



## BÖBREĞİN RENAL HÜCRELİ KANSERLERİNDE PROGNOTİK FAKTÖRLERDEN CATHEPSİN D1 EKSPRESYONU VE GENETİK HETEROJENİTENİN ÖNEMİ

### IMPORTANCE OF CATHEPSIN D1 AND GENETIC HETEROGENEITY FROM PROGNOSTIC FACTORS IN RENAL CELL CARCINOMA

Meral KOYUNCUOĞLU<sup>1</sup>

Mustafa PEHLİVAN<sup>2</sup>

Sacide PEHLİVAN<sup>3</sup>

Ziya KIRKALI<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, inciraitı, İzmir

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

<sup>3</sup> Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

<sup>4</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, inciraitı, İzmir

Anahtar Sözcükler: renal hücreli karsinom, prognostik faktörler, cathepsin D1, genetik heterojenite.

Key Words: renal cell carcinoma, prognostic factor, cathepsin D1, genetic heterogeneity.

## ÖZET

*Renal hücreli kanserler (RHK) davranışları bakımından diğer insan kanserlerinden çok farklı olan tümörlerdir. Klinik gidişi belirlemede en önemli prognostik faktörler (PF) tümörün evresi ve nükleer derecesidir. Diğer tümörlerde cathepsin D1 (CD) ekspresyonunun prognostik önemi tartışmalı olup pek çok çalışmada kötü PF olduğu vurgulanmasına karşın RHK'lerde CD ekspresyonu ve genetik heterojenitenin (GH) prognostik önemi çalışılmamıştır.*

*Bu çalışmada; radikal nefrektomi uygulanarak RHK tanısı alan ve düzenli kontrollere gelen 48 olgu değerlendirilmiştir. Olguların medyan yaşı 56.5 (31-78), 28'i erkek, 20'si kadın ve medyan takip süresi 51 aydır. PF olarak 18 farklı klinik ve laboratuvar parametresi değerlendirildiğinde; univariate analizde CD ekspresyonu ve ileri evre, 5 yıllık sağ kalım olasılığını belirgin şekilde olumsuz etkileyen önemli birer PF olarak saptanmıştır ( $p=0.046$ ,  $p=0.021$ ). Ayrıca mitokondrial RNA işlenmesinde ve DNA tamirinde görevli enzimleri kodlayan bölgeye yakın seçilen mikrosatellit D9S157'de GH saptanan grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 5 yıllık sağ kalım olasılığı daha kısa bulunmuştur. Hastaların prognozu hakkında tahminde bulunurken hastalığın yaygınlığı, performans durumu gibi bilinen faktörlerin yanı sıra CD'de göz önüne alınmalıdır.*

*\*Bu çalışmanın DNA analizleri TÜBİTAK tarafından SBAG-1940 proje desteği ile yapılmıştır.*

## SUMMARY

*Renal cell carcinomas (RCC) are tumors, which are very different from other human cancers in terms of their de meanor. The most important prognostic factors in the clinical evaluation are tumor stage and nuclear grade. in other tumors, the prognostic importance of cathepsin D1 (CD) expression is controversial. In most studies. though stressed to be bad prognostic factor, CD and genetic heterogeneity (GH) as a prognostic factor in RCC have not been studied.*

Yazışma adresi: Meral Koyuncuoğlu, Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, inciraitı, İzmir

Makalenin geliş tarihi: 23. 07. 2001; kabul tarihi: 22. 11. 2001

*In this study 48 cases under regular control with a diagnosis of RCC by radical nephrectomy were examined. Their median age was 56.5 (31-79); 28 were men (58%). The period of median follow-up is 51 months. When 18 different clinical and laboratory parameters were evaluated as prognostic factor in univariate analysis, CD and advanced stage were found to be significant prognostic factor affecting 5-yr survival rate negatively ( $p=0.046$ ,  $p=0.021$ ).*

*Furthermore, in the group in which GH was found in microsatellite D9S157, close to the area coding the enzymes responsible for RNA processing and DNA repairing, the 5-year survival rate, though statistically insignificant, was found to be shorter.*

*In conclusion, in addition to commonly known prognostic factor, like extent of disease and performance status, we should also consider CD in predicting prognosis.*

## GİRİŞ

Renal hücreli karsinomlar (RHK), erişkinde görülen primer böbrek tümörlerinin % 80-90'nını oluşturmaktadır (1). RHK'lerin 5 yıllık sağkalım olasılığı (SO) ortalama %70'dir. RHK'lerin klinik davranışlarını belirlemek oldukça zordur. Prognozla ilişkili birçok klinikopatolojik parametre ortaya atılmıştır ancak bunların içinde en önemli parametre patolojik evre ve nükleer derecedir (2-6). Ayrıca cins, ırk, operasyon anında uzak metastaz varlığı, tümör büyüklüğü, renal ven ve vena kava invazyonu, renal pelvis ve medulla tutulumunun prognostik önemi olduğu vurgulanmıştır (4-6). DNA ploidi ile tümör prognozunu ilişkisi tartışmalıdır (7). p53 ekspresyonu ve proliferatif aktivite ile prognoz ilişkisini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır (7-9).

Genetik heterojenite (GH) aynı canlıya ait hücrelerde olması gereken sabit DNA miktarının yada spesifik DNA bölgesinin hücreler arasında değişiklik göstermesi olarak tanımlanabilir. Tümör içinde DNA heterojenitesi flow sitometrik ve sitogenetik olarak RHK'in da bulunduğu birçok kanser türünde gösterilmiştir (10-15). Bu durumun mitozda ki kontrol noktalarının görevini yapamamasından ya da DNA tamirinde görevli enzimlerin inaktif olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Heterojenite ile ilgili çalışmalar genellikle tümör doku örneklerinde yapılmasına karşın aynı bireye ait normal, displazik ve tümör dokularında yapılan çalışmalara literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışmada radikal nefrektomi uygulanan ve RHK tanısı alan 48 olgunun parafin bloklarından alınan kesitlere immunohistokimyasal olarak p53, c-erbB-2, nm23, siklin D1 ve katepsin D1 (CD) monoklonal antikorları uygulanmış ve AgNOR ile PCNA indeksi çalışılmıştır. Ayrıca 48 olgunun 23'ünde aynı hastaya ait normal, displazik ve tümör dokusunun bulunduğu parafin bloklardan alınan kesitlerden DNA izolasyonları yapıldı. Sekiz kromozomda yer alan 8 dinükleotid tekrar kullanılarak DNA örneklerinde GH olup olmadığı analiz edilmiş ve diğer prognostik faktörlerle birlikte önemleri araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Tüm olguların hematoksil-eozin boyalı kesitleri tekrar gözden geçirildi ve immün boyama için tümörlü dokuları en iyi temsil eden parafin bloklardan poli-l-lizinli lamlara kesitler alındı, immün boyama streptavidin biotin immünperoksidaz yöntemi kullanılarak yapıldı. Kısaca, kesitler deparafinize ve rehidrate edildikten sonra %0.3'lük hidrojen peroksit solüsyonu damlatılarak endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Daha sonra sitrat tamponu içeren kaplara yerleştirilen kesitler mikrodalga fırında 2 kez 5'er dakika kaynatıldı. Böylece antijenin açığa çıkması sağlandı. Kesitler daha sonra 15-20 dakika oda ısısında soğuduktan sonra, siklin D1 ve CD (1/50 ve 1/300 dilusyonda), nm23 (1/25 dilusyonda), p53 (1/50 dilusyonda), C-erbB-2 (1/50 dilusyonda), PCNA (1/50 dilusyonda) (Dako) primer antikorları damlatılarak oda ısısında 30 dakika beklendi. Ardından oda ısısında 10 dakika boyunca bağlayıcı biotinize sekonder antikor ve streptavidin peroksidaz solüsyonu (Dako LSAB Kit) damlatıldı. Peroksidaz aktivitesini göstermek için 5 dakika boyunca 3,3'-diaminobenzidine tetrahidroklorür (DAB) (Sigma Chemical Co, St.Louis, Missouri, U.S.A) uygulandı ve çeşme suyunda yıkamayı takiben zıt boyanma sağlamak için kesitler Mayer hematoksil ile boyandı.

Primer antikor olarak kullandığımız nm 23 proteini; nm23-H1 ve nm 23-H2 gen ürünlerinin her ikisini de içermektedir. CD ve nm23 pozitifliği için kontrol olarak pozitif olduğu saptanan meme karsinomu kesitleri seçildi. nm23 nükleer ve sitoplazmik boyanma yapmakla birlikte, kendi olgularımızda belirgin olarak sitoplazmik boyanma görüldü.

immunohistokimyasal olarak, siklin D1, CD ve nm23 primer antikorları ile boyanan tümör dokularına ait kesitlerde tümör hücrelerinde sitoplazmik olarak, c-erbB-2 primer antikorları ile membranöz olarak %0-25'inde boyanma varsa +, %25-50'sinde boyanma varsa ++, >%50 boyanma varsa +++ olarak kabul edildi. p53 ve PCNA primer antikorları ile nükleer boyanma pozitif kabul edildi. p53 primer antikorları ile nükleer olarak % 1-10 boyanma varsa (+), %10-50 boyanma varsa (++) , > % 50 boyanma varsa (+++) olarak değerlendirildi. PCNA ile pozitif nükleer boyanma gösteren olgularda 1000 hücre sayılarak yüzde

değerleri hesaplandı. AgNOR değerlendirmesi için koloidal gümüşleme tekniği ile boyanan olgularda rastgele seçilen 100 hücredeki nükleer noktacılar sayılıp her bir nükleustaki ortalama değerler hesaplandı (AgNOR skoru), istatistiksel analiz için olgular %20'nin altı ve üstü olarak ikiye ayrıldı, immunoreaktivite açısından ise negatif lendi (17). D2S301, D3S1613, D5S679, D8S514, D9S157, D11S1356, D16S3018, D17S1807 dinükleotit tekrarlarını içeren primerler ile ilgili DNA bölgeleri çoğaltıldı (18-20). Çalışmada kullanılan primer konsantrasyonu 22 ng/µL, dNTP konsantrasyonu 0.2 mM, Taq polimeraz 0.8 ünite/µL, bağlanma sıcaklıkları 55-59°C arasında, 30 siklüs olarak kullanıldı (Crococile III, Appligene Oncor). Amplifiye edilen bölgelerin kontrolü agaroz jel elektroforezi yapıldıktan sonra, poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek gümüş nitrat boyama yöntemi uygulandı ve dinükleotid tekrarlar görünür hale getirildi. Boyanan jeller alttan beyaz ışık verilerek 50 ASA'lık siyah-beyaz filme alınmış, karta basıldıktan sonra değerlendirildi (21, 22).

İstatistiksel değerlendirmede gruplar arasındaki farklar için SPSS for Windows®'ta  $\chi^2$  ve Fisher'in kesin ki-kare testleri, sağkalım analizleri için Kaplan-Meier eğrileri ve Log-Rank testi uygulanmıştır, p değeri 0.05'in altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Olguların 28'i erkek, 20'si kadındır. Yaş ortalaması 56.5'dur (31-78). 9 olgu 65 yaş üzerindedir. Median takip süresi 51 aydır. 48 olgunun 15'i ex olmuştur. Olguların 29'u lokalize (Evre I,II), 10'u lokalize-ileri (Evre III, IV), 9'u ileri (metastaz +) hastalıklı olarak ayrılmıştır. Olguların klinik bulguları ile histolojik derece ve evrelere göre dağılımı Tablo 1 de sunulmuştur.

Tablo 1. RHK hastalarının demografik özellikleri (n=48)

Yaş (medyan)	56.5	(31-78)
>65yaş	9	(%18.7)
Cins Kadın/Erkek	20/28	(%42/ %58)
Histolojik Tıp ve Derece:		
Konvansiyonel	48	
	11	(%23)
Derece 2	25	(%52)
Derece 3	10	(%21)
Derece 4	2	(%42)
Klinik Evre: Lokalize hastalık (T1-T2)	29	(%60)
Lokal-ileri hastalık (T3-T4)	10	(%21)
İleri hastalık (Metastatik hastalık)	9	(%19)

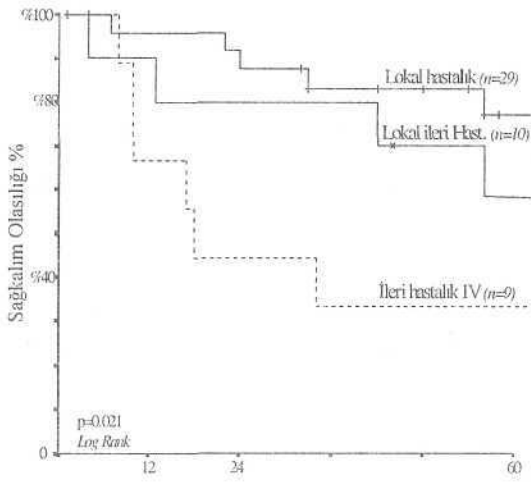
Sağlıklı kontrol grubu DNA'larında en fazla 2 bant gözlenirken, RHK'li olguların hem normal hem displazik hem de tümörlü doku DNA'larının % 82.6'ında (19/23) sağlıklı kontrol grubumuzdan farklı olarak bant paterninde artış

ve pozitif boyanan olgular ayrıldı. PCNA indeksi %5 'in altı ve üstü olarak ikiye ayrıldı. Ayrıca olguların normal böbrek parankimi, displazik ve tümörlü dokuları içeren parafin bloklarından DNA izolasyonu yapıldı (16). Herhangi bir kanser öyküsü olmayan 25 sağlıklı bireyin DNA'sı izole edilerek kontrol grubu olarak çalışmaya ek saptandı ( $p<0.002$ ) (Resimi). Univariate analizde yaş, cins, histolojik derece, p53, c-erbB-2, nm23, cyclin D1, AgNOR, PCNA indeksi ayrıca GH'nin varlığının 5 yıllık sağkalımla istatistiksel olarak ilişkili olmadığı ( $p>0.05$ ), CD ekspresyonu ile ileri evrenin istatistiksel anlamlı olarak ilişkili olduğu saptanmıştır ( $p<0.046$ ,  $p<0.021$ ) (Tablo 2) (Grafik 1-3).

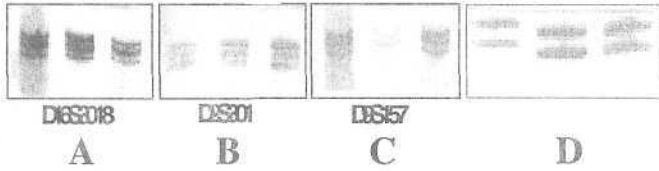
Tablo 2. RHK'de Tanı Anında Klinik, Histopatolojik Parametreler ve Genetik Heterojenitenin Medyan Sağkalım ve 5 yıllık SO Üzerine Etkisi

	n	Medyan Sağkalım (ay)	5 yıllık SO (%)	Log Rank P	
	48	51* (1-109)	73	P	
Yaş	>65	9	56	37	.085
Cinsiyet	<60	ou	-	/ U	.262
	Erkek	28	-	54	
	Kadın	20	-	75	
Klinik Evre	Lokalize	29	-	77	.021
	Lokal-ileri	10	-	58	
	ileri	9	18	33	
Histolojik derece	III-IV	12	56	49	.227
	I-II	36	-	70	
PCNA indeksi	>%5	17	56	45	.086
	<%5	35	-	72	
AgNOR	>%20	17	-	60	.97
	^-/ on	o-1	-	oo	
c-erbB-2	+	16	56	46	.42
	-	32	-	70	
nm23	+	24	-	72	.00
	-	24	-	72	
CyclinD1	+	42	-	66	.252
	-	6	34	50	
CathepsinD1	+	41	-	67	.73
	-	7	-	57	
GHD2S301-[GH]	+	39	-	67	.046
	-	9	13	44	
D3S1613-[GH]	+	7	-	62	.870
	-	1	-	70	
D5S579-[GH]	+	6	-	67	.580
	-	17	-	71	
D8S514-[GH]	+	0	-	-	
	-	2	-	100	.443
D9S157-[GH]	+	21	-	67	.129
	-	3	-	33	
D11S1356-[GH]	+	20	-	70	.407
	-	2	-	100	
D16S3018-[GH]	+	21	-	66	.327
	-	10	-	56	
D17S1807-[GH]	+	13	-	82	
	-	1	-	100	
8 KR'un herhangi birinde GH	+	22	-	66	.191
	-	19	-	62	
		4	-	100	

\* Medyan izlem süresi, GH: genetik heterojenite, KR:kromozom, SO: sağkalım olasılığı



Grafik 1. Patolojik evrenin 5 yıllık SO üzerine etkisi



Resim 1. Dinükleotitler de gözlenen Genetik Heterojenite'ye ait örnek fotoğrafları.

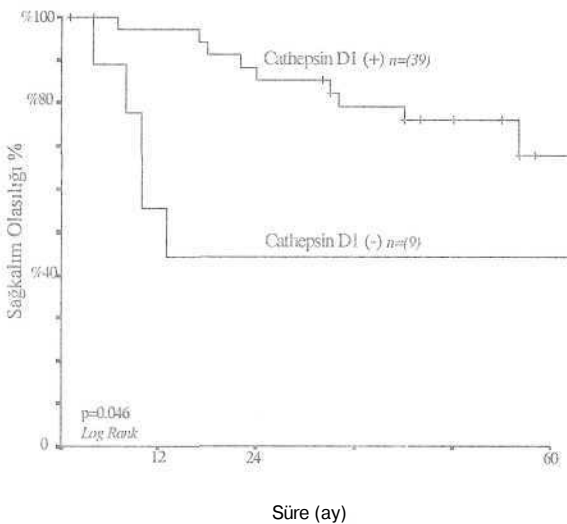
(N:Normal doku, D:Displazik doku, T:Tümör doku)

A; 3 nolu hastaya ait N, D, T sonuçları.

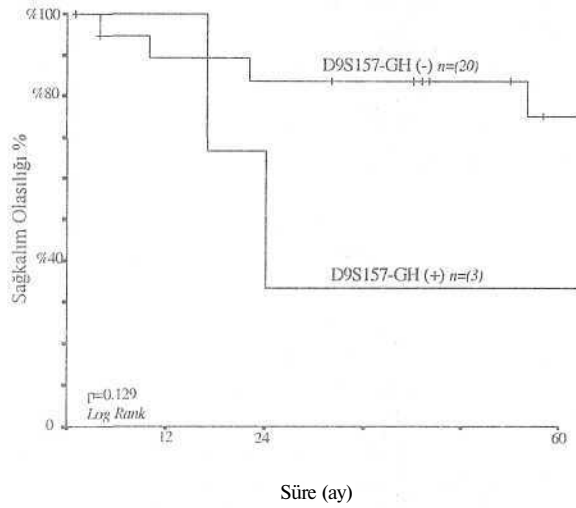
B; 4 nolu hastaya ait N, D, T sonuçları.

C; 10 nolu hastaya ait N, D, T sonuçları

D; Kontrol lenfosit DNA sonuçları



Grafik 2. Cathepsin D1 ekspresyonunun 5 yıllık SO üzerine etkisi



Grafik 3. D9S157-GH'nin 5 yıllık SO üzerine etkisi

## TARTIŞMA

RHK'ler her yıl dünyada %2 oranında artış göstermekte olup davranışları bakımından diğer insan kanserlerinden çok farklı olan tümörlerdir. İnsan kanserlerinin çoğunda tümör progresyonunun; somatik mutasyon ve mutant hücrelerin klonal ekspansiyonunun birlikte etki etmesi ile oluştuğu bilinmektedir. Hücre büyümesinde negatif düzenleyici olarak etki eden mutant tümör supressör genler ya da antionkojenler insan kanserlerinde onkojenlerden daha sık görülür. Bu genlerin inaktivasyonu tümör progresyonuna yol açar. Gen işlevlerinin yerine getirilmesinde bir gen kopyası yeterli olduğu için, supressör genlerin inaktivasyonu tümör gelişiminin geç evrelerinde görülür (23).

CD aspartik proteazlar içinde yer alan lizozomal bir proteazdır ve asıl fonksiyonu lizozomlar içerisinde optimum asidik pH'da (4.5-5.0) proteinleri parçalamaktadır (24-29). CD organizmadaki tüm hücrelerde yaygın olarak bulunan bir proteazdır (28,30,31). Tümör progresyonundaki rolü *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (24,26,30,31). *In vitro* koşullarda, CD'nin ekstrasellüler matriks (ESM) ve bazal membran komponentlerini degrade ettiği saptanmıştır (30). ESM degradasyonu yanısıra mitojenik özellikleri olduğu ve angiogenezi indükleyen bir angiogenik faktör olan "basic fibroblast growth factor"ün salınımını aktive ettiği bildirilmiştir (27-29). Östrojen reseptörü pozitif olan meme kanserli olgularda yapılan çalışmalarda CD'nin östrojenler ve büyüme faktörleri ile regüle edildiği gösterilmiştir (26,29,30). ESM degradasyonundaki rolü yanısıra, CD'nin artmış ekspresyonunda hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini arttırdığı, hücre-hücre etkileşimine bağlı inhibisyonu azalttığı gösterilmiştir (26). CD fibroblastlar ve makrofajlar ve stromal hücreler ile kanser hücreleri tarafından da ekspresyon edilir (32). CD ekspresyonunun

meme kanseri, malign melanom ve malign över tümörlerinde metastaz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (26). Meme kanserlerinde artmış CD ekspresyonunun rekürrensleri belirlemede önemli bir prognostik belirleyici olduğu bildirilmektedir (28-30). CD ekspresyonu, meme kanseri, mide, kolon, larinks, baş-boyun endometrium, ovaryum ve akciğer tümörlerinde gösterilmiştir (27,28,30,32-34). Endometrium, tiroid, kolon kanserlerinde ise CD'nin artmış ekspresyonunun prognostik önemi tartışmalıdır (30). Ayrıca meme kanserleri, larinks, baş - boyun, mesane tümörleri ve malign gliomlarda kötü prognoz ilişkili olduğu saptanmıştır (35). Meme kanserli olgularda CD ekspresyonunun sadece lenf nodu negatif olanlarda değil, tüm meme kanseri alt gruplarında prognoz ve erken relaps ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (36,37). Başka bir çalışmada ise CD ekspresyonunun lenf nodu metastazı ile korele olduğu gösterilmiştir (38). Aynı araştırmacıların yaptıkları başka bir çalışmada ise tümör hücrelerindeki CD ekspresyonunun rekürrens ve kısa hastalıklı yaşam ile korele olduğu bildirilmiştir (39). invaziv diiktai karsinomlarda tümör hücrelerindeki CD ekspresyonunun evre, nükleer derece ve kötü prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır (40). Stromal hücrelerdeki CD ekspresyonunun yüksek mikrodamar dansitesine sahip ve daha agresif gidiş gösteren meme kanserleri ile ilişkili olduğu (41), başka bir çalışmada ise stromal hücrelerdeki CD ekspresyonunun meme kanserinde kötü prognostik belirleyici olduğu, tümör hücrelerindeki CD ekspresyonunun ise prognozu etkilemediği önerilmiştir (42). Oral skuamöz hücreli kanserlerde ise artmış CD ekspresyonunun dediferansiyasyon ve metastaz ile korele olduğu bildirilmiştir (27). Över kanserlerinde yapılan çalışmalarda tümör CD ekspresyonunun iyi diferansiyasyon ve iyi prognozla korele olduğu saptanmıştır (28). Endometrial kanserlerde düşük CD seviyelerinin kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir (29). Tümör hücrelerinde negatif, stromal hücrelerde ise pozitif CD ekspresyonu olan kolorektal kanserlerde prognozun kötü olduğu ve stromal CD ekspresyonunun invaziv fenotip ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (43). Literatür bilgilerimize göre RHK'de CD ekspresyonunun prognostik önemi çalışılmıştır. Bu çalışmada ise artmış CD ekspresyonunun iyi prognostik önemi olduğu saptanmıştır.

Bu örneklerde analiz edilen DNA bölgelerine bakıldığında; D2S301 dinükleotitin genomik instabilite tamirinde görevli MSH2, PMS1, MSH4 ve MSH6 genlerinin bulunduğu bölgeden seçilmiş olduğu; D3S1613 dinükleotidin genomik instabilite tamirinde görevli MLH1, 8 hidroksi guanin DNA glikozilaz ve RHK'e neden olduğu bilileri VHL genine yakın; D5S679 dinükleotidin sikiin B1 ve transkripsiyonu başlatıcı faktör II'nin bulunduğu gen bölgesine yakın; D8S514 dinükleotidin RHK'de translokasyondan sorumlu gen bölgesine yakın olduğunu; D9S157 dinükleotidin X-ışınına maruz kalan değişiklikleri tamir eden ve Mitokondrial DNA işlenmesinde görevli sendoribonükleaz gen bölgelerine yakın olduğunu; D1181356 dinükleotidin sikiin D1, RNA hslkaz, apoptosisi inhibe edici 1 ve 2 nolu gen bölgelerine yakın olduğunu; D16S3018 dinükleotidin mitozda kontrol rolü olan sikiin dependent kinaz 10'u kodiyan gen bölgesine yakın olduğunu ve D17S1807 dinükleotidin CD, p53, nitrit oksit sentetaz 2B ve 2C genlerine yakın bölgeden seçildiği görülmektedir (44). Sekiz dinükleotid, sağlıklı kontrol grubunda en fazla iki bant gösterirken 23 olguya ait N, D \ / \ f dokularının 19 tanesinde 2'den fazla bant patterni gösterdiği belirlenmiştir. Yairsiz 5. kromozomdan seçilen D5S579 bant patterninde artış saptanmamıştır. Özellikle D9S157 dinükleotid tekrarın GH gösterdiği hasta grubuna bakıldığında grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 5 yıllık SO belirgin olarak daha kısa buunmuştur. RHK'de GH araştırmaları oldukça az olmasına karşın (45,46) DNA düzeyinde özellikle dinükleotid tekrarlar yardımıyla aynı olguya ait normal, displazik ve tümör dokusunun karşılaştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu veriler sitogenetik değişikliklerden önce daha küçük değişikliklerin DNA'da meydana gelmiş olduğunu bunun da daha geniş gruplar da ve taze dokudan çalışılması sonucunda bu kanser ile ilgili literatüre yeni bilgilerin katılabileceğini düşündürmektedir.

RHK'lerin etiyolojisinin de genetik faktörlerin rolü olduğu açıktır ancak prognozlarının nasıl olacağı konusunda bilgi verecek bağımsız parametre belirli değildir. Bu çalışmada da ileri evrenin prognozda önemli olduğu bir kez daha saptanmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Peterson RO. Kidney. In : Urologic Pathology (Ed. Petersen RO) Sec Ed J.B. Lipincott Co 19S2;1 - 170.
2. Weiss L, Gelb A, Medeiros J. Adult renal epithelial neoplasms. Anı J Ciin Pathol 1995; 103:624-635.
3. Bernstein J, Evan A, Gardner K. Epithelial hyperplasia in human polycystic kidney diseases: its role in patihogenesis and risk of neoplasia. Am J Pathcl 1987;129:92-102.
4. Gelb AB, Shibuya RB, Weis LM, Medeiros LJ. Stage 1 renal celi carcinoma: A clinicopathologic study of 82 cases. Am J Sugr Pathol 1993; 17:275-286.
5. Thraster JB, Paulson DF. Prognostic factors in renal cancer. Urol Clin North Am 1993;20:247-262
6. Lanigan D. Prognostic factors in rena! celi carcinoma. Semin Diagn Pathol 1998;15:68-76.
7. Papadopoulos i, Jacobsen KW, Wacker HH, Sprenger E. Correlation between DNA ploidy, proliferation marker Ki-67 and early tumor progression in renal celi carcinoma. Eur Urol 1997;31:49-53.

8. Gelb AB, Sudilovsky D, Wu CD, Weis LM, Medeiros LJ. Appraisal of intratumoral microvessel density, MIB-1 score, DNA content and p53 protein expression as prognostic indicators in patients with locally confined renal cell carcinoma. *Cancer* 1997;80:1768-1775.
9. Aaltoma s, Lipponen P, Ala-Opas M, Eskelinen M, Syrjanen K. Prognostic value of Ki-67 expression in renal cell carcinomas. *EurUrol* 1997;31:350-355.
10. Wersø RP, Librit RL, Deitch D, Koss LG. Variability in DNA measurement in multiple tumor samples of human colonic carcinoma. *Cancer* 67:106-15,1991.
11. Harauchi Y, Baba M, Takao S and et al. Flow cytometric analysis of DNA heterogeneity in superficial carcinoma of the esophagus. *Cancer* 75:914-19,1995.
12. Takahashi Y, Takenaka A, Isiguro T, Noda Y. Intratumoral DNA heterogeneity correlated with lymph node involvement and surgical staining in epithelial ovarian cancer by flow cytometry. *Cancer* 73:3011-4,1994.
13. Paydaş S, Sarpel S, Gilman-Sachs A, Tuncer I, Pehlivan S, and et al. DNA ploidy, proliferative activity, and Concavalin A Reactivity in breast cancer. *J Surg Oncology*. 56:21-24:1994.
14. Lyungberg B, Mekle C, Stenling R, Roos G. Heterogeneity in renal cell carcinoma and its impact on prognosis of flow cytometry study. *Br J Cancer* 74:123-7, 1996.
15. Nakazawa H, Ito F, Okuda H and et al. Flow cytometric DNA analysis on renal cell carcinoma study of 116 cases on fresh surgical specimens. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 85:242-250,1994.
16. Goelz SE., Purification of DNA formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985;130:118-126.
17. Miller SA, and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acid. Res.* 1988;28:215.
18. DibC, Faure S, Fizames C, et al. The Genethon Human Linkage Map., *Nature*, 1996;380: A-21, A-25, A-63, A-65, A-79, A-101, A-105.
19. Erdem H, Pehlivan S, Topaloğlu H, et al., Allele distribution of D5S125, MAP1B5' and D5S679 microsatellite markers in Turkish Spinal Muscular Atrophy Families, *Turkish J. Paediatrics*, 1997; 39:447-457.
20. Lenk U, Hanke R., Kraft U., et al. Non-isotopic Analysis of Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) in the Exon 13 Region of the Human Dystrophin Gene, *J.Med.Genet.*, 1993; 30: 951-54.
21. Maniatis T., Fritsch EF., Sambrook F., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory: USA,1983.
22. Ruiz-Cerda JL, Hernandez M, Sempere A, et al. Intratumoral heterogeneity of DNA content in Renal cell carcinoma and its prognostic significance, *Cancer*, 1999;86(4):664-671.
23. Locker J. Tumor suppressor genes and the practice of surgical pathology. *Hum Pathol* 1995;4:359-361.
24. Duffy MJ. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:613-618.
25. Rovinsky YA. Cellular and molecular mechanisms of tumor invasion. *Biochem* 1998;63:1029-43.
26. Rocheford H, Liaudet-Coopman E. Cathepsin in cancer metastasis: A Protease and A Ligand. *APMIS* 1999; 107:86-95.
27. Brysk MM, lei G, Adler-Storhiz K, et al. Differentiation and cathepsin D expression in human oral tumors. *Laryngoscope* 1998;108:1234-1237
28. Baekelandt M, Holm R, Trope CG, et al. The significance of metastasis-related factors cathepsin D and nm23 in advanced ovarian cancer. *Ann Oncol* 1999;10:1335-1341.
29. Falcon O, Chirino R, Leon L, et al. Low levels of cathepsin D are associated with poor prognosis in endometrial cancer. *Br J Cancer* 1999;79(3/4):570-576.
30. Goussia A, Ioachim E, Peschos D, et al. Immunohistochemical expression of cathepsin D in laryngeal epithelial lesions: Correlation with CD44 expression, p53 and RB status and proliferation associated indices. *Anticancer Res* 1999; 19:3055-3060.
31. Mordente JA, Choudhury MS, Tazaki H, Mallouh C, Konno S. Hydrolysis of androgen receptor by cathepsin D: its biological significance in human prostate cancer. *Br J Urol* 1998;82:431-435.
32. Haier J, Nasralla M, Nicolson GL. Cell surface molecules and their prognostic values in assessing colorectal carcinomas. *Ann Surg* 2000;231(1):11-24.
33. Ledakis P, Tester WT, Rosenberg N, et al. Cathepsin D,B, and L in malignant human lung tissue. *Clin Cancer Res* 1996;2:561-568.
34. Matsuo K, Kobayashi I, Tsukuba T, Kiyoshima T, Ishibashi Y, Miyoshi A, Yamamoto K, Sakai H. Immunohistochemical localization of cathepsin D and E in human gastric cancer: A possible correlation with local invasive and metastatic activities of carcinoma cells. *Hum Pathol*. 1996; 27:184-190.
35. Stehle G, Wundwe A, Hartung G, Sinn H, Heene DL. Prognostic value of cathepsin D in breast cancer. *Br J Cancer* 1999;81(8):1426-1428.
36. Westley BR, May FEB. Prognostic value of cathepsin D in breast cancer. *Br J Cancer* 1999;79(2):189-190.

37. Scorilas A, Trangas T, Yotis J, Pateras C, Talieri M. Determination of omyc amplification and overexpression in breast cancer patients: Evaluation of its prognostic value against c-erbB-2, cathepsin D and clinicopathological characteristics using univariate and multivariate analysis. *Br J Cancer* 1999;81 (8):1385-1391.
38. Lah TT, Cercek M, Blejec A, et al. Cathepsin B, a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: Comparison with cathepsin D, cathepsin L, and other clinical indicators. *Clin Cancer Res* 2000;6:578-584.
39. Lah TT, Kalman e, Najjar D, et al. Cells Producing cathepsin D,B, and L in human breast carcinoma and their association with prognosis. *Hum Pathol* 2000;31(2):149-160.
40. Lösch A, Tempfer C, Kohlberger P, et al. Prognostic value of cathepsin D expression and association with histomorphological subtypes in breast cancer. *Br J Cancer* 1998;78(2):205-209.
41. Gonzales-Vela MC, Garijo MF, Fernandez F, Buelta L, Val-Bernal JF. Cathepsin D in host stromal cells is associated with more highly vascular and aggressive invasive breast carcinoma. *Histopathol* 1999;34:35-42.
42. Valentini AM, Pirrelli M, Armentano R, Caruso ML. The immunohistochemical expression of cathepsin D in colorectal cancer. *Anticancer Res* 1996; 16:77-80.
43. Theodoropoulos GE, Panoussopoulos D, Lazaris AC, Golematis BC. Evaluation of cathepsin D immunostaining in colorectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 1997;65:242-248.
44. <http://www3.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim>
45. Gallou C, Joly D, Mejen A, et al. Mutations of the VHL gene in sporadic renal celi carcinoma: Definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mut* 1999;13(6):464-475.
46. Willers CP, Siebert R, Bardenheuer W, et al. Genetic Instability of 3p12-p21 specific microsatellite sequences in renal celi carcinoma. *Br J Urol* 1996;77:524-529.

\*Bu çalışma XIV. Ulusal Kanser Kongresinde Poster olarak sunulmuş ve moleküler genetik kısmı TÜBİTAK SBAG-1940 proje desteği ile yapılmıştır.