri hücre çekirdeğini göstermektedir.

The image shows a screenshot of the ImageJ software interface. The 'Results' window is open, displaying a table with six rows of data. The table has five columns: 'Area', 'Mean', 'Min', and 'Max'. The data values are as follows: Row 1: Area 13545, Mean 113.289, Min 72, Max 176; Row 2: Area 1070, Mean 84.869, Min 72, Max 113; Row 3: Area 7921, Mean 110.035, Min 81, Max 182; Row 4: Area 681, Mean 92.015, Min 81, Max 113; Row 5: Area 7254, Mean 103.677, Min 74, Max 174; Row 6: Area 773, Mean 87.344, Min 74, Max 104. The 'ImageJ' window is also visible, showing the main menu (File, Edit, Image, Process, Analyze, Plugins, Window, Help) and a toolbar with various tools. A tooltip for the 'Multi-point' tool is visible, stating: '*Multi-point* or point (right click to switch; double click to configure)'. The 'Dev' and 'Stk' buttons in the toolbar are highlighted with red arrows.

Şekil 7. Çekirdek ve NOR bölgelerin hesaplanma sonucu.

3. 2. 5. 2. 3. Ölçütlerin hesaplanması

Çalışmamızda değerlendirme ölçütü olarak, total NOR yüzey alanının tüm çekirdeğin yüzey alanına oranı kullanılmıştır. Bu parametreyi hesaplayabilmek için kullandığımız bilgisayar programı sayesinde öncelikle NOR bölgesi olarak belirlenen bölgedeki nokta sayısı ve çekirdek bölgesi olarak belirlenen bölgedeki nokta sayısı (pixel) hesaplanarak, içerisine NOR bölgesinin de dahil olduğu çekirdek alanına göre NOR alanının yüzde oranı hesaplanmıştır (Şekil 8).

3. 3. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Günümüzde biyoistatistik analizler için Windows tabanlı programlardan Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi (SPSS) kullanılır. Gruplara göre interfazdaki NOR alan oranı ortalaması ve ortalama NOR sayıları tespit edildikten sonra bu değerlerin her biri için grupları birbiriyle istatistiksel olarak karşılaştırmak için SPSS 17,0 istatistik programı kullanılmıştır.

Bütün veriler bilgisayar ortamında SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA) istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Araştırmanın tüm verileri için öncelikle tanımlayıcı istatistikler uygulanmıştır. Ölçümle belirlenen değişkenler için

tanımlayıcı istatistikler; ortalama ve standart sapma şeklinde verilmiştir. Kullanılan verilerin öncelikle normal dağılıma uygunluk testleri (Shapiro-Wilk testi) yapılmıştır. Yapılan testler sonucu verilerin normal dağılım göstermediği ($p < 0,05$) saptanmıştır. Veriler normal dağılım göstermediğinden dolayı istatistiksel analizde non-parametrik testler yapılmasının uygun olacağı belirlenmiştir. Bunun için ikili kıyaslamalarda Mann-Whitney U Testi, ikiden fazla kıyaslamalarda Kruskal–Wallis Testi kullanılmıştır. Elde edilen 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi (p değeri) 0,05 olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Gruplar arasında cinsiyet bakımından kıyaslama yapıldığında; Kontrol grubunda 6 erkek (%75), 2 kız (%25), Berrak hücreli karsinomda 6 erkek (%75), 2 kız (%25), Papiller Renal hücreli karsinomda 8 erkek (%100), 0 kız (%0) vardı. Gruplar arasında cinsiyet açısından istatistiksel analiz sonuçlarına göre anlamlı bir farklılık yoktu. ($\chi^2=2,000$; $p=0,368$).

Gruplar arasında yaş ortalaması kıyaslandığında; Kontrol grubunun yaş ortalaması $57,500 \pm 11,199$ (minimum: 41, maksimum: 75), Berrak hücreli karsinomda yaş ortalaması $57,875 \pm 11,898$ (minimum: 41, maksimum: 78), Papiller Renal hücreli karsinomda yaş ortalaması $56,375 \pm 9,288$ (minimum: 44, maksimum: 73) idi. Gruplar arasında yaş açısından istatistiksel analiz sonuçlarına göre anlamlı bir farklılık yoktu ($\chi^2=0,062$; $p=0,970$).

Kontrol grubunun ortalama TAA/ÇA ve ortalama AgNOR sayısı hesaplandığında; Kontrol 1'in ortalama TAA/ÇA değeri ($0,937 \pm 0,374$) ve ortalama AgNOR sayısı değeri ($1,327 \pm 0,513$), Kontrol 2'nin ortalama TAA/ÇA değeri ($0,883 \pm 0,221$) ve ortalama AgNOR sayısı değeri ($1,280 \pm 0,454$), Kontrol 3'ün ortalama TAA/ÇA değeri ($0,776 \pm 0,161$) ve ortalama AgNOR sayısı değeri ($1,080 \pm 0,274$), Kontrol 4'ün ortalama TAA/ÇA değeri ($0,824 \pm 0,104$) ve ortalama AgNOR sayısı değeri ($1,100 \pm 0,303$), Kontrol 5'in ortalama TAA/ÇA değeri ($0,828 \pm 0,129$) ve ortalama AgNOR sayısı değeri ($1,120 \pm 0,328$), Kontrol 6'nın ortalama TAA/ÇA değeri ($0,772 \pm 0,095$) ve ortalama AgNOR sayısı değeri ($1,140 \pm 0,351$), Kontrol 7'nin ortalama TAA/ÇA değeri ($0,783 \pm 0,122$) ve ortalama AgNOR sayısı değeri ($1,100 \pm 0,303$), Kontrol 8'in ortalama TAA/ÇA değeri ($0,867 \pm 0,103$) ve ortalama AgNOR sayısı değeri ($1,120 \pm 0,328$) olarak bulundu. Kontrol grubunun ortalama TAA/ÇA değeri ($0,834 \pm 0,192$) ve ortalama AgNOR sayısı değeri ($1,158 \pm 0,372$) olarak tespit edilmiştir (Tablo 3, Şekil 9 ve 10).

Tablo 3. Kontrol grubunun ortalama TAA/ÇA oranı ve ortalama AgNOR sayısı değeri

Hastalar	TAA/ÇA oranı	Kontrol Gurubunun Ortalama TAA/ÇA oranı	Ortalama AgNOR Sayısı	Kontrol Gurubunun Ortalama AgNOR Sayısı
Kontrol 1	0,937 ± 0,374		1,327 ± 0,513	
Kontrol 2	0,883 ± 0,221		1,280 ± 0,454	
Kontrol 3	0,776 ± 0,161		1,080 ± 0,274	
Kontrol 4	0,824 ± 0,104		1,100 ± 0,303	
Kontrol 5	0,828 ± 0,129	0,834±0,192	1,120 ± 0,328	1,158±0,372
Kontrol 6	0,772 ± 0,095		1,140 ± 0,351	
Kontrol 7	0,783 ± 0,122		1,100 ± 0,303	
Kontrol 8	0,867 ± 0,103		1,120 ± 0,328	

TAA/ÇA: Total AgNOR Alanı/Çekirdek Alanı

Berrak Hücreli Renal Karsinom (BHRK) grubunun ortalama TAA/ÇA değeri ve ortalama AgNOR sayısı hesaplandığında; BHRK 1'in ortalama TAA/ÇA değeri (1,093 ± 0,364) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,400 ± 0,535), BHRK 2'nin ortalama TAA/ÇA (1,143 ± 0,442) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,520 ± 0,580), BHRK 3'ün ortalama TAA/ÇA (1,111 ± 0,402) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,380 ± 0,568), BHRK 4'ün ortalama TAA/ÇA (1,15± 0,346) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,600 ± 0,535), BHRK 5'in ortalama TAA/ÇA ve (1,103 ± 0,370) ortalama AgNOR sayısı değeri (1,360 ± 0,485), BHRK 6'nın ortalama TAA/ÇA (1,271 ± 0,339) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,700 ± 0,505), BHRK 7'nin ortalama TAA/ÇA (1,220 ± 0,462) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,600 ± 0,639), BHRK 8'in ortalama TAA/ÇA (1,055 ± 0,399) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,400 ± 0,495) olarak bulundu. BHRK grubunun ortalama TAA/ÇA (1,143 ± 0,395) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,495 ± 0,553) olarak tespit edilmiştir (Tablo 4, Şekil 9 ve 10).

Tablo 0. Berrak hücreli karsinom (BHRK) grubunun ortalama TAA/ÇA oranı ve ortalama AgNOR sayısı değeri

Hastalar	TAA/ÇA oranı	BHRK Gurubunun Ortalama TAA/ÇA oranı	Ortalama AgNOR Sayısı	BHRK Gurubunun Ortalama AgNOR Sayısı
BHRK 1	1,093 ± 0,364		1,400 ± 0,535	
BHRK 2	1,143 ± 0,442		1,520 ± 0,580	
BHRK 3	1,111 ± 0,402		1,380 ± 0,568	
BHRK 4	1,152 ± 0,346		1,600 ± 0,535	
BHRK 5	1,103 ± 0,370	1,143±0,395	1,360 ± 0,485	1,495±0,553
BHRK 6	1,271 ± 0,339		1,700 ± 0,505	
BHRK 7	1,220 ± 0,462		1,600 ± 0,639	
BHRK 8	1,055 ± 0,399		1,400 ± 0,495	

TAA/ÇA: Total AgNOR Alanı/Çekirdek Alanı **BHRK:** Berrak hücreli karsinom

Papiller Renal hücreli karsinom (PRHK) grubunun ortalama TAA/ÇA değeri ve ortalama AgNOR sayısı hesaplandığında; PRHK 1'in ortalama TAA/ÇA (1,045 ± 0,438) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,260 ± 0,487), PRHK 2'nin ortalama TAA/ÇA (0,843 ± 0,334) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,120 ± 0,386), PRHK 3'ün ortalama TAA/ÇA (0,938 ± 0,374) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,200 ± 0,452), PRHK 4'ün ortalama TAA/ÇA (1,126 ± 0,456) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,340 ± 0,519), PRHK 5'in ortalama TAA/ÇA (1,155 ± 0,389) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,360 ± 0,485), PRHK 6'nın ortalama TAA/ÇA (1,196 ± 0,470) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,520 ± 0,580), PRHK 7'nin ortalama TAA/ÇA (1,175 ± 0,431) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,400 ± 0,535), PRHK 8'in ortalama TAA/ÇA (0,854 ± 0,251) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,100 ± 0,303) olarak bulundu. PRHK grubunun ortalama TAA/ÇA (1,041 ± 0,418) ve ortalama AgNOR sayısı değeri (1,288 ± 0,490) olarak tespit edilmiştir (Tablo 5, Şekil 9 ve 10).

Tablo 5. Papiller renal hücreli karsinom (PRHK) gurubunun ortalama TAA/ÇA oranı ve ortalama AgNOR sayısı değeri

Hastalar	TAA/ÇA oranı	PRHKGurubunun Ortalama TAA/ÇA oranı	Ortalama AgNOR Sayısı	PRHK Gurubunun Ortalama AgNOR Sayısı
PRHK1	1,045 ± 0,438		1,260 ± 0,487	
PRHK 2	0,843 ± 0,334		1,120 ± 0,386	
PRHK 3	0,938 ± 0,374		1,200 ± 0,452	
PRHK 4	1,126 ± 0,456		1,340 ± 0,519	
PRHK 5	1,155 ± 0,389	1,041±0,418	1,360 ± 0,485	1,288±0,490
PRHK 6	1,196 ± 0,470		1,520 ± 0,580	
PRHK 7	1,175 ± 0,431		1,400 ± 0,535	
PRHK 8	0,854 ± 0,251		1,100 ± 0,303	

TAA/ÇA: Total AgNOR Alanı/Çekirdek Alanı **PRHK:** Papiller renal hücreli karsinom

Tüm gruplar (Kontrol, BHRK ve PRHK) kendi içerisinde kıyaslandığında, grupların TAA/ÇA değerleri arasında istatistiksel analizlere göre anlamlı bir farklılık vardı ($X^2=127,961$; $p=0,000$) (Tablo 6, Şekil 11). Yine tüm grupların ortalama AgNOR sayısı arasında istatistiksel analizlere göre anlamlı bir farklılık görülmüştür. ($X^2=96,283$; $p=0,000$) (Tablo 6, Şekil 12).

Tablo 6. Tüm grupların ortalama TAA/ÇA oranı ve ortalama AgNOR sayısı değerinin kıyaslanması

Guruplar	Gurupların Ortalama TAA/ÇA oranı	Ortalama AgNOR sayısı	X^2	p
Kontrol	0,834±0,192	1,158±0,372	96,283*	0,000*
BHRK	1,143±0,395	1,495±0,553	127,961 ^{&}	0,000 ^{&}
PRHK	1,041±0,418	1,288±0,490		

TAA/ÇA: Total AgNOR Alanı/Çekirdek Alanı * = AgNOR sayısı için & = TAA/ÇA değeri için

Tüm gruplar arasındaki hem TAA/ÇA, hem de ortalama AgNOR sayısı arasındaki bu farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek amacıyla grupların ikili kıyaslaması yapıldı. Buna göre, kontrol grubunun ortalama TAA/ÇA (0,834±0,192) ve ortalama AgNOR sayısı (1,158±0,372) değeri ile, BHRK grubunun TAA/ÇA (1,143±0,395) ve ortalama AgNOR sayısı (1,495±0,553) değeri arasında istatistiksel analizler sonucu anlamlı bir farklılık tespit edildi (sırasıyla $Z=-11,627$ ve $p=0,000$; $Z=-9,603$ ve $p=0,000$). Yine kontrol grubunun ortalama TAA/ÇA (0,834±0,192) ve ortalama AgNOR sayısı (1,158±0,372) değeri ile PRHK grubunun ortalama TAA/ÇA (1,041±0,418) ve ortalama AgNOR sayısı (1,288±0,490) değeri arasında da istatistiksel analizler sonucu anlamlı bir farklılık tespit edildi. (sırasıyla $Z=-6,390$ ve $p=0,000$; $Z=-4,038$ ve $p=0,000$). En son olarak BHRK grubunun TAA/ÇA (1,143±0,395) ve ortalama AgNOR sayısı (1,495±0,553) değeri ile PRHK grubunun ortalama TAA/ÇA (1,041±0,418) ve ortalama AgNOR sayısı (1,288±0,490) değeri arasında da istatistiksel analizler sonucu anlamlı bir farklılık tespit edildi (sırasıyla $Z=-4,039$ ve $p=0,000$; $Z=-5,728$ ve $p=0,000$) (Tablo 7).

Tablo 7. Grupların ortalama TAA/ÇA oranı ve ortalama AgNOR sayısı açısından ikili kıyaslanması

Guruplar	TAA/ÇA için		Ortalama AgNOR sayısı için	
	P	Z	P	Z
Kontrol – BHRK	0.000	-11,627	0.000	-9,603
Kontrol – PRHK	0.000	-6,390	0.000	-4,038
BHRK – PRHK	0.000	-4,039	0.000	-5,728

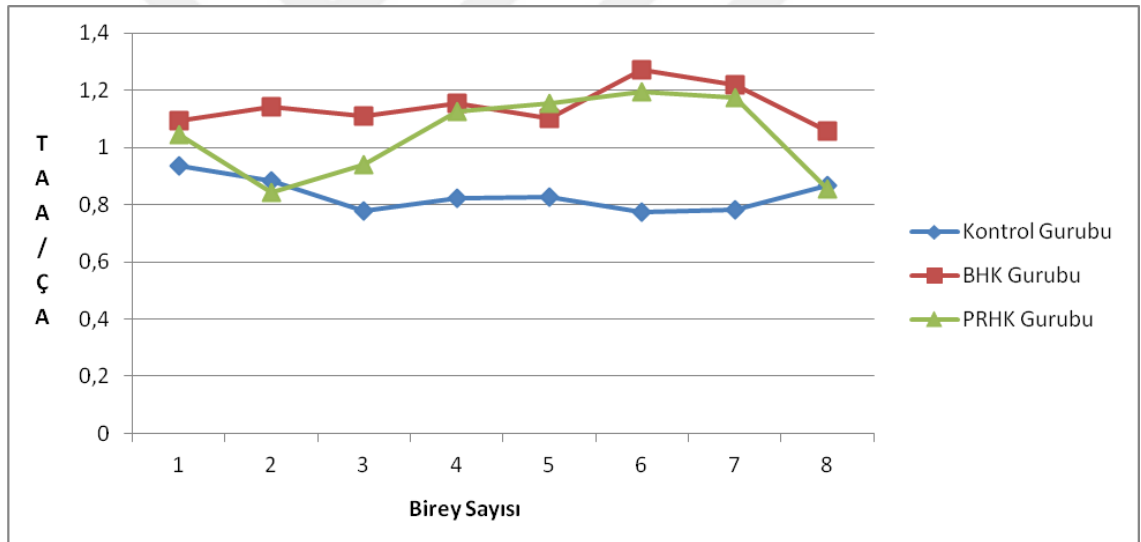
TAA/ÇA: Total AgNOR area/Nuclear area

BHRK: Berrak hücreli karsinom

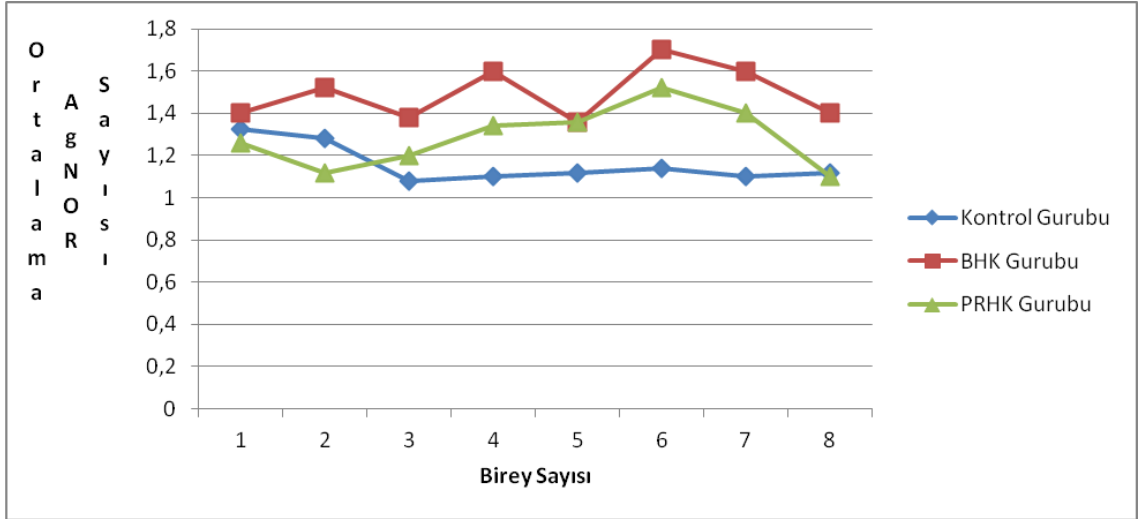
PRHK: Papiller renal hücreli karsinom

Gruplar arasında Fuhrmann derecesi açısından kıyaslama yapıldığında; Berrak hücreli karsinomda; 7 kişi (%87,5) Fuhrmann derecesi bakımından 2 , 1 kişi (%12,5) Fuhrmann derecesi bakımından 4 iken, Fuhrmann derecesi 1 ve 3 olan hiç hasta yoktu. Papiller Renal hücreli karsinomda; 1 hasta (%12,5) Furmann derecesi bakımından 1, 4 hasta (%57,1) Fuhrmann derecesi bakımından 2, 3 hasta (%37,5) Fuhrmann derecesi bakımından 3 iken, Fuhrmann derecesi bakımından 4 olan hiç bir hasta yoktu. Berrak hücreli karsinom ve papiller Renal hücreli karsinom grupları arasında Fuhrmann derecesi açısından istatistiksel analizlere göre anlamlı bir farklılık yoktu ($\chi^2=5,818$, $p=0,121$).

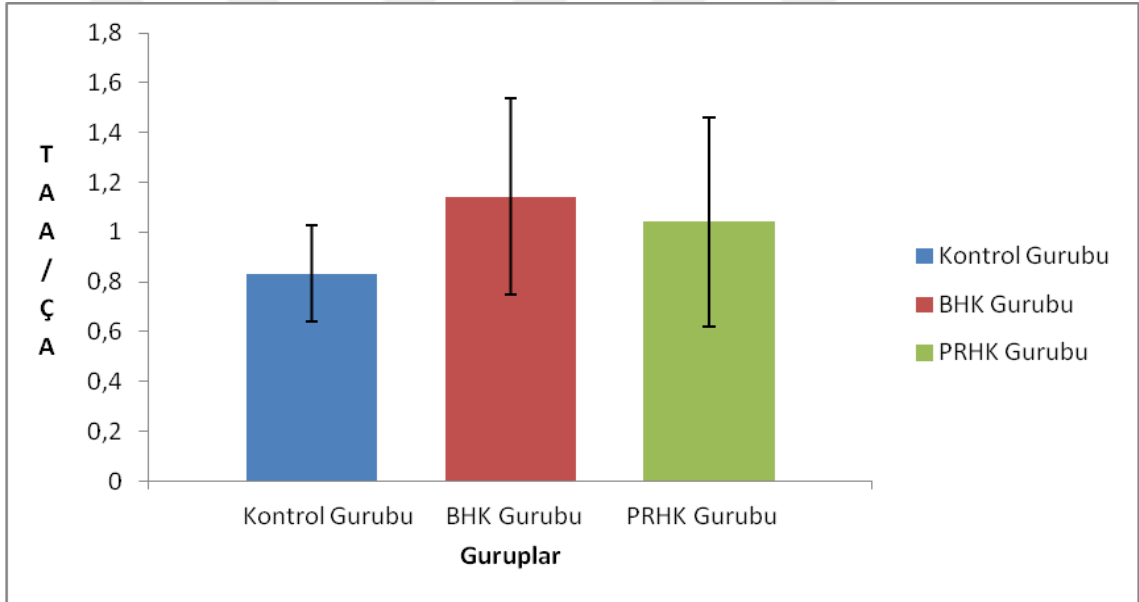
Berrak hücreli karsinomlu hastalarda tümör çapı ortalama $304,200 \pm 548,701$ (min 38,400 max 1657,700), Papiller Renal Hücreli hastalarda tümör çapı ortalama $141,255 \pm 170,127$ (min; 13,5 max 448) idi. Gruplar arasında tümör çapı açısından anlamlı bir farklılık yoktu ($Z=-1,042$, $p=0,298$).



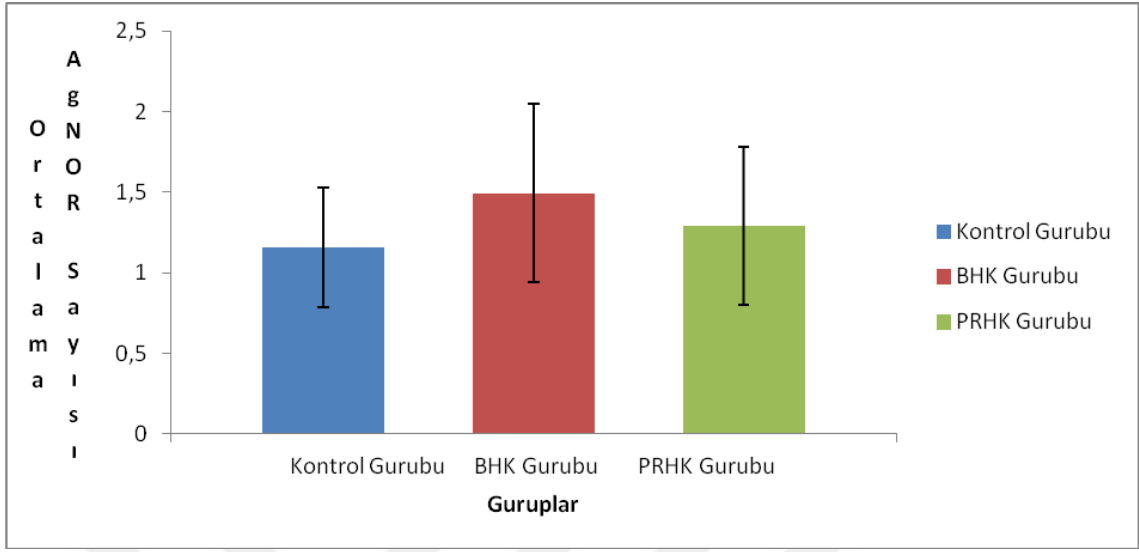
Şekil 9. Her bir gruptaki bireylerin ortalama TAA/ÇA oranı değerleri



Şekil 10. Her bir gruptaki bireylerin ortalama AgNOR sayısı değerleri



Şekil 11. Grupların ortalama TAA/ÇA değerleri arasındaki kıyaslamayı gösteren grafik



Şekil 12. Grupların ortalama AgNOR değerleri arasındaki kıyaslamayı gösteren grafik

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser günümüzde görülen önemli sağlık meselelerinden biri olup, devamlı görülmesiyle birlikte mortalitesinin yüksek olması gereğiyle de bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir¹.

Böbrek kanseri, ürolojik maligniteler arasında 3. sıradayken sık görülen kanser çeşitleri arasında 17. sırada yerini almaktadır¹³². Her sene yaklaşık 270,000 kişi böbrek kanserine yakalanmakta ve her sene 115,000'e yakın birey böbrek kanseri nedeniyle ölmektedir¹². Böbrek kanseri hastalarında cerrahi müdahale neticesinde sıklıkla iyi sonuç alınmış olsa da hastalığı ileri evrede olan kişilerin %20'e yakını 2 yıllık sağ kalıma sahiptir¹³³.

AgNOR parametresinin tümör patolojisinde ki ilk uygulaması Ploton ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Yapılmış olan bu öncü çalışmadan sonra, interfaz AgNOR proteinlerinin çeşitli yayılımının esas alınarak, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırt eden çok sayıda ilave çalışma yapılmıştır¹²¹. Daha önce yapılan bir çalışmada tiroid papiller karsinom ve normal tiroid hücre çekirdeklerindeki ortalama AgNOR sayısı değerlendirilmiş ve kanser gurubunda ortalama AgNOR sayısının normal tiroid hücrelerindeki anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Buna ilave olarak malin ve benig lezyonları ayırmak amacıyla AgNOR sayısı ve TAA / ÇA oranları için cutoff değerleri tanımlanarak kullanılan bu metodun maling ve bening tiroid lezyonlarındaki hücrelerin proliferasyon aktivitesini değerlendirmek için güvenilir bir metod olduğu ve rutin olarak sitopatolojiye katkı sağlayabileceği tespit edilmiştir^{9,10}. Yapılan başka bir çalışmada mesane tümörü şüphesi taşıyan hasta bireyler ile sağlıklı bireylerin idrarlarından elde edilen mesane hücrelerinde ki ortalama AgNOR sayısı ve TAA/ÇA oranları arasındaki farka bakılmıştır. AgNOR sayısı, AgNOR kütlesi ve TAA/ÇA oranlarının malign ve bening lezyonlarda anlamlı derecede farklı olduğu ve bu değerlerin mesane tümörü tanısı almış bireylerde önemli bir derecede arttığı gözlenmektedir¹³⁴. Bu sebeple kanserli hücreleri hasta olmayan normal hücrelerden ayırmada interfaz AgNOR proteinlerine sıkça rastlanır.

Kullanmış olduğumuz yöntemde de toplam AgNOR alan / ÇA ölçümü ise, bir hücrenin çekirdeğinde ki boyanmış bölümlerin (AgNOR bölgelerinin alanlarının toplamının) çekirdeğin alanına oranlanması ile ölçülür ve hesabı bu esasa dayanır. Bundan dolayı hücrelerin topluluk şeklinde, belirli bir bölge içerisinde olması gerekmemektedir. Üstelik birden fazla preparat üzerinde yapılan değerlendirmelerin sonuç vermesi için 50 hücre yeterli olabilmektedir.

Tümör patolojisi değerlendirilirken AgNOR değişkenlerinin haricinde kullanılan bu tekniklerden bazıları PCNA ve Ki-67 ekspresyonlarının immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi olup¹³⁵⁻¹³⁸ bu yöntemlerin hem malign hem benign lezyonlarını kendi içlerinde ayırt etmede yakaladıkları başarı oranları farklılık gösterebilmektedirler^{135,139}.

Kanser hücrelerinde sadece genin ekspresyonu değil aynı zamanda genin ürünü ve hücrenin morfolojisi (çekirdeğin hacmi, çekirdekçik vb) de değişiklik göstermektedir. Bu nedenle hem çekirdek içerisindeki AgNOR alanının hem de çekirdek alanının hesaplanması hücrenin protein sentez kapasitesi hakkında daha iyi bilgi verir. Dolayısıyla TAA/ÇA oranının tespit edilmesi ile hücrelerin metabolik ve proliferatif aktiviteleri hakkında daha kesin bilgiler elde edilebilmektedir. Bizim kullanmış olduğumuz teknik aynı zamanda kolay ve ucuz bir tekniktir.

Daha önceden yapılmış olan bir çalışmada renal hücreli karsinom tanısı almış 54 olgu histopatolojik tiplere göre ve Fuhrman nükleer derecesine göre gruplara ayrılmış olup, Renal hücreli karsinom olgularından 27 tanesi berrak hücreli karsinomdur. Diğer renal hücreli karsinomlar ise granüler renal hücreli karsinom, kromofob hücreli renal hücreli karsinom içi hücreli renal hücreli karsinom ve kistik renal hücreli karsinom olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra böbreğin renal hücreli karsinom hücrelerinin çekirdeklerinde AgNOR noktalarının bulunduğu 100 hücre sayılarak ortalamaları alınmıştır. Tümör tiplerine göre farklılık gösteren AgNOR sayıları gruplar arasında istatistiksel olarak benzer şekilde bulunmuştur. Nükleer derecelerine göre incelendiğinde, ortalama AgNOR sayısının nükleer dereceyle birlikte paralel olarak arttığı tespit edilmiştir. AgNOR sayısı ile nükleer derece arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir¹⁴⁰. Yapılan başka bir çalışmada 45 Renal hücreli karsinom hücreleri incelenmiş olup, bu hücrelerin AgNOR sayısının normal proksimal tübüllerden anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında renal hücreli karsinomun alt tiplerinde AgNOR sayılarında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir¹⁴¹. Yapılan diğer bir çalışmada renal adenom, berrak hücreli karsinom ve ksantogranulomatöz piyelonefritin kesit alınmış örneklerine AgNOR tekniği uygulanmıştır. Adenomlarda ve karsinomlarda hücre başına düşen AgNOR sayısı arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Ksantogranulomatöz piyelonefritin ve berrak hücreli karsinom da hücre başına ortalama AgNOR sayısında önemli farklılık gözlenmiştir¹⁴². Renal hücreli karsinomlu 30 hastanın incelendiği başka bir çalışmada her vakaya AgNOR boyaması uygulanmıştır. AgNOR benekleri 200 tümör nükleusunda hesaplanıp nükleus

başına düşen AgNOR sayısı her vaka için incelenmiştir. Evrelerine ve fuhrmann derecelerinde göre bakıldığında yüksek evreli ve yüksek dereceli böbrek hücreli karsinom, düşük evre ve düşük derece tümörlerinden daha yüksek AgNOR sayısına sahip olduğu gösterilmiştir. İlaveten AgNOR sayılarının fuhrmann derecesi ve evresi ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir.¹⁴³. Fakat daha önce yapılan bu çalışmalarda sadece AgNOR sayısı değerlendirilmiştir. Ancak AgNOR sayısı malign karakterli hücrelerin tespiti için AgNOR alanı(TAA/ÇA) kadar yüksek etkiye sahip değildir. Çünkü AgNOR benekleri farklı büyüklüklerde olabilme ihtimalinin olmasıdır. Bunun nedeni de birden fazla AgNOR beneklerinin bir araya gelmesidir. Bu nedenle bu yöntemin güvenli olmadığı yönünde yapılan eleştiriler vardır¹⁴⁴. Sayım yapan bireye göre de benek sayısı farklılık göstermektedir. Bu nedenle AgNOR beneklerinin sayısının değerlendirilmesinin yanında alanlarının ölçülüp çekirdek alanıyla oranlanmasının yararı daha fazla olacaktır. Bizim yaptığımız çalışmada da 8 berrak hücreli karsinom 8 papiller renal hücreli karsinom alınarak kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Berrak renal hücreli karsinomda AgNOR sayısının papiller renal hücreli karsinomdan daha fazla olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda yaptığımız çalışmada AgNOR sayısının yanı sıra TAA/ÇA oranları da hesaplanarak berrak hücreli ve papiller hücreli karsinomu arasında anlamlı fark bulundu. Nükleer derecelendirmeye göre baktığımızda 2 grup arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

Meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada malign hasta grubunda TAA/ÇA değeri benign hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş olup, AgNOR benek sayısı bakımından bu iki grupta anlamlı fark gözlenmemiştir⁷. Bizim çalışmamızda ise hem AgNOR benek sayısı hem de TAA/ÇA bakımından malign grupta benign gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görüldü. Kontrol grubunun ortalama TAA/ÇA(0,834±0,192) ve ortalama AgNOR sayısı (1,158±0,372) değeri, PRHK grubunun ortalama TAA/ÇA (1,041±0,418) ve AgNOR sayısı (1,288±0,490) değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla Z=-6,390 ve p=0.000; Z=-4,038 ve p=0.000). Yine kontrol grubunun hem ortalama TAA/ÇA (0,834±0,192) hemde ortalama AgNOR sayısı (1,158±0,372) değeri, BHRK grubunun TAA/ÇA (1,143±0,395) ve ortalama AgNOR sayısı (1,495±0,553) değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla Z=-11,627 ve p=0.000; Z=-9,603ve p=0.000). Bunlara ilaveten BHRK grubunun TAA/ÇA (1,143±0,395) ve ortalama AgNOR sayısı (1,495±0,553) değeri, PRHK grubunun TAA/ÇA (1,041±0,418) ve ortalama AgNOR sayısı (1,288±0,490) değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla

$Z=-4,039$ ve $p=0.000$; $Z=-5,728$ ve $p=0.000$). Bu da bize malin ve benin lezyonlarının ayrımının güç olduğu durumlarda AgNOR yönteminin kullanılabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda çalışmada belirlenen TAA/ÇA oranı ile her bir hücrenin potansiyel olarak AgNOR protein sentez kapasitesi tespit edilmekte dolayısıyla her bir hücre için protein sentezinin gerçekleşme potansiyeli hakkında daha kesin bilgiler vermektedir.

Bununla birlikte çalışmamızda Fuhrman çekirdek derecelendirmesi açısından BHRK ve PRHK grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Fuhrmann derecesi AgNOR sayısı ile pozitif korelasyon göstermedi. Fakat berrak hücreli karsinomda fuhrmann derece 1 ve 3 olan ve papiller renal hücreli karsinomda fuhrmann derece 4 olan hiç hastamız yoktu. Eğer olsaydı daha farklı bir sonuç çıkabilceğini düşünmekteyiz.

İğne biyopsi yöntemi, kanser teşhisinde veya var olan bir hastalığın durumu hakkında bilgi edinmek gerektiğinde uygulanan bir yöntemdir. Bununla ilgili birçok çalışma yapılmıştır. En çok meme ve tiroid hastalarına uygulanmış olsada böbrek kanseri tanısı için de uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntem Berrak hücreli karsinom ve papiller Renal hücreli karsinom ayrımında %80 başarı sağlıyor olsa da bir grup hastada kesin tanı konulamamaktadır. Bizim yaptığımız bu yöntemle berrak hücreli karsinom ve papiller renal hücreli karsinomun ayrımının güç olduğu durumlarda rutin patolojiye katkı amaçlı kullanılarak, daha kolay ve düşük maliyetle ayrımın yapılmasına yardımcı olunulabileceğini düşünmekteyiz

Böbrek biyopsilerinde benin ve malin ayrımının histopatolojik yöntemlerle tam olarak yapılamadığı durumlarda zaman ve enerji kaybı, sağlık personelinin harcadığı süre, hastanın psikolojik durumu, hasta yakınların müzdaripliği ve tanının konulabilmesi için yapılacak ilave tüm tıbbi işlemlerin gerektireceği maliyet ile devlet bütçesindeki kayıplar gibi birçok sorun yaşanmaktadır. Bizim kullandığımız yöntemin ucuz, malin ve benin ayrımında yüksek duyarlılığa sahip olması ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle tüm bu olumsuzluklardan kaynaklı müzdaripliğin azaltılabileceğini düşünmekteyiz. Bu konu ile ilgili daha fazla bilgi edinebilmek için daha fazla hasta sayıları içeren benzer ilave çalışmaların yapılması öngörülmektedir.

İlerleyen zamanlarda şu anki kullandığımız yeni yaklaşım (TAA/ÇA), değişik kanser türlerinin prognozu ve kullanılan antitümör ajanlarının tedaviye olan etkinliği hakkında

bilgi edinilebilmesini sağlayabileceğini ve böylece tedavi stratejisinin değiştirilip değiştirilmeyeceği konusunda da hekime yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu doğrultuda basit, ucuz ve uygulanabilirliği kolay olan bu yöntemle gereksiz zaman, para kaybı önlenebileceği gibi, hastalıktan müzdarip olan bireylerin müzdaripliğinin giderilmesi ve uzayan tedavi süresi ve zamandan kaynaklı stres, hüznün vb. psikolojik rahatsızlıklarında önüne geçilmesi sağlanabilecektir.

Sonuç olarak böbrek kanseri şüphesi taşıyan bireylerin ameliyat olmadan önce kesin tanısının verilebilmesi veya lezyon hakkında bilgi edinilebilmesi için böbrek biyopsi örneklerine AgNOR boyama işlemi uygulanarak her bir hücrenin AgNOR sayısı ve TAA/ÇA değerleri hesaplanmasının histolojide ve sitopatolojide yardımcı bir metod olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Çevik Ö, Aydın U, Gürsoy M. Kanser tedavisinde lenfatik hedeflendirme. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. 2012; 32(1): 67-90.
2. <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/böbrek-kanseri.html>, Erişim tarihi: 10.03.2020
3. Kovacs G. Molecular differential pathology of renal cell tumors. Histopathology 1993;22(1):1-8.
4. Shiina H, Knuhel R, Hofstadter F. Evaluation of the argyrophilic nucleolar organizer region, nuclear DNA content and mean nuclear area in transitional cell carcinoma of bladder using a quantitative image analyzer. Eur Urol. 1996; 29: 99-105.
5. Goodman MT, Yoshizawa CN, Kolonel LN. Descriptive epidemiology of thyroid cancer in Hawaii. Cancer. 1988; 61: 1272-1276.
6. Howell WM. Selective staining of nucleolus organizer regions(NORs). In The Cell Nucleus. Eleventh volume. Edited by H Busvh, L Rothblum. New York: Academic Pres, 1982: p. 89-142.
7. Köksal M. Benin ve Malin Meme Tümörlerinde AgNOR Parametrelerinin Karşılaştırmalı Değerlendirmesi. 2016, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 92 sayfa, Kayseri (Prof.Dr. Nurhan Cücer).
8. Kuno T, Hirose Y, Yamada Y, Hata K, Hong S, Nami Q, Takeru A, Huilan O, Teruaki Z, Kobayashi H, Mori H. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by fermented brown rice and rice bran. Oncol Rep. 2006; 15(3): 533-538.
9. Eroz R, Cücer N, Karaca Z, Unluhizarci K, Ozturk F. “The Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizing Region Proteins in Fine-Needle Aspiration Samples of Thyroid” . Endocr Pathol. 2011; 74–78.
10. Eroz R, Unluhizarci K, Cücer N, Ozturk F. “The Value Of Argyrophilic Nucleolar Organising Region Protein Determinations in Non-Diagnostic Fine Needle Aspiration Samples (Due To Insufficient Cell Groups) Of Thyroid Nodules”. Analytical And Quantitative Cytology And Histology. 2013a; 226-232.
11. Eroz R, Cücer N, Unluhizarci K, Ozturk F. Detection and comparison of cut-off values for total AgNOR area/nuclear area and AgNOR number/nucleus in benign thyroid nodules and normal thyroid tissue. Cell Biol Int. 2013b; 37(3): 257-61

12. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and male Genital Organs. IARC Press: Lyon, 2004.
13. Kirkali Z, Tuzel E, Mungan MU. Recent advances in kidney cancer and metastatic disease. *BJU Int*, 88: 818824, 2001
14. Kirkali Z, Lekili M. Renal cell carcinoma. New prognostic factors? *Curr opin Urol*, 13: 433-438, 2003
15. Campbell SC, Lane BR. Malignant renal tumors in Campbell-Walsh urology. In: Wein AJ, Kavaussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011. P.1413-74
16. Papadopoulos I, Rudolph P, Weichert-Jacobsen K. Value of p53 Expression, Cellular Proliferation, and DNA Content as Prognostic Indicators in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 1997; 32: 110-117
17. Papadopoulos I, Weichert-Jacobsen K, Sprenger E, Wacker H.H. DNA Content and the Proliferation Marker Ki-67 as Prognostic Indicators in Renal Cell Carcinoma. *Urol Int* 1994; 53:181-185.
18. Ordonez NG, Rosai J. Urinary tract. Rosai J (editor). Ackerman's Surgical Pathology. Eighth Edition, St. Louis: Missouri: Mosby Year Book Inc, 1996: 1059-1184.
19. Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Eskelinen M, Syrjänen K. Prognostic Value of Ki-67 Expression in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 1997;31:350-355.
20. European Network of Cancer Registries. Eorocim version 4.0. European incidence database V2,3, 730 entity dictionary 2001 Lyon, 2001
21. Lindblad P. Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scand J Surg* 2004; 93: 88-96
22. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-1403
23. Patard JJ, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, et al. Prognostic significance of the mode of detection in renal tumours. *BJU Int* 2002; 90: 358-363
24. Kato M, Suzuki T, Suzuki Y, et al. Natural history of small renal cell carcinoma: evaluation of growth rate, histological grade, cell proliferation and apoptosis. *J. Urol* 2004;172:863-866.
25. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB. Renal cell carcinoma. prognostic significance of incidentally detected tumors. *J. Urol* 2000;163:426-430

26. Chow WH, Linehan WM, Devasa SS. Re. Rising incidence of small renal masses: A need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:569-570
27. American Cancer Society Cancer Facts& Figures 2014. Atlanta, Ga. American Cancer Society; 2014
28. <https://gco.iarc.fr/> Internationals Agency for Research on Cnacer Globacan. Erişim tarihi: 20.05.2020
29. Ferlay J, Shin HR, Bray F. GLOBACAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and mortlity Worldwide: IARC CancerBase No.10 (Internet). 2008(cited 2011 28/8/2011).
30. Aron M, Nguyen MM, Stein RJ, et al. Impact of gender in renal cell carsinoma: An analysis of SEER database. *Eur Urol* 2008; 54:133-140.
31. Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carsinoma. *J. Urol* 2006; 176:2353-2358
32. Clauge J, Lin J, Cassidy A. Family history and risk of renal cell carsinoma .results from a case-control sturdy and systematic metaanalysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:801-807.
33. Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nature Rev Urol* 2010; 7(5):277-85
34. Murai M, Oya M. Renal cell carcinoma: etiology, incidence and Epidemiology. *Current Opinion in Urology* 2004; 14(4):229-33.)
35. Pesch B, Haerting J, Ranft U, Klimpel A, Oeischlagel B, Schill W, MURC study group. Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a casecontrol study in Germany, *International Journal of Epidemiology* 2000; 29(6):1014-
36. Yörükoğlu K. Classification, Cytogenetic and pathologic pprognostic factors. *Türk Üroloji Dergisi*. 31(3):305-317, 2005
37. Stewart JH, Bucciante G, Agodoa L, Gellert R, McCredie MR, Lowenfels AB, Disney AP, Wolfe RA, Boyle P, Maisonneuve P. Cancer of the kidney and urinary tract in patients on dialysis of data from the United States, Europe, and Australia and New Zealand. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(1):197-207.
38. Neuziller Y, Lay F, Luccioni A, Daniel L, Berland Y, Coulange C, Lechevallier E. De novo renal cell carcinoma of native kidney in renal transplant recipients. *Cancer* 2005; 103(2):251-7.

39. Tokg n O, Ak a H. B brek kanserlerinde g zlenen genetik deęiřimler.  roonkoloji b lteni 2013;12(3);161
40. White NM, Bui A, Mejia-Guerrero S, et al. Dysregulation of kallikrein-related peptidases in renal cell carcinoma. Potential targets of miRNAs. *Biological Chemistry* 2010;391(4);411-23.
41. G l  . B brek h creli karsinomlarda risk fakt rleri ve etiyolojisi.  roonkoloji b lteni 2014,13:135-138.
42. Burke HB, Henson DE. Criteria for prognostic factors and for an enhanced prognostic system. *Cancer*,72:3131-3135,1993.
43. NIH Consensus conference: Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA*,265:391-395,1991.
44. Grignon DJ, Hammond EH: Collage of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic marker sin solid tumors. *Arch Pathol Lab Med*,119:1122-1126,1995.
45. Srigley JR, Hutter RV, Gelb AB, Henson DE, Kenney G, King BF, Raziuddin S, Pisansky TM: Current prognostic factors-renal cell carcinoma Workgroup No 4. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*,80:994-996,1997.
46. Sobin LH, Wittekind CH. TNM classification of malignant tumors, 6th Ed. UICC International union Against Cancer. New York: Wiley-Liss, 1993, 2002
47. McNichols DW, Segura JW, DeWeerd JH. Renal cell carcinoma. Long-term survival and late recurrence. *J Urol*,126:17-23,1981.
48. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin RA, deKernion JB, Belldegrun A: Prognostic indicators for renal cell carcinoma: A multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria *J Urol* 163:1090-1095, 2000.
49. Hafez KS, Fergany AF, Novick AC. Nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma. Impact of tumor size on patient survival, tumor recurrence and TNM staging *J Urol*,162:1930-1933,1990.
50. Patard JJ, Shvarts O, Lam JS, Pantuck AJ, Kim HL, Ficarra V, Cindolo L, Han KR, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Lobel B, Chopin DK, Figlin RA, Mulders PF, Belldegrun AS. Safety and efficacy of partial nephrectomy for all T1 tumors based on an international multicenter experience *J Urol*,171:2181-2185, 2004.

51. Han KR, Bui MH, Pantuck AJ, Freitas DG, Leibovich BC, Dorey FJ, Zisman A, Janzen NK, Mukoyama H, Figlin RA, Belldegrun AS. TNM T3a renal cell carcinoma: Adrenal gland involvement is not the same as renal fat invasion. *J. Urol*, 169:899-903, 2003.
52. Bonsib SM: The renal sinus is the principal invasive pathway. A prospective study of 100 renal cell carcinomas. *Am J Pathol*, 28:1594-1600, 2004
53. Fuhrmann SA, Lasky LC, Limas CL. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 6:655-663, 1982.
54. Storkel S, Thoenes W, Jacobi GH, Lippold R. Prognostic parameters in renal cell carcinoma: A new approach. *Eur Urol*, 16: 416-422, 1989.
55. Medeiros LJ, Gelb AB, Weiss LM. Renal cell carcinoma. Prognostic significance of morphologic parameters in 121 cases. *Cancer*, 61: 1639-1651, 1988.
56. Gelb AB, Shibuya RB, Weiss LM, Medeiros LJ. Stage I renal cell carcinoma. A clinicopathologic study of 82 cases. *Am J Surg Pathol*, 17: 275-286, 1993.
57. Grignon DJ, Ayala AG, el-Naggar A, Wishnow KI, Ro JY, Swanson DA, McLemore D, Giacco GG, Guinee VF. Renal cell carcinoma. A clinicopathologic and DNA flow cytometric analysis of 103 cases. *Cancer*, 64: 2132-2140, 1989.
58. Green LK, Ayala AG, Ro JY, Swanson DA, Grignon DJ, Giacco GG, Guinee VF. Role of nuclear grading in stage I renal cell carcinoma. *Urology*, 34: 310-315, 1989.
59. Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de-Peralta Venturina M, Deshpande A, Menon M. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: An experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol* 26: 281-291, 2002.
60. Klein MJ, Valensi QJ. Proximal tubular adenomas of kidney with so-called oncocytic features. A clinicopathologic study of 13 cases of a rarely reported neoplasm. *Cancer*, 38: 906-914, 1976.
61. Mancilla-Jimenez R, Stanley RJ, Blath RA. Papillary renal cell carcinoma: A clinical, radiologic and pathologic study of 34 cases. *Cancer*, 38: 2469-2480, 1976.
62. Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ. Human chromophobe cell renal carcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 48: 207-217, 1985.
63. Fleming S, Lewi HJ. Collecting duct carcinoma of the kidney. *Histopathology* 10: 1131-1141, 1986. 8

64. Thoenes W, Störkel St, Rumpelt HJ. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). *Path Res Pract*, 181: 125-143, 1986.
65. Jones EC, Pins M, Dickersin GR, Young RH. Metanephric adenoma of the kidney. A clinicopathological, immunohistochemical, flow cytometric, cytogenetic, and electron microscopic study of seven cases. *Am J Surg Pathol* 19:615-626, 1995.
66. Reuter VE. Renal tumors exhibiting granular cytoplasm. *Semin Diagn Pathol*, 16: 135-145, 1999. 35
67. Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A, Kung HF. Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 3: 249-255, 1991.
68. Delahunt B, Eble JN, McCredie MR, Bethwaite PB, Stewart JH, Bilous AM. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: Comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol* 32: 590-595, 2001.
69. Leroy X, Zini L, Leteurtre E, Zerimech F, Porchet N, Aubert JP, Gosselin B, Copin MC. Morphologic subtyping of papillary renal cell carcinoma: correlation with prognosis and differential expression of MUC1 between the two subtypes. *Mod Pathol*, 15: 1126-1130, 2002.
70. Amin MB, Corles CL, Renshaw AA, Tickoo SK, Kube J, Schultz DS. Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: Histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases. *Am J Surg Pathol* 21: 621-635, 1997.
71. Linehan WM, Pinto PA, Bratslavsky G. Hereditary kidney cancer: unique opportunity for disease-based therapy. *Cancer*. 2009 May 15; 115 (10 Suppl): 2252-61.
72. Rosner I, Bratslavsky G, Pinto PA, et al. The clinical implications of the genetics of renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2009 Mar-Apr; 27(2): 131-6.
73. Uchida K, Miyao N, Masumori N, et al. Recurrence of renal cell carcinoma more than 5 years after nephrectomy. *Int J Urol* 2002; 9: 19-23.
74. Linehan WM, Yang JC, Rini B. Cancer of the kidney. In: De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008:1331-1358.
75. Klatte T, Pantuck AJ. Molecular biology of renal cortical tumors. *Urol Clin North Am*. 2008 Nov; 35(4): 573-80.

76. Linehan WM, Pinto PA, Srinivasan R, et al. Identification of the genes for kidney cancer: opportunity for disease-specific targeted therapeutics. *Clin Cancer Res.* 2007 Jan 15; 13(2 Pt 2): 671-679
77. Starker LF, Carling T. Molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Curr Opin Oncol.* 2009 Jan; 21(1): 29-33.
78. Coleman JA. Familial and hereditary renal cancer syndromes. *Urol Clin North Am.* 2008 Nov; 35(4): 563-72.
79. Coleman JA, Russo P. Hereditary and familial kidney cancer. *Curr Opin Urol.* 2009 Sep; 19(5): 478-85.
80. Schneider R, Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev.* 2007; 21:3027–43.
81. Dernburg AF, Misteli T. Nuclear architecture-an island no more. *Dev Cell.* 2007; 12:329–34.
82. Gorski S, Misteli T. Systems biology in the cell nucleus. *J Cell Sci.* 2005; 118:4083–4092. ; Misteli T. Concepts in nuclear architecture. *Bioessays.* 2005; 27:477–487.
83. Yamashita T, Higashi M, Momose S, Morozumi M, Tamaru JI. Nuclear expression of Y box binding-1 is important for resistance to chemotherapy including gemcitabine in TP53-mutated bladder cancer. *Int J Oncol.* 2017;51(2):579-586.
84. Feng S, Xing C, Shen T, Qiao Y, Wang R, Chen J, Liao J, Lu Z, Yang X, Abd-Allah SM, Li J, Jing N, Tang K. Abnormal Paraventricular Nucleus of Hypothalamus and Growth Retardation Associated with Loss of Nuclear Receptor Gene COUP-TFII. *Sci Rep.* 2017;7(1):5282.
85. Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:677–87.
86. Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer.* 2003; 3:179–192.
87. Zaidi SK, Young DW, Javed A, Montecino M, Van Wijnen A, Stein GS. Nuclear microenvironments in biological control and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:454–463.
88. Gilbert DM, Zink D. Intranuclear changes in cancer cells. *Genome Biol.* 2007; 8:312.

89. Xiong X, Dai L, Liang W, Zhang J, Qin S, Cao W, Ye D, Liang P, Liu Z. Protective effect of p53 on the viability of intervertebral disc nucleus pulposus cells under low glucose condition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;pii: S0006-291X(17)31397-9.
90. Derenzini M, Pasquinelli G, O'Donohue MF, Ploton D, Thiry M. Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem*. 2006; 54:131– 145
91. Thiry M, Cheutin T, O'Donohue MF, Kaplan H, Ploton D. Dynamics and threedimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *RNA*. 2000; 6:1750– 1761.
92. McClintock B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1934; 21:294–328.
93. Caspersson TO. Cell growth and cell function. W.W. Norton and Co, New York, 1950; pp 85. ; Perry RP. The cellular sites of ribosomal and 4S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962; 48:2179–2186.
94. Ritossa F, Spiegelman S. Localization of DNA complementary to rRNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1965; 53:737–745.
95. Hernandez-Verdun D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear unctions. *Histochem Cell Biol*. 2006; 126:135–148.
96. Derenzini M. The AgNORs. *Micron*. 2000; 31: 117-120.
97. Hsu TC, Spirito SE, Pardue ML. Distribution of 18128S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*. 1975; 53: 25–36.
98. Worton RG, Sutherland J, Sylvester JE, Willard HF, Bodrug S, Dube I, Duff C, Kean V, Ray PN, Schmickel RD. Human ribosomal RNA genes: orientation of the tandem array and conservation of the 59 end. *Science*. 1988; 239:64–68.
99. Gonzalez IL, Sylvester JE. Complete sequence of the 43-kb human ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics*. 1995; 27:320–328.
100. Kawasaki K, Minoshima S, Kudoh J, Fukuyama R, Shimizu N. Methylation status of ribosomal RNA gene clusters in the flow-sorted human acrocentric chromosomes. *Mammal Genome*. 1992; 3:173–178.

101. Scheer U, Rose KM. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81:1431–1435.
102. Roussel P, Hernandez–Verdun D. Identification of AgNOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res*. 1994; 214:465–472.
103. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*. 1975; 53:37–50.
104. Ploton D, Ménager M, Adnet JJ. Ultrastructural localization of NOR in nuclei of human breast cancer tissues using a one-step AgNOR staining method. *Biol Cell*. 1982; 43:229–232.
105. Trere, D. AgNOR staining and quantification. *Micron*. 2000; 31: 127–131.
106. Hernandez-Verdun D, Louvet, E. Le nucleole: fonctions et maladies associées. *Med. Sci. (Paris)*. 2004; 20: 37–44.
107. Brugal G. Interpretation of proliferation markers. *Virchows Arch*. 1995; 427:337–339.
108. Hozak P, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Procedures for specific detection of silver stained nucleolar proteins on Western blots. *J Histochem Cytochem*. 1992; 40: 1089–1096.
109. Sirri V, Roussel P, Trere D, Derenzini M, Hernandez-Verdun D. Amount variability of total and individual Ag-NOR proteins in cells stimulated to proliferate. *J Histochem Cytochem*. 1995; 43: 887–893.
110. Ginisty H, Amalric F, Bouvet P. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J*. 1998; 17: 1476-1 486.
111. Scheer U and Hock R. Structure and function of the nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology* 1999; 11: 365-390.
112. Derenzini M, Sirri V, Trere D, Ochs RL. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab Invest*. 1995; 73: 1– 6.
113. Bouche G, Gas N, Prats H, Baldin V, Tauber J-P, Teissie J, Amalric F. Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0–G1 transition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:6770–6774.

114. Sirri V, Roussel P, Gendron MC, Hernandez-Verdun D. Amount of the Two Major Ag- NOR Proteins, Nucleolin, and Protein B23 Is Cell-Cycle Dependent. *Cytometry*. 1997; 28:147–156
115. Tasdemir S, Eroz R, Dogan H, Erdem HB, Sahin I, Kara M, Engin RI, Turkez H. Association Between Human Hair Loss and the Expression Levels of Nucleolin, Nucleophosmin, and UBTF Genes. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2016;20(4):197-202.
116. Szebeni A, Olson MOJ. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Prot Sci*. 1999; 8:905-912
117. Dergunova NN, Bulycheva TI, Artemenko EG, Shpakova AP, Pegova AN. A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. *Immunol Lett*. 2002; 83:67-72.
118. Isaac C, Yang Y, Meter T. Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J Cell Biol*. 1998; 142:319-329.
119. Shaw PJ, Beven AF, Leader DJ, Brown JWS. Localization and processing from a polycistronic precursor of novel snoRNAs in maize. *J Cell Sci*. 1998; 111:2121-2128.
120. Sleeman J, Lyon CE, Platani M, Kreivi J-P, Lamond AI. Dynamic interactions between splicing snRNPs, coiled bodies and nucleoli revealed using snRNP protein fusions to the green fluorescent protein. *Exp Cell Res*. 1998; 243:290-304.
121. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J*. 1986; 18:5-14.
122. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions. *Molecular Biology in Histopathology*. Edited by Crocker J. John Wiley and Sons Ltd, 1994: p. 231-249
123. Ogura S, Abe S, Sukoh N, Nakajima I, Kawakami Y, Inoue K. Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and the growth rate of lung adenocarcinoma. *Cancer*. 1992; 70: 63–68.
124. Trere D, Gramantieri L, Siringo S, Melchiorri C, Barbara L, Bolondi L, Derenzini M. In hepatocellular carcinoma AgNOR protein expression correlates with tumour mass doubling time. *J Hepathol*. 1995; 24: 60–65.

125. Montironi R, Braseiseki A, Scerpelli M, Matera G, Alberti R. Value of quantitative nucleolar features vis preoperative cytological diagnosis of follicular neoplasia of the thyroid. *J Clin Pathol*. 1991; 44:509-514.
126. Solymosi T, Toth V, Sapi Z, Bodó M, Gál I, Csanádi L. Diagnostic value of AgNORs method in thyroid cytopathology: correlation with morphometric measurements. *Diagn Cytopathol*. 1996; 14:140-144.
127. Oktay M, Eroz R, Oktay NA, Erdem H, Başar F, Akyol L, Cucer N, Bahadır A. “Argyrophilic nucleolar organizing region associated protein synthesis for cytologic discrimination of follicular thyroid lesions” , *Biotech Histochem*. 2015; 179-183.
128. Helpap B, Bubendorf L. Prostate cancer. Part 1: Review of cell kinetics over the years 1966-2015 and future perspectives of the new grading of the International Society of Urological Pathology (ISUP). *Pathologie*. 2016;37(1):3-10.
129. Munda M, Hajdinjak T, Kavalari R, Stiblar Martincic D. p53, Bcl-2 and AgNOR tissue markers: model approach in predicting prostate cancer characteristics. *J Int Med Res*. 2009;37(6):1868-76.
130. Benn PA and Perle M. Chromosome staining and banding techniques. In: Rooney DE and Czepulskiowski BH (eds) *Human cytogenetics: Constitutional analysis: A practical approach*. London: Oxford University Press, 1986, pp. 91–118,
131. Lindner LE. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *J Histochem Cytochem* 1993; 41(3): 439–445.
132. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127(12):2893-917.
133. Novick AC, Campbell SC. Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. In: *Renal Tumors. Campbell’s Urology*. 8th edition. New York: WB Saunders Co Ltd; 2002. sayfa. 2672- 731.
134. Cücer N, Eröz R, Demirtaş A. Mesane Kanseri Prognoz ile Toplam AgNOR Alanı/Çekirdek Alanı Artışı İlişkisinin İdrardaki Hücrelerde Araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi* 2013; 18
135. Augustynowicz A, Dzieciol J, Barwijk-Machala M. Et al. Assessment of proliferative activity of thyroid Hürthle cell tumors using PCNA, Ki-67 and AgNOR methods. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. 2004;42:165-168

136. Lewy-Trenda I, Janczukowich j, Wierzhniewska-Lawska A. Practical application of proliferation markers (8MB-1, PCNA, AgNOR) expression analysis for differential diagnostics of nodular thyroid lesions. 2006;59:32-7
137. Methotra A, Agarwal P.K, Chandra T. Cytopathology and AgNOR Counts in Fine-Needle Aspiration Cytology Smears of Thyroid Lesion. *Diagnostic Cytopathology*. 1998;19:238-243
138. Słowińska-Klencka D, Klencki M., Popowicz B., Sporny S., Lewinski A. Multiparameter analysis of AgNOR in thyroid lesions: comparison with PCNA expression. 2004; 19:785-792
139. Mehrotra A, Goel M.M, Singh K. Ki-67 and AgNOR proliferative markers as diagnostic adjuncts to fine needle aspiration cytology of thyroid follicular lesions. 2002; 24: 205-211
140. Arslan Solmaz Ö, Yekeler H. Böbreğin Renal Hücreli Karsinomlarında Ki-67 Proliferasyon indeksi, p53 Ekspresyonu, AgNOR sayısı ve Prognostik Faktörlerin, Histopatolojik Tip ve Derecelendirme ile ilişkisi. *Fırat Tıp Dergisi* 2010; 15(1):34-39
141. Yamamota N¹. Studies of argyrophilic nuclear organizer region proteins in renal cell carcinoma. Its significance as a marker of proliferative activity. Article in Japanese. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*. 1993 Aug;84(8):1441-9
142. R L Bryan, J Crocker, A Farr. Nucleolar organizer regions in kidney tumours and xanthogranulomatous pyelonephritis. *J Clin Pathol* 1990;43:147-137.
143. Özdemir B.H, Sertçelik A. Nucleolar Organizer Region in Renal cell carcinoma. *T Klin J Med Res* 1999, 17: 155-158
144. Trere D. Migaldi M. Trentini GP. Higher reproducibility of morphometric analysis over the counting method for interphase AgNOR quantification. *Anal. Cell. Pathol*. 1995;8(1):57-65.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Düzce’de doğdum. İlköğretim yıllarımı Düzcede bir devlet okulunda, Lise eğitimimi Düzce Lisesinde tamamladım. 2002 yılında Balıkesir Üniversitesi Biyoloji bölümünde eğitimime başlayıp 2006 yılında eğitimimi tamamlayıp mezun oldum. 2015 yılında Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesinden Pedagojik Formasyon eğitimimi tamamladım. 13 yılı aşkındır Biyoloji öğretmeniği yapmaktayım. Şuanda da Düzce Üniversitesinde Tıbbi Biyoloji ve Genetik Eğitimi Anabilim Dalında yüksek lisans yapmaktayım.