



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RENAL HÜCRELİ KARSİNOM DOKUSUNDA; EGFR,
BRAF VE K-RAS GEN MUTASYONLARININ, DNA
DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ İLE TESPİTİ VE
KLİNİK PARAMETRELER İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ersan BULUT
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mehmet Sakıp ERTURHAN**

Aralık-2011

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RENAL HÜCRELİ KARSİNOM DOKUSUNDA; EGFR,
BRAF VE K-RAS GEN MUTASYONLARININ, DNA
DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ İLE TESPİTİ VE
KLİNİK PARAMETRELER İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ersan BULUT
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mehmet Sakıp ERTURHAN**

Aralık-2011

Bu proje Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

I. ÖNSÖZ

Asistanlığım süresi boyunca her gün işime seyerek gelmemi ve her zaman istekle çalışmamı sağlayan sağlayan uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım; başta Prof.Dr. Faruk YAĞCI'ya olmak üzere Prof.Dr. Ahmet ERBAĞCI'ya ve Doç.Dr. İlker SEÇKİNER'e,

Çalışmamın her anında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, asistanlığım süresince örnek kişiliği, tecrübesi ve fikirleriyle beni destekleyen ve yönlendiren, her sorunumda mutlaka değerli zamanını ayıran, tez danışmanım Doç.Dr. M. Sakıp ERTURHAN'a,

Asistanlığım ilk gününden son gününe kadar desteğini gördüğüm Yard.Doç.Dr. Ömer BAYRAK'a,

Asistanlık sürecini paylaştığım, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, bölümümüzden mezun olmuş ve halen asistan olarak görev yapan arkadaşlarıma,

Tezimin genetik değerlendirme kısmında önemli katkılarından dolayı Yard.Doç.Dr. Beyhan Cengiz'e,

Tezimin laboratuvar kısmında fedakârca çalışan Zeynep EŞLİK'e,

Berber çalışma mutluluğunu yaşadığım tüm hemşire ve personel arkadaşlara,

İyi kötü günümde hep yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili eşime,

İlkokuldan bugüne kadar eğitimime ve hayatıma sürekli destek olup her türlü fedakârlıkta bulunan canım anneme ve tüm aileme

Teşekkür ederim...

Dr. Ersan BULUT

Gaziantep, 2011

II. İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
KISALTMALAR	IX
TABLolar	X
ŞEKİLLER	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek tümörleri epidemiyoloji, etyoloji ve risk faktörleri	2
2.2. Sınıflama	3
2.3. Evreleme	4
2.4. Renal Hücreli Karsinomların Derecelendirilmesi	6
2.5. Semptomlar ve tanı	7
2.6. Böbrek tümörlerinde tümör belirleyiciler	8
2.6.1. Biyomoleküler belirteçler	8
2.6.2. Hücre siklusuna dayalı tümör belirteçleri	8
2.6.3. İmmünojenik özelliğe sahip tümör belirteçleri	8
2.6.4. Apoptoza dayalı tümör belirteçleri	8
2.6.5. Enzimatik tümör belirteçleri	8
2.6.6. “Cluster designating” tabanlı (CD) tümör belirteçleri	8
2.6.7. Proteinöz yapıdaki tümör belirteçleri	9
2.6.8. Malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilen hücre spesifik proteinler	9
2.6.9. Karyometrik tümör belirteçleri	9
2.6.10. Sitoloji ve DNA'ya bağlı tümör belirteçleri	9
2.7. Böbrek tümörlerinde prognostik faktörler	9

2.8.Böbrek Tümörlerinde Tedavi	11
2.8.1. Organa Sınırlı Böbrek Tümörlerinde Tedavi	11
2.8.1.1. Açık Radikal Nefrektomi	11
2.8.1.2. Açık nefron koruyucu cerrahi	12
2.8.1.3. Laparoskopik radikal nefrektomi	12
2.8.1.4. Laparoskopik Nefron Koruyucu Cerrahi	13
2.8.1.5. Minimal Invaziv Tedaviler	13
2.8.2.Lokal ileri evre böbrek tümörlerinde tedavi	14
2.8.3.Metastatik Böbrek Tümörlerinde Tedavi	14
2.8.3.1. Cerrahi	14
2.8.3.2. Radyoterapi	15
2.8.3.3. Kemoterapi	15
2.8.3.4. İmmünoterapi	15
2.8.3.5. Anjiogenez inhibitörü ilaçlar	16
2.9.Renal Hücreli Karsinomda Karsinogenezis	17
2.9.1.Familyal Renal Hücreli Karsinom ve Moleküler Genetik	17
2.9.1.1. Von Hippel_Lindau Hastalığı, Von Hippel Lindau Geni ve Şeffaf Hücreli karsinomun genetiği	18
2.9.2. Familyal papiller RHK ve Genetiği	18
2.9.3.Tümör Biyolojisi ve Klinik Etkileri	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Hasta seçimi	21
3.2. Klinik Değerlendirme	21
3.3. Patolojik değerlendirme	22
3.4. Genetik değerlendirme	22
3.4.1 Örneklerin toplanması	22
3.4.2 örneklerden DNA izolasyonu	22
3.4.3 Örneklerden DNA dizi analizi	23

4. BULGULAR	24
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	32
7. KAYNAKLAR	33

III. ÖZET

RENAL HÜCRELİ KARSİNOM DOKUSUNDA; EGFR, BRAF VE K-RAS GEN MUTASYONLARININ, DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ İLE TESPİTİ VE KLİNİK PARAMETRELER İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Ersan BULUT

Uzmanlık Tezi, Üroloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet Sakıp ERTURHAN

Aralık 2011, 42 Sayfa

Renal hücreli kanserlerde (RHK); hastaların prognozu ve moleküler hedeflenmiş tedavilerin cevabını belirlemede önemli olan Kras, Braf ve EGFR (endotelial growth faktör reseptörü) genindeki mutasyonların varlığının gösterilmesi amaçlandı. Çalışmaya Haziran 2009-Haziran 2011 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'nda böbrek tümörü ön tanısıyla radikal veya parsiyel nefrektomi yapılan 35 hasta dahil edildi. Patoloji spesmenlerinden normal doku ve kanserli dokudan preparatlar hazırlandı. DNA izolasyon işleminden sonra bu dokulardan genomik DNA eldesi gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'lardan ABI-3130 DNA dizi analizi cihazı kullanılarak erime mutasyon tanımlanması yapıldı. Çalışmaya dahil edilen 35 hastanın 19'i erkek, 16'si kadın olup yaş ortalaması 59.3 (yaş aralığı 15-77) olarak belirlendi. Hastaların 27'sine açık radikal nefrektomi, 7'sine ise laparoskopik radikal nefrektomi, 1'ine laparoskopik parsiyel nefrektomi yapılmıştır. Tümörlerin 2010 TNM evrelemesine göre dağılımı incelendiğinde sırasıyla 11 (%31) hastada T1a, 8 (%22) hastada T1b, 3 (%8) hastada T2, 9 (%25) hastada T3a, 4 (%11) hastada T3b saptandı. Hastaların 23'i (%65) N0, 8'i (%22) N1, 4'ü (%11) ise N2 olarak değerlendirildi. Yapılan çalışma sonucunda EGFR, Braf VE Kras yolağı üzerindeki tüm eksonlarda herhangi bir mutasyon olmadığı saptandı.

Histopatolojik olarak International Union Against Cancer (UICc) ve American Joint Committee on Cancer (AJCC) sınıflandırma sistemi ile incelendiğinde 17 (%49) hastada şeffaf hücreli RHK, 7(%20) hastada kromofob hücreli RHK, 11 (%31) hastada papiller tip RHK, olarak rapor edildi. Ancak mutasyon saptanmamış olması böbrek kanserlerinde bu genlerin etkin olmadığı anlamına gelmemektedir. mRNA ekspresyonları, protein ekspresyonları ve onkogenlerin tayini gibi daha ileri çalışma yöntemleri ile böbrek tümörleri risk faktörleri, doğal seyirleri, tedaviye yanıtları daha iyi anlaşılabilir.

Gelecekteki böbrek tümörü araştırmalarına yönelik EGFR, Braf ve Kras gen polimorfizmlerinin saptanmasında ve tümör dokusu çalışmaları ile birleştirilerek mutasyonların tanımlanmasında öncülük edecek bir çalışma olarak düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Renal hücreli karsinom, Nefrektomi, EGFR-Braf-Kras.

IV. ABSTRACT

EVALUATION OF MUTATIONS OF EGFR, KRAS AND BRAF ON THE TISSUE OF RENAL CELL CARCINOMA WITH USING DNA SEQUENCE ANLYSIS AND COMPARISON WITH

Dr. Ersan BULUT

Dissertation Thesis, Department of Urology

Supervisor: Assistant Professor Mehmet Sakıp ERTURHAN

December 2011, 42 Pages

Our objective was the show the mutations in Kras Braf and EGFR genes which are important in determining the progress and the response the molcular based treatment in renal cell cancers. We evaluated the medical records of the 35 patients who underwent radical or partial nephrectomy between June 2009 and June 2011 in Gaziantep University Faculty of Medicine, Department of Urology. We prepared normal tissue and cancerous tissue from pathological specimen. After DNA isolation, We get genomic dna disolve mutation identified with using ABI-3130 DNA analysis device. 19 patients were male and 16 patients were female. The mean age was 59.3 years. Radical nephrectomy were performed in 27 patients, laporoscopic radical nephrectomy were performed in 7 patient and partial nephrectomy were done in 1 patient. We staged to tumors using TNM cancer 2010 classification. We established as stage T1a in 11 patients (31%), T1b in 8 patients (22%), T2 in 3 patients (8%), T3a in 9 patients (25%) and T3b in 4 patients(11%). Additionally, 23 patients staged N0, 8 patients N1 and 4 patients N2. We determined clear cell renal cell cancer in the 9 patients, kromofob cell renal cell cancer in the 7 patient and papiller type renal cell cancer in the 11 patient with using histopatologically UICC and AJCC staging system. We didnt determined mutations at all exons which were on the egfr. Braf and Kras pathway.

Even If mutations does not determined on the tissue of renal cell cancer, It doesn't means that these genes had not play on the carcinogenesis of renal cell cancers. Identification of mRNA and other proteins of this oncogenes can help to understand of carcinogenesis of RHK.

Keyword: Renal Cell Carcinoma, Nephrectomy, Kras-Braf-Egfr

V. KISALTMALAR

RHK	: Renal Hücreli Karsinom
EGFR	: Endotelyal Growth Faktör Reseptörü
VHL	: Von Hippel Lindau
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
RCCA	: Renal Cell Ca
BHT	: Böbrek Hücreli Tümör
USG	: Ultrasonografi
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
NKC	: Nefron Koruyucu Cerrahi
RN	: Radikal Nefrektomi
LRN	: Laparoskopik Radikal Nefrektomi
EORTC	: European Organisation for Research for and Treatment of Cancer
SWOG	: Southwest Oncology Group
MDR	: Multidrug Rezistans
IFN	: Interferon
IL	: Interlökin
HIF	: Hipoksiyle indüklenen Faktör
PDGF	: Plaklet Kaynaklı Büyüme Faktörü
bFGF	: Temel Fibroblast Growth Faktör
TGF	: Transforming Growth Faktör
TK	: Tirozin Kinaz
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
UIcC	: International Union Against Cancer
AJCC	: American Joint Committee on Cancer

VI. TABLOLAR

	Sayfa No
Tablo 1. Böbrek tümörleri risk faktörleri.	3
Tablo 2. Dünya sağlık örgütü böbrek tümörü sınıflandırılması.	4
Tablo 3. BHT için tümör, nod, metastaz evreleme sistemi.	5
Tablo 4. TNM Evre Gruplandırması.	6
Tablo 5. Nefron Koruyucu Cerrahi Endikasyonları.	12
Tablo 6. Otomatik DNA dizileme için hazırlanan PCR karışımı oranları.	23

VII. ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1. Egfr Resetörü Uyarılması ile Ras Aktivasyonu	19
Şekil 2. Karsinogeneziste Kras ve Braf Genlerinin Rolü	20
Şekil 3. Örnek Dokuda Kras 1113 Kodonu Görünümü	25
Şekil 4. Örnek Dokuda Braf 11 Ekson Görünümü	25
Şekil 5. Örnek Dokuda Braf 15 Ekson Görünümü	26
Şekil 6. Örnek Dokuda EGFR 18 Ekson Görünümü	26
Şekil 7. Örnek Dokuda EGFR 19 Ekson Görünümü	27
Şekil 8. Örnek Dokuda EGFR 21 Ekson Görünümü	27

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ürolojik kanserler arasında 3. en sık ölüm nedeni olan renal hücreli karsinom, tüm erişkin malignansilerinin %2'sini oluşturmakta olup ürolojik kanserler içerisinde en mortal klinik seyirli olanıdır. Primer malign renal tümörlerin %85'i adenokarsinomdur. ABD'de her yıl 30.000 yeni vaka rapor edilmekte ve bunların 12.000'i bu hastalıktan ölmektedir (1). Ülkemizde bu konuda yapılan kapsamlı bir epidemiyolojik çalışma bulunmamaktadır. Genel olarak yılda 100.000 kişide 8,7 yeni böbrek kanseri vakası gelişmektedir (2). Olguların çoğu sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. Bazı olgular genetik bir hastalığa veya bir sendroma bağlı olarak görülmektedir.

Son dönemlerde genetik biliminin ilerlemesiyle, familial olarak tanımlanan böbrek sendromlarının sayısı artmıştır. Bununla birlikte sporadik olgularda da genetik yatkınlık ve gen mutasyonlarının etkisi anlaşılmaya başlanmıştır. Gen mutasyonları sonucu hücrede pekçok değişiklik meydana gelmektedir. Büyüme reseptörlerinin aktivasyonu, hücre siklus regülasyonunun bozulması sonucu kontrolsüz hücre büyümesi meydana gelmektedir (3).

Renal hücreli karsinom gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaları anlamaya yönelik önemli çalışmalar, tedavide daha rasyonel yaklaşımların benimsenmesine katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte her geçen gün böbrek kanserinin biyolojisi ile ilgili yeni bilgiler ortaya çıkarılmakta ve bu moleküllere yönelik tedaviler hızla geliştirilmektedir.

Biz bu çalışmamızda böbrek kanserli vakalarda mutasyonların durumunu, eğer mutasyon varsa bu mutasyonların hastanın mevcut klinik özellikleri ile ilişkisini inceledik. Çalışmamızın böbrek kanserinin biyolojisini daha iyi anlayarak, konvansiyonel kemoterapiye dirençli olan bu kanserin davranışını anlamamıza katkıda bulunacağını düşünüyoruz. Yanı sıra hedefe yönelik tedavilerden fayda görecektir alt grupların ayrışması ve belki de yakın gelecekte bu kanser türünün kürabl olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek tümörleri epidemiyoloji, etyoloji ve risk faktörleri

Renal hücreli karsinom (RHK), ürogenital kanserler içerisinde sıklık açısından prostat ve mesane kanserlerinden sonra 3. sırada yer almaktadır. Erkek-kadın oranı yaklaşık olarak 3/2'dir (3,4). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2009 yılında tahmin edilen renal pelvis ve böbrek tümürlü yeni vaka sayısı 57760 iken; buna bağlı ölüm sayısı 12980 olarak beklenilmektedir (3). İnsidans 40 yaşından sonra artış göstermekte ve 75 yaşından sonra düşmektedir.

Böbrek kanserlerinin gelişmesinde pek çok değişik faktör sorumlu tutulmaktadır. Sigara bugün kabul edilen tek çevresel risk faktörüdür. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, sigara içenlerde içmeyenlere göre 1,6-2,03 kat daha fazla böbrek kanseri görüldüğü gösterilmiştir (5). Obezite, bir diğer risk faktörü olup karsinogenezde rol oynayan serbest insülin benzeri büyüme faktörünün RHK hastalarında biyoyararlanımının artması obezite ile ilişkiyi vurgulamaktadır. Diğer yandan, beden kitle indeksi fazla olan kişilerde RHK riskinin yaklaşık 2 kat arttığı gösterilmesi ve fiziksel aktivite artışı ile böbrek kanseri riskinin azaldığının saptanması da bu veriyi desteklemektedir (6,7). Önceleri hipertansiyon ve diüretik kullanımının böbrek kanseri için farklı risk faktörleri olduğu bildirilmesine rağmen, ciddi yapılan son çalışmalar yalnızca hipertansiyonun risk faktörü olduğunu, diüretiklerin risk faktörü olmadığını göstermiştir (8). Kırmızı et ve yağdan zengin gıdalarla beslenmenin böbrek kanseri riskini arttırdığı, sebze ve meyveden zengin gıdalarla beslenmenin ve düzenli E vitamini ile demir preparatları kullanmanın kanser riskini %32 oranda azalttığını göstermiştir (9).

Endüstriyel karsinojenlere maruziyet ya da içme suyu ile maruz kalınan karsinojenik asbest, kadmiyum RHK riskini arttırdığı bilinmektedir. Mesleki nedenlerle petrol ürünlerine , organik çözücüler (benzidin, benzen, herbisitler ve vinil klorid) polisiklik aromatik hidrokarbonlara (asfalt ve yangın söndürücü sektörü) maruz kalanlarda böbrek kanseri riski artmaktadır (10). Hemodializ uygulanan hastalar ve böbreğin kazanılmış kistik hastalıklarında da böbrek kanseri gelişme riski arttığı gösterilmiştir (11).

Kronik rekürren üriner sistem enfeksiyonu hikâyesi olanlarda böbrek kanseri insidansının 1,9 kat arttığı bildirilmektedir. Buna neden olarak da; bakteriyel enfeksiyon-inflamasyon zincirinde oluşan reaktif oksijen radikallerinin DNA hasarına neden olarak karsinogenezi başlatması olabileceği düşünülmektedir (12).

Böbrek kanserlerinde aile hikâyesi olanlarda renal hücreli karsinom gelişme riski 4 kat artmaktadır. Ailesel geçişli Von Hippel-Lindau (VHL) ve tuberoskleroz gibi sendromlarla gelişen bu özel hasta grubunda oluşan RHK'lar her iki böbrekte ve multiple olarak ortaya çıkma eğilimindedir (13).

Son olarak alkol tüketimi ile böbrek kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalara bakıldığında çoğunda herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Sadece bir çalışmada kadınlarda alkol tüketiminin böbrek kanseri riskini azalttığı bildirilmiştir. Ancak kanser riskini azalttığını bildiren yazarlar bu sonuçlara kuşku ile bakılması gerektiğini belirtmektedirler (14). Böbrek tümörlerinin gelişiminde sorumlu tutulan risk faktörleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Böbrek tümörleri risk faktörleri

- Aile öyküsü
- Sigara
- Obezite
- Sedanter yaşam
- Hipertansiyon
- Beslenme alışkanlıkları
- Meslek
- İyonize radyasyon
- Kronik böbrek yetmezliği
- Üriner sistem enfeksiyon

2.2. Sınıflama

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2004 yılında Mainz ve Hidelberg'in sınıflamalarının özeti olarak nitelendirilebilecek böbrek tümörleri sınıflandırmasını yapmıştır. Bu sınıflamada patolojik ve genetik analizlerin sonuçları da göz önünde bulundurularak kategoriler oluşturulmuştur. DSÖ'nün en son yapılan böbrek tümörü sınıflaması Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Dünya sağlık örgütü böbrek tümörü sınıflandırılması

1.Ailesel böbrek tümörü
2.Renal hücreli tümör
<u>Malign</u>
Şeffaf hücreli RCCa
Multiloküler şeffaf hücreli RCCa
Papiller RCCa
Kromofob RCCa
Bellini toplayıcı kanal Ca
Renal medüller Ca
Xpll translokasyon karsinomu
Nöroblastoma ile ilişkili karsinoma
Müsinöz tubuler ve işsi hücreli karsinoma
Sınıflandırılmayan RCCa
<u>Benign</u>
Papiller Adenom
Onkositom
3. Metanefrik tümör
Metanefrik adenom Metanefrik adenofibrom Metanefrik stromal tümör
4.Nefroblastik tümör
Nefrojenik artık
Nefroblastoma
Kısmen kistik diferansiasyon içeren nefroblastoma
5.Nöroendokrin tümör
Nöroendokrin karsinoma
Primitif nöroektodermal tümör
Nöroblastoma
Feokrositoma
6.Mix mezenkimal ve epitelyal tümör
Kistik nefroma
Mix epitelyal ve stromal tümör
Sinovial sarkom
Diđerleri
Mezenkimal tümör
Hematopoetik ve lenfoid tümör
Germ hücreli tümör
Metastatik tümör

2.3. Evreleme

Renal hücreli kanserlede (RHK) evreleme geleneksel olarak tümörün anatomik yayılımına (tümör büyüklüğü, komşu organ tutulumu, vasküler invazyon) göre yapılmaktadır. Fizik inuayene, tomografik değerlendirme ve diğer uygun görüntüleme yöntemleri kullanılarak primer tümör, lokal ve uzak yayılımlar değerlendirilerek klinik evrelendirme yapılır. Uzak metastazları değerlendirmek için akciğere ait görüntüleme yöntemleri, gerektiğinde izotopik tetkiklerden yararlanır.

Değişik anatomik ve, histolojik ve semptomatik faktörler prognoza etki eder. Günümüzde RHK evrelemesinde TNM klasifikasyonu kullanılır. Bu kriterler tümörün anatomik yayılımı ve evresinin prognozla olan korelasyonuna göre belirlenmiştir. nefron koruyucu cerrahi tekniğinin yaygınlaşmasından sonra T1a(böbrekle sınırlı ≤ 4 cm) ve T1b (böbrekle sınırlı >4 cm) olarak ayrılmıştır. 2009 yılında tnm klasifikasyonunda T2 tümörleri 10 cm'den küçük ya da büyük oluşuna göre 2'ye ayrılırken, T3 tümörler de gerek damar invazyonu gerekse adrenal tutulumu ile ilgili ciddi değişiklikler yapıldı. Renal ven tutulumu T3a, ipsilateral adrenal ven invazyonu T4 olarak değerlendirilmiştir.

Renal hücreli kanserlerde günümüze kadar farklı evreleme sistemleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar ile evreleme sistemleri devamlı olarak güncellenmiş ve en son olarak 2009 yılında International Union Against Cancer (UICC) ve American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM sisteminde revizyon yaparak günümüzde en sık kullanılan sistemi geliştirmişlerdir. Bu sistem Tablo 3 ve Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 3. RHK için TNM Sınıflaması, (2009 UICC/AJCC)

Primer Tümör (T)
-TX: Primer tümör değerlendirilemez.
-T0: Primer tümör yok
-T1: Böbreğe sınırlı, en büyük çapı ≤ 7 cm olan tümör
T1a: Böbreğe sınırlı, en büyük çapı ≤ 4 cm olan tümör
T1b: Böbreğe sınırlı, en büyük çapı >4 cm ve <7 cm
-T2: Böbreğe sınırlı, en büyük çapı > 7 cm olan tümör
T2a: Böbreğe sınırlı, çapı > 7 cm ve ≤ 10 cm olan tümör
T2b: Böbreğe sınırlı, çapı >10 cm olan tümör
-T3: Perinefrik dokulara, majör venlere invazyongösteren ,ancak gerota fasyasını aşmamış tümör
T3a: Renal ven veya onun segmental (kas ihtive eden) dallarına invazyon gösteren ya da renal sinüsteki yağ dokusunu (peripelvik yağ)tutan ancak gerota fasyasını aşmamış tümör.
T3b: Diafram altında kalan vena kavanın içinde tümör
T3c: Diafram üzerindeki vena kavanın içine uzanan ya da vena kava duvarına invazyon gösteren tümör
-T4: Gerota fasyasının ötesine uzanan veya ipsilateral adrenal beze invazyon gösteren tümör
Bölgesel Lenf Nodları (N)
NX: Bölgesel lenf nodu tutulumu değerlendirilemez
N0: Bölgesel lenf nodu tutulumu yok
N1: Tek bir bölgesel lenf nodunda tutulum var
N2: Birden çok bölgesel lenf nodunda tutulum var
Uzak Metastaz (M)
MX: Uzak metastaz değerlendirilemez.
M0: Uzak metastaz yok
M1: Uzak metastaz var

Tablo 4. TNM Evrelemesi

Evre	Primer Tümör	Bölgesel Lenf Nodu	Uzak Metastaz
1	T1	NO	M0
2	T2	NO	M0
3	T3 T1,T2,T3	NO N1	M0 M0
4	T4 Her türlü T Her türlü T	Her türlü N N2 Her türlü N	M0 M0 M1

2.4. Renal Hücreli Karsinomların Derecelendirilmesi

RHK'larda evre dışında en önemli prognostik faktör derecedir. İlk olarak 1971 yılında Skinner ve arkadaşları sadece çekirdek şeklini değerlendiren derecelendirme sistemini oluşturmuşlardır. 1982 yılında Fuhrman ve arkadaşları çekirdek boyut, sınır ve nükleol belirginliğinin değerlendirildiği ve birden dörde kadar derecelendirilen sistemi önermişlerdir. Tümörlerin büyük çoğunluğu 2 ve 3 olan tümörlerdir. Derece 1 olan tümörler daha az oranda olup derece 4 olanlar olguların %5-10' nu oluşturur. İyi korunmamış materyalde nükleol ve kromatin paterni kolaylıkla kaybolacağı için, doğru bir derecelemede materyalin kalitesi önemlidir.

Derece 1; On'luk objektifte nükleuslar küçük ve yoğundur ve matür lenfositlere benzer. Nükleol bulunmaz.

Derece 2; İnce granüler kromatin paterni vardır ve bu büyütmeye nükleol vardır, ancak küçük kromosenter şeklinde görülür. Nükleol ancak 40'luk büyütmeye görülür, ancak derece 3'teki kadar büyük değildir.

Derece 3; On'luk büyütmeye nükleoller kolaylıkla seçilebilir.

Derece 4; Nükleer pleomorfizm, hiperkromazi, tek yada multipl makronükleoller bulunur. Fuhrman sisteminin uygulanmasında endişe verici bir konu; Tümör içindeki derece heterojenitesidir. Birçok deneyimli uzman en kötü derece yaklaşımını kabul etmektedir. En kötü derece bir büyük büyütmeye alanını kaplayan en anormal nükleuslar ile tanımlanır. Dağınık şekilde bulunan hücreler sayılmayabilir, ancak tek bir odak içinde yüksek dereceli özellikte birçok hücre varsa, tümör buna göre derecelendirilmelidir (15).

2.5. Semptomlar ve tanı

Böbrek tümörleri retroperitoneal yerleşimlerine bağlı olarak sıklıkla asemptomatiklerdir. Semptomlar tümörün lokal büyümesine, hemorajiye, paraneoplastik semptomlara ya da metastatik lezyonlara bağlı oluşabilir. Klasik bilgi olarak RHK'da klinik bulgular; yan- sırt veya karın ağrısı, palpe edilebilir bir kitle ve hematüriden oluşan bir triad olarak tanımlanmaktadır. Ancak bu hastaların sadece %15-20'lik bir grubunda saptanabilmekte ileri evre hastalığın göstergesi olmaktadır (16). İleri evre hastalığın diğer belirtileri kilo kaybı, ateş, gece terlemeleri ya da fizik muayenedeki palpabl servikal lenfadenopati, varikozel ve bilateral alt ekstremitte ödemidir. Başta sedimantasyon hızında artış, hipertansiyon ve anemi olmak üzere pek çok paraneoplastik sendromlar hastaların %20'sinde görülür (17).

Ultrasonografi (USG) ve bilgisayarlı tomografinin (BT) sıklıkla kullanılması nedeniyle olguların %50'si insidental olarak saptanmaktadır. Böbrek tümörü şüphesiyle yaklaşılarda ilk basamakta yapılması önerilen tetkik USG'dir. Ultrasonografi ile özellikle >1cm'lik ve periferik yerleşimli kitlelere tanı koyulabilmekte ve solid-kistik ayrımı yapılabilmektedir. Buna karşın USG ile tam doğrulukta evre tayini ve tümörün ana vasküler yapılarla ilişkisi ortaya koyulamayabilir. Bu durumda bir ileriki radyolojik inceleme BT olmalıdır. BT ile USG'deki bu handikapların önüne geçilebileceği gibi karşı böbrek dahil karın içi diğer organlarla ilgili ve lenf nodu tutulumu hakkında da bilgi edinilebilir (18). Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) lokal invaziv malignitede, venöz tutulum, böbrek yetmezliğinde ve kontrast alerjisi durumunda tercih edilmelidir (19).

Metastaz taramasında; öncelikle akciğer grafisi, anormal bulgu saptandığında toraks bilgisayarlı tomografisi ve karaciğer fonksiyon testleri yapılmalıdır. Kemik ve beyin metastazları genellikle semptomatiktir. Her hastaya kemik ve beyin metastaz taraması yapılmasına gerek yoktur. Kemik sintigrafisinin alkalen fosfataz yüksekliği ya da kemik ağrıları varlığında yapılması önerilmektedir. Benzer şekilde yeni ortaya çıkan nörolojik ve/veya kognitif fonksiyon bozukluğunda beyin metastaz taraması için beyin BT yapılmalıdır (20).

Perkütan biyopsi ya da aspirasyon endikasyonu görüntüleme yöntemleri sayesinde azalmıştır. Ancak günümüzde minimal invaziv cerrahi tekniklerin yaygınlaşması ile yeniden biyopsi alanına kayış başlamıştır. Böbrek kitlelerinde ince iğne aspirasyon biyopsisi sonucu böbrek hücreli tümör tespit etme oranı %83- 90 arasında değişmektedir. Böylece %5-15'lik bir böbrek hücreli tümör oranı gözden kaçmaktadır (21).

Böbrek hücreli tümörlerdedetavi seçeneği cerrahi olduğu için ancak metastatik kanser, lenfoma, apse, soliter böbrek gibi tedaviyi değiştirecek durumlarda etkili olabilir. Kanama, tümör ekimi, pnömotoraks gibi komplikasyonlar akılda tutulmalıdır (22,23).

2.6. Böbrek tümörlerinde tümör belirleyiciler

2.6.1. Biyomoleküler belirteçler

- Ferritin
- Adiposit farklılaşması ile ilgili protein
- Eritrosit sedimentasyon hızı
- Neopterin
- Nükleer matriks protein-22 (NMP-22)

2.6.2. Hücre siklusuna dayalı tümör belirteçleri

- Siklin A ve siklin D1
- p53
- p21
- Ki-67 (Proliferatif hücre nükleer antijeni)

2.6.3. İmmünojenik özelliğe sahip tümör belirteçleri

- Tümörle ilişkili tripsin inhibitörü
- Doku polipeptid spesifik antijen
- Diferansiyasyon antijenleri
- Tümör spesifik paylaşılan antijen
- Anormal eksprese edilen antijenler

2.6.4. Apoptoza dayalı tümör belirteçleri

- Apoptotik indeks
- Bcl-2
- F7-26

2.6.5. Enzimatik tümör belirteçleri

- Gama-enolaz
- İnducible nitrik oksit (iNOS)
- Timidilat sentaz
- Piruvat kinaz tip M2

2.6.6. “Cluster designating” tabanlı (CD) tümör belirteçleri

- CD10
- CD154
- CD44
- CD95 (AP0-1/Fas)
- CD70

2.6.7. Proteinöz yapıdaki tümör belirteçleri

- Eritropoietin
- Glikoprotein tümör belirteçleri
- Fibrinojen
- Hücresel fibronektin
- Vinkulin
- Ag-NOR proteinleri
- C-reaktifprotein (CRP)
- E-Kaderin
- P-selektin
- Kaderin-6

2.6.8. Malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilen hücre spesifik proteinler

- TuM2-PK
- MUC1
- Prolifere Olan Hücre Nükleer Antijeni

2.6.9. Karyometrik tümör belirteçleri

2.6.10. Sitoloji ve DNA'ya bağlı tümör belirteçleri

- Karbonik anhidraz IX
- Kromozom 3 'ün kısa kolunun kaybı
- PTEN
- Multi drug rezistans genleri (MDR)
- Kromozomal aberasyonlar
- VHL tümör supresör geni
- Proto-onkogen Axl
- Kromozom 14q heterozigosite kaybı
- TAP geni
- p16 Tümör Supresör Geni

2.7. Böbrek tümörlerinde prognostik faktörler

RHK'da 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %70'tir. Prognoz, birkaç klinikopatolojik parametre ile ilişkilidir (24).

1-Cinsiyet ve ırk: Bu faktörler tek başlarına küçük bir prognostik önem taşırlar (24).

2-Yaş: Yaş ve prognoz arasındaki ilişki minimaldir. 40 yaş altı gelişen RHK ile yaşlılarda gelişenler arasında hastalısız sağkalım arasında fark saptanmamıştır (25).

3-Evre: Evre ile hastalısız sağ kalım arasında kuvvetli korelasyon mevcut olup nefrektomiye takiben 5 yıllık sağ kalım oranı evre I'de %60- 80, evre II'de %40-70, evre III'te %10-40, Evre IV'te ise %5 ya da daha azdır (26,27).

4-Uzak metastaz: Operasyon sırasında bilinen uzak metastaz varlığı önemli prognostik parametredir (24).

5-Tümör çapı: Primer tümör çapının prognoz açısından önemli bir belirteç olduğu gösterilmiştir. Nefron koruyucu cerrahinin uygulanmaya başlanmasıyla birlikte T1 eşik değerini yalnız prognostik olarak değil nefron koruyucu cerrahi (NKC) açısından da önemli hale getirdi (26).

6-Renal ven invazyonu: Makroskopik olarak renal ven invazyon varlığı kötü prognoz işareti olarak sayılmış ve cerrahi evrelemede yerini almıştır. Bununla birlikte son zamanlarda bazı serilerde bu faktörün tek başına küçük bir öneme sahip olduğu ya da sadece yüksek gradeli tümörlerde sonuçları etkilediği gösterilmiş, buna karşın ven duvarına mikroskopik ven invazyonunun prognozu belirlemede daha değerli olduğu vurgulanmıştır (26,27).

7-Renal pelvis invazyonu: Prognostik önem taşımaz (27).

8-Mikroskopik grade: Mikroskopik kesitlerde saptanan nükleer derece sağ kalımın önemli bir belirleyicisidir. Derece 1 ve 2 tümörler arasında istatistiksel olarak fark yokken, bu tümörler derece 3 ve 4 olanlara göre daha iyi sağ kalıma sahiptirler. Ayrıca derece 3 tümörler derece 4 olanlara göre daha az sıklıkta metastaz yaparlar (27). Nükleer derece, cerrahi evre ile kuvvetli ilişkili ve istatistiksel olarak ondan bağımsızdır (26). Nükleer dereceleme sistemi konvansiyonel ve papiller RHK'larda prognostik değere sahiptir (28).

9-Histopatolojik subtip varlığı: Berrak sitoplazmaya sahip tümörler granüler sitoplazmaya sahip olanlardan daha az saldırgandırlar. Ancak tümör hücre tipi nükleer derece'den bağımsız değildir. Berrak hücreli tip, mikst hücreli tümörden daha az sıklıkla metastaz yapar. Granüler ve mikst tipte hücreye sahip tümörlerin büyük bir kısmı da yüksek derecelidir (27).

10-Mikroskopik varyantlar: Papiller ve iğsi hücreli görünüm ile birlikte sarkomatoid diferansiyasyon nükleer dereceden bağımsız olarak kötü prognozla ilişkilidir (27).

11-Lenfositik infiltrasyon: Artmış T lenfosit infiltrasyonu ile ileri evre ve patolojik grade arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (27).

12-DNA ploidi: DNA ploidi ile morfolojik nükleer derece arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (26). Erken evre göz önüne alındığında DNA ploidi önem taşımamaktadır.

13-Hücre proliferasyonu: Hücre proliferasyonu (akım sitometrisi veya MIB1 immunohistokimyasal metodu ile belirlenen) ile prognoz arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (26).

14-p53 overekspresyonu: Erken evre RHK'lu hastalarda p53 immunohistokimyasal pozitifliğinin metastatik hastalık ve kötü sağkalım ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir (25).

15-CD44s ekspresyonu: CD44S'in immunohistokimyasal ekspresyonu RHK'un rekürrensi ve progresyonuyla pozitif ilişkilidir (26).

16-Damar dansitesi: Bu tümörlerde tümör içi mikrodamar dansitesinin düzeyi ek prognostik bilgi katkısı sağlamaz (26).

17-MUC1 ekspresyonu: İmmunohistokimyasal olarak saptanabilen bu özellik nükleer grade ve tümör progresyonuyla koreledir (26).

18-İnsulin benzeri büyüme faktoru-1 reseptörü: RHK'lu kadınlar arasında bu molekülün yüksek düzeylerde eksprese edilmesi kötü sağ kalımın göstergesidir (26).

19-Nöral hücre adezyon molekülü: Bu belirleyicinin ekspresyonu düşük sağ kalım oranı ve yüksek metastaz riski ile ilişkilidir (26).

2.8.Böbrek Tümörlerinde Tedavi

2.8.1. Organa Sınırlı Böbrek Tümörlerinde Tedavi

2.8.1.1. Açık Radikal Nefrektomi

RHK'un genetik ve biyolojisi ile ilgili bilgilerimizin artmasına rağmen, bugün hastalığın tedavisinde iki önemli küratif seçenekten biri radikal nefrektomidir (RN). İlk kez bu cerrahi uygulayan ve sınırlarını tanımlayan Robson ve arkadaşları (29)(1969), Evre 1 ve Evre 2 hastalarda sırasıyla %66 ve %64 toplam sağkalım elde etmişler ve bu cerrahi "Altın Standart" olarak kabul etmişlerdir. RN'nin prensibi, renal arter ve venin erken bağlanması, böbreğin gerota dışından çıkartılması, aynı taraf sürrenalın alınması ve diafragma krusundan aort bifurkasyonuna kadar reyonel lenfadenektomi yapılmasıdır. Girişim, böbrekteki kitlenin lokalizasyonu veya büyüklüğüne göre transabdominal, torakoabdominal veya flank insizyon ile gerçekleştirilebilir. Radikal nefrektomi sonrası kansere özgü sağkalım hastalığın evresi ile ilişkilidir ve kansere özgü sağkalım takip eden geniş çaplı serilerde 5. yılda pT1a tümörlerde %97 ve pT1b tümörlerde %87 oranındadır (30).

Zaman içerisinde orijinal tanımlamadan değişen iki husus; surrenalektomi ve lenf nodu diseksiyonu konusudur. Ameliyat öncesi görüntüleme ve evreleme çalışmalarında (BT, MRG) adrenal beze yayılım ile ilgili bulgu saptanmayan hastalarda radikal nefrektomi ile beraber rutin adrenalektominin gerekli olmadığına dair kanıtlar mevcuttur. Buna istisna teşkil eden hasta grupları adrenal beze direk yayılım riski olan büyük üst pol tümörleri ve adrenal beze metastaz riski olan 7 cm'den büyük tümörleri olan hastalardır (28). EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer)' nin (30881) 772 hasta üzerinde yapılan çalışmasının sonuçları 5 yıllık izlem süresinde hastalığın ilerlemesi ve sağkalımda lenfadenektominin bir avantaj sağlamadığı yönündedir (29).

Lenfadenektominin sadece evreleme amacıyla perihiler dokuda sınırlandırılması önerilmektedir. Radyolojik olarak saptanan veya palpe edilen lenf nodu bulunan olgularda lenfadenektomi yapılması önerilmektedir (29,30).

2.8.1.2. Açık nefron koruyucu cerrahi

Böbrek tümörlerinde NKC (nefron koruyucu cerrahi)'yi ilk kez 1890 yılında Czerny tanımlamıştır. Bu konuya olan ilgi; böbrek görüntülemesindeki gelişmelerle, renal vasküler cerrahideki deneyim artması ile, iskemik renal hasarın önlenmesindeki gelişmelerle, düşük evredeki insidental tümörlerin artmasıyla ve bu cerrahi yöntem uygulanan hastaların takiplerinin olumlu seyretmesiyle artmıştır.

NKC, tümörün çıkartılması ve olabilecek en geniş böbrek parankiminin bırakılmasını esas alan bir cerrahidir. Daha önce sadece organa lokalize tümörlerde parsiyel nefrektomi sonrası kansere özgü sağkalım 5. yılda %88.2, 10.yılda ise %73 oranında bildirilmiştir. Evre pT1a tümörlerde ise bu oranlar daha yüksek (sırası ile %98 ve %92) bulunmuştur(31). Nefron koruyucu cerrahi endikasyonları Tablo 5’de gösterilmiştir (32).

Tablo 5. Nefron Koruyucu Cerrahi Endikasyonları

1- Kesin Endikasyonlar

- a) Soliter böbrekteki tümörler
- b) Bilateral tümörler

2- Rölatif Endikasyonlar

- a) Karşı böbrekte hastalık olması
 - Nefrolitiazis
 - Geçirilmiş rekürren piyelonefrit
 - Vezikoureteral reflü
 - Üreteropelvik bileşke darlığı
 - Hafif-orta dereceli böbrek yetmezliği
 - b) Böbrek yetmezliğine yol açabilen hastalık varlığı
 - Hipertansiyon
 - Diabetes Mellitus
 - c) Multifokal hastalık ya da ailesel sendromlar
- #### 3) Elektif Endikasyonlar
- 4 cm'den küçük boyutlu renal kitleler
 - Genç, sağlıklı bireyler
 - Periferik yerleşimli tümörler

2.8.1.3. Laparoskopik radikal nefrektomi

Son on yılda cerrahi teknik, cihaz ve deneyimdeki gelişmeler nedeniyle laparoskopik renal girişimlerin sayısında önemli artışlar olmuştur. Açık RN ile eşit etkinlik ve minimal morbidite Laparoskopik Radikal Nefrektomi'ye (LRN) ilgiyi giderek arttırmaktadır.

İlk kez Clayman 1990'da LRN'yi rapor ettiğinden beri postoperatif ağrının az oluşu, iyileşme süresinin kısalttığı ve hastanede yatış süresinin azalması önemli avantajlar olarak karşımıza çıkmaktadır. LRN düşük hacimli (<8 cm), lokal yayılımı olmayan, renal ven ve lenf nodu tutulumu olmayan olgularda iyi bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Deneyimli laparoskopik ürolojik cerrahlarca açık nefrektominin yukarıda sıralanan prensiplerine bağlı kalınarak uygulanan laparoskopik nefrektomi günümüzde T1-2 BHT hastalarının tedavisinde standart tedavi sayılabilir (28). En önemli tartışma konusu işlem sırasında tümör ekilmesi ve port bölgesinde oluşabilecek tümör nüksüdür. Uzun süreli onkolojik sonuçları açık cerrahi yöntemler ile benzer düzeydedir. Laparoskopik radikal nefrektomi yapılanlarda kansere özgü sağkalımın 10.yılda %92 olduğu bildirilmiştir (33).

2.8.1.4. Laparoskopik Nefron Koruyucu Cerrahi

Renal ven trombüsü olmayan, multifokalite riski taşımayan ve santral intra-renal yerleşimli olmayan tümörlerde uygulama alanı bulabilmektedir. Morbid obezite, daha önceden aynı tarafta geçirilmiş renal cerrahi ve kanama diatezi öyküsü relatif kontrendikasyon olarak bildirilmektedir.

Laparoskopik ve el yardımcı laparoskopik parsiyel nefrektomi sonuçları olumlu olsa da açık parsiyel nefrektomiye oranla artmış komplikasyon oranları göz önünde tutulmalıdır.(34-36). Laparoskopik yaklaşımın dezavantajları açık cerrahiye oranla sıcak iskemik süresinin daha uzun olması ve intraoperatif ve postoperatif komplikasyon oranlarının daha yüksek olmasıdır (37,38).

2.8.1.5. Minimal Invaziv Tedaviler

Perkütan radyofrekans ablasyon, kriyoablasyon, mikrodalga ablasyon, lazer ablasyon ve high-intensity focused ultrasound gibi görüntüleme eşliğinde perkütan ve minimal girişimsel teknikler BHT'lerin cerrahi tedavisinde alternatif yöntemler olarak ortaya çıkmıştır. Halen araştırma aşamasında bulunan tedavi yöntemleridir. Minimal invaziv tedaviler için en uygun adaylar parsiyel nefrektomi için yüksek risk taşıyan önemli komorbid faktörlere sahip ileri yaşlardaki hastalardır (39). Bunun yanı sıra çok sayıda ve bilateral renal kitlelerin bulunduğu herediter böbrek tümörlüleri ve parsiyel nefrektomi sonrası lokal rekürrens gelişenler için de düşünülebilir (40). Açık veya laparoskopik cerrahi veya perkütan yolla uygulanabilmektedir. Uygulama öncesi histolojik kanıt için renal kitleden biyopsi önerilmektedir. Cerrahi eksizyona göre daha yüksek lokal rekürrens riski olduğu için tedavi sonrası uzun süreli yakın radyolojik takip yapılmalıdır ve rekürrensten şüphe edildiğinde biyopsi tekrarlanmalıdır.

Termal ablasyon sonrası rekürrens oranları cerrahi eksizyon yapılanlara göre daha yüksektir. Kriyoablasyon sonrası rekürrens oranı %7.4 ve radyofrekans ablasyon sonrası %25 gibi oldukça yüksek orandadır (41).

2.8.2.Lokal ileri evre böbrek tümörlerinde tedavi

Böbrek hücreli tümörlerin damarlanmalarının fazla olması nedeniyle venöz sisteme invazyon yetenekleri de fazladır. Renal ven ve vena kava kavada tümör trombusu ile karşılaşma oranı %4 ile %10 arasında değişmektedir (42). Vena kava tutulumu klinik olarak; alt ekstremitede ödem, kollabe olmayan varikozel, dilate yüzeysel abdominal venler, proteinüri, pulmoner emboli, sağ atrial kitle ya da o taraf böbreğin fonksiyonsuz olması ile kendini gösterir. Preoperatif rutin metastaz taramasının dışında tümör trombusunun ven içerisinde ne kadar ilerlediğini göstermek adına kullanılacak en iyi görüntüleme yöntemi bugün için MRG'dir (1). Trombektomi cerrahisi günümüzde sıklıkla tercih edilen ve metastazın bulunmadığı böbrek tümörlerinde prognoza etkili olduğu gösterilmiş tedavi şeklidir (43).

Lokal invazyon durumlarında ise invaze organ ile birlikte tümörlü böbreğin çıkarılması ilk seçenek olmalıdır. Karaciğer invazyonlarında parsiyel hepatektomi nadiren faydalıdır. Böbrek hücreli tümörlerde lokal rekürrens nadiren görülen bir durumdur. Hastalığın evresi ile ilişkili olmakla birlikte çeşitli kaynaklarda sıklık %2 ile %4 arasında değişmektedir (44,45). Tedavide ilk seçenek cerrahi olmalıdır.

2.8.3.Metastatik Böbrek Tümörlerinde Tedavi

2.8.3.1. Cerrahi

Metastatik olgularda nefrektomi sonrası metastazları gerileyen hastalar bildirildiğinden, bugün için kabul gören görüş bu olgularda da nefrektomi yapılması yönündedir (46). Spontan remisyonlar görülse de bunun oranı %1'i geçmemektedir. Bunun yanında tek metastazı olanlar da ayrı bir grubu oluşturmaktadır. Bu grup hastalarda nefrektomi ile birlikte bu metastatik odağın çıkarılması durumunda bu hastaların da metastazı olmayan aynı evredeki tümörlü hastalar kadar yaşayabileceği belirtilmektedir. Southwest Oncology Group (SWOG) (47) ve EORTC (48) Genito-üriner grup tarafından toplam 331 metastatik RHK olgusunda sitoredüktif nefrektomi ile birlikte interferon- α verilmesi ile yalnızca interferon- α verilmesi karşılaştırılmış, median sağkalım ilk grupta 13.6 ay, ikinci grupta ise 7.8 ay olarak saptanmıştır (p=0.002). Sonuç olarak, özellikle iyi performansı olan olgularda nefrektomi yapılması sağkalımı olumlu yönde etkilemektedir.

Metastatik renal hücreli karsinomda da soliter uzak organ metastazı %1,6-3,2 sıklıkta görülür . Eş zamanlı metastatik yayılım olan hastalarda, hastalığın rezeksiyona uygun ve hastanın performans statüsünün iyi olması durumunda metastatektomi uygulanmalıdır. Primer hastalıkla farklı zamanlı metastazlar için ameliyat olan hastalarda klinik prognoz daha kötüdür. İmmünoterapiye cevap vermiş rezidüel ve rezeksiyona uygun metastatik lezyonlarda ve/veya sınırlı (tek lezyon) sayıda farklı zamanlı metastazlarda prognozu iyileştirmek amacıyla metastatektomi uygulanmalıdır (49).

2.8.3.2. Radyoterapi

Semptomatik kemik metastazlarının tedavisinde ve steroidlerle düzeltilmeyen şiddetli nörolojik bozukluklara yol açan beyin metastazlarının ve cerrahi müdahalenin mümkün olmadığı kemik metastazlarının tedavisinde yararlı olabilmektedir (50).

2.8.3.3. Kemoterapi

RHK hastalarının yaklaşık üçte biri tanı esnasında metastatik hastalığa sahiptir. Standart sitotoksik ilaçlar RHK' da etkisizdir. Bu duruma Multi Drug Rezistans (MDR) denir. Bir çok böbrek kanserinde MDR proteinlerinin ekspresyonu artmaktadır (51).

Bir transmembran protein olan P-glikoprotein sitotoksik ilaçların hücre içinde birikmesini engellemesi, Glutasyon redoks siklusu ile ilaçların detoksifiye edilmesi ve nükleer enzim olan topoizomerez-II genindeki mutasyon sonucu bu gene etkili ilaçların yetersiz kalması MDR'da rol oynamaktadır (52).

En iyi kemoterapi cevapları floksüridin ve 5-florourasil ile elde edilen cevaplar %15'ler civarında kalmıştır. İmmünoterapi ajanlarıyla kısmi bir etki artışı sağlanabilmektedir (53).

2.8.3.4. İmmünoterapi

İmmünoterapi baskılanmış immün sistemin canlandırılması veya duyarlılaştırılmış hücrelerin konakçıya geri verilmesi şeklinde uygulanabilmektedir. Sitokinlerin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. İntraselüler ve interselüler sinyal mekanizmasını başlatarak kanser hücrelerini indirekt olarak etki ettikleri düşünülmektedir.

Bu grupta en sık kullanılan ajanlardan olan interferon-alfa (IFN-alfa) ile iyi performans statüsü, ilk tanı anından sonra 1 yıldan uzun progresyonsuz sağ kalım ve tercihen sadece akciğer metastazı olan hastalar faydalanmaktadır.

IFN-alfa ile %6-15 cevap oranı, %25 tümör ilerlemesi riskinde azalma ve plasebo ile karşılaştırıldığında sadece 3-5 aylık sağ kalım avantajı elde edilebilmiştir (54,55). Yan etkileri IFN-alfa'dan daha fazla olan interlökin-2 (IL-2) ise separe dozlarla ayaktan veya devamlı infüzyonla hastane ortamında kullanılabilir. Ancak ciddi pulmoner hipertansiyona yolaçabilen IL-2'nin metastatik böbrek hücreli tümör tedavisinde IFN-alfa'ya üstünlüğü gösterilememiştir. Kombinasyon tedavilerinin sağkalımı monoterapi rejimlerine göre arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilememiştir (56).

2.8.3.5. Anjiogenez inhibitörü ilaçlar

Son yıllarda moleküler biyoloji alanında gerçekleşen büyük adımlar ile böbrek tümörü tedavisinde de önemli ilerlemeler gerçekleşmiştir. Böbrek hücreli tümörler damarlanması oldukça fazla olan tümörlerdir. Özellikle berrak hücreli histolojiye sahip RHK'lularda VEGF'ye ait mRNA ekspresyonunun vaskülarizasyonla korelasyon gösterdiği bulunmuştur. VEGF ekspresyonu artışının ise sporadik berrak hücreli tümörlerin %75'inden fazlasında bulunan Von Hippel Lindau (VHL) geni mutasyonlan ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. VHL geni bir tümör süpresör gendir ve normoksik koşullar altında hipoksiyle tetiklenen faktör-1 α (HIF-1 α) ile bağlanarak kompleks oluşturan VHL tümör süpresör proteininin (pVHL) oluşumundan sorumludur. Bu kompleks hücre içinde kısa sürede proteozomlara yıkılır. Hipoksik koşullarda veya pVHL fonksiyonunda defekt veya mutasyon olduğunda HIF-1 α birikimi gerçekleşir. Sonuçta da nukleus içinde HIF-1 α translokasyonu ile birçok hipoksi ile tetiklenen gen aktive olarak, VEGF, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), eritropoetin ve transforming growth factor- a (TGF- a) gibi büyüme faktörleri salgılanır. HIF-1 α birikimi ayrıca birçok membran proteinin aktive olmasına yol açar. Bunlardan bir tanesi G250 membran proteini olarak da adlandırılan bir karbonik anhidraz izo-enzimidir (CAIX). Salgılanan VEGF ve PDGF kendilerine ait spesifik reseptörlere bağlanırlar ve bu da hücre içinde tirozin kinaz (TK) reseptörlerinin stimülasyonu ile sonuçlanır. TK reseptörlerinin stimülasyonu da endotelial hücre çoğalması, hücre sağ kalımının artması, anjiyogenezde artış ve tipik hipervasküler berrak hücreli RHK histolojisi ile sonuçlanmaktadır (57-59).

Sorafenib bir oral multikinaz inhibitörüdür ve Raf-1, serin/treonin kinaz, BRaf, VEBFR-2, PDBF, FLT-3 ve cKIT'e karşı aktivitesi vardır. Daha önce sistemik immünoterapi alan hastalarda sorafenibi plaseboyla karşılaştıran bir faz III çalışmada progresyonsuz sağkalımda sorafenib tedavisi lehine 3 aylık sağkalım avantajı bildirilmiştir (60).

Sunitinib bir oksindol tirozin kinaz (TK) inhibitörüdür. Anti tümör ve antianjiyogenetik aktivitesi olan bir küçük molekül olup seçici olarak PDBFR, VEBFR, KIT ve FLT'nin inhibisyonunu hedefler. Sunitinibin mBUK'da ikincil monoterapi ajanı olarak kullanıldığı 2 çok merkezli faz II çalışmada %34-40 kısmi yanıt oranı belirlenmiş ve hastaların %27-29'unda 3 ay veya daha fazla progresyonsuz hastalık bildirilmiştir (61). Sunitinibin birinci basamak monoterapisinin IFN-alfa ile karşılaştırıldığı bir faz III çalışma sonuçları yakın zamanda yayınlanmıştır. Ortanca progresyonsuz sağkalım sunitinib ile tedavi edilen hastalarda 11 ay, İFN-alfa grubunda ise 5 ay ($p<0,000001$) olarak belirlenmesi nedeniyle düşük-orta risk grubu mBHK hastalarında İFN-alfa'nın sunitinibe göre daha az etkili olduğu kanısına varılmıştır (62). Temsirolimus rapamisin (mTOR) için özgün inhibitördür. Temsirolimusu IFN-alfa ve bu ikisinin kombine kullanımının ilerlemiş BHT'de birinci basamak tedavi olarak karşılaştırıldığı bir faz III çalışmaya göre temsirolimus monoterapisinin kötü risk grubu hastalarda genel sağ kalımı IFN-alfa monoterapi si ve IFN-alfa temsirolimus kombinasyonuna göre uzattığı gösterilmiştir (63).

2.9.Renal Hücreli Karsinomda Karsinogenezis

2.9.1. Familial Renal Hücreli Karsinom ve Moleküler Genetik

1990'lerden bu yana RHK 'un moleküler genetiği ile ilgili önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu konuda yeni familial sendromlar olduğu gibi ;bu malignitenin sporadik ve familial formları ile ilgilil süpresör genler ve onkogenler tanımlanmıştır (64). Genetikle ilgili gelişmeler bugün RHK yeni subtiplerinin bulunmasını sağlamıştır.

2.9.1.1. Von Hippel_Lindau Hastalığı, Von Hippel Lindau Geni ve Şeffaf Hücreli karsinomun genetiği

RHK 'un en sık varyantı olan şeffaf hücreli karsinomun en sık görülen familial formu Von Hippel Lindau hastalığıdır. VHL genini 3 ekspresyonu vardır ve 213 aminoasitli bir proteini kodlar. Bu gen üzerindeki çok sayıda mutasyon yada sıcak nokta bulunmuştur ve bazı vakalarda genotip ve fenotip arasında direk bir korelasyon saptanmıştır (64). Diğer birçok tümör supresör gen gibi hastalığın gelişmesi için VHL geninin iki alelininin de mutasyona uğraması gerekmektedir. VHL geninin mutasyonu ya da inaktivasyonu hipoksi açlık ve diğer streslere olan hücresel cevabın düzenlenmesinde rol oynayan HIF I'in düzensiz ekspresyonuna yol açmaktadır. Bu da sonraki aşamada RHK'daki neovaskülariteye katkıda bulunan primer proanjiogenik bir büyüme faktörü olan VEGF ekspresyonu ile neticelenmektedir (65).

RHK gelişmesinde rol oynayan diğer genetik elemanlar p53 tümör süpresör geni ve 3.kromozomun kısa kolu üzerindeki ekstra lokustur.

2.9.2. Familial papiller RHK ve Genetiği

Papiller RHK RHK ikinci sıklıkta görülen subtipidir. Bu tip kromozom 7 ve 17 de trizomi ve kromozom 1,16 ve Y deki anormalliklerle karakterizedir. Çalışmalar Familial Papiller RHK'lu ailelerde otozomal dominant bir geçiş göstermişler (66).

2.9.3.Tümör Biyolojisi ve Klinik Etkileri

İmmünobiyoloji ve İmmün Tolerans

Renal hücreli karsinomunda yapılan moleküler genetik çalışmalarda, tümörden; RHK PRAME ,REGE-1,gp75 ve MN -9 gibi antijenlerin eksprese edildiği ve dolayısıyla RHK'un immunojenik bir tümör olduğunu göstermiştir.Bu bağlamda, ileri evre hastalıkta daha iyi sonuçlar edilebilmek için immün sistemi harekete geçirme çabaları da yoğunlaşmıştır (66).

Angiogenezis

Vasküler açıdan zengin bir tümör olan RHK'da bu durumdan sorumlu esas faktör VEGF'dir.Anjiyogenez, proanjiyogenik ve anti anjiyogenik etmenler tarafından kontrol edilir (67). RHK hastalarında anjiyogenez artışı dolaşımdaki artmış endostatinlerle de ilişkilidir (68).

Büyüme Faktörleri ve Hücre Siklusu Düzenlenmesi

PCNA ya da Ki-67 olarak tanımlanan proliferatif indeks, RHK'daki patolojik parametreler ve klinik sonuçlarla pozitif koreledir. TGF alfa ve onun reseptörü olan tiroin kinazın ve epidermal growth faktör reseptörünün (EGFR) fazla ekspresyonu RHK da gösterilmiştir. Ve bu;hücre proliferasyonunu aktive etmek yada otokrin mekanizma ile transformasyon yoluyla tümörigenezise katkıda bulunduğunun göstergesidir.Hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve onun reseptörü olan MET protoonkogeni de RHK patogeneziye katkıda bulunan bir diğer büyüme faktörüdür (70). Ancak bu veriyi destekleyen diğer çalışmada reseptör aktivasyonunun papiller RHK'da sınırlı olduğunu düşündürmüştür (70).

Proteaz Adezyon ve Ekstraselüler Matris

E-katerin ve katerin 6 gibi kanser hücreleri arasında adezyonu ayarlayan enzimlerin düşük regülasyonu RHK larda net olarak gösterilmiştir ve kötü prognoz belirtisidir (71).

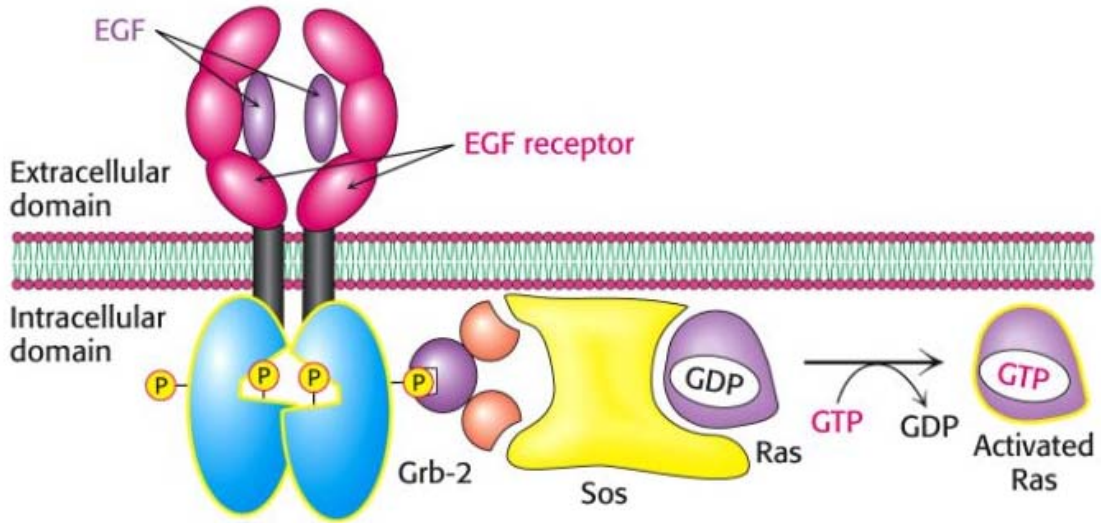
Egfr Geni

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) epidermal büyüme faktörü ailesinin üyelerinin etki ettiği hücre zarında bulunan reseptör EGF reseptörü, reseptörlerin ErbB ailesine mensuptur. Reseptöre ligand bağlanmasıyla reseptörün intrasellüler kısmı aktive olur. Takiben tirozin kinaz aktivasyonu gerçekleşir. Bu sinyal sonucu RAS aktivasyonu ile birlikte hücre bölünme, migrasyon ve diferansiyasyon başlar (72). EGFR ekspresyonu veya aktivitesini etkileyen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilir.

Kras Onkogeni

Ras protoonkogenleri, normal hücre gelişimi ve farklılaşmasında G proteinleri olarak görev yaparlar. Hücre membranındaki büyüme faktörü reseptörlerinden gelen sinyallerin iletiminde rol oynarlar. Çeşitli büyüme sinyalleri p21 Ras aktivasyonunu başlatır. Bu sinyal iletimi için gerekli bir basamaktır.

Kodon 12, 13 veya 61'deki mutasyonlar; Ras proto onkogenlerinin onkogenlere dönüşmesine neden olur ve bu otonom hücre büyümesi ve çoğalmasıyla sonuçlanır (73). Bu durum bazı dokularda (kalın barsak, pankreas ve akciğer başta olmak üzere) diğer gen değişikliklerinin de olduğu şartlarda kanser hücrelerinin oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 1).



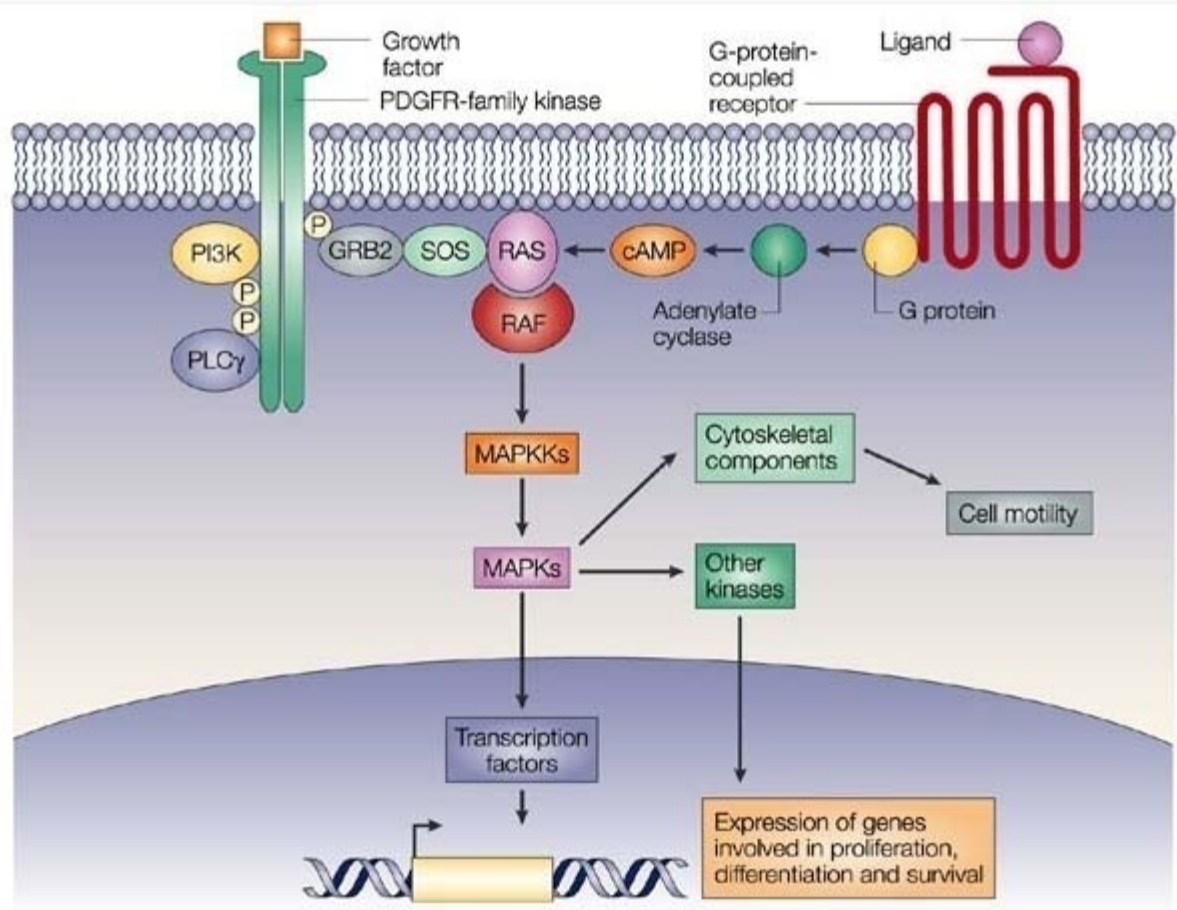
Şekil 1. EGFR reseptörü uyarılması ile RAS aktivasyonu

Kanser tedavisinde hücre içi sinyal iletiminin Kras proteini öncesindeki aşamalarını durduran ilaçların kullanılması, mutasyonlu Kras genini taşıyan ve Kras aktivasyonu çok güçlü olan hücrelerde yeterli cevabı sağlayamamakta ve bu hastaların klinik olarak bu tür kanser ilaçlarından yararlanmasına engel olmaktadır.

EGFR hücre reseptörünü hedef alan Cetuximab (Erbix) ve Panitumumab (Vectibix) kemoterapi ilaçlarının kullanılmadan önce kanser dokusunda yapılan genetik test ile Kras geninin mutasyonlu olup olmadığı araştırılmalıdır. Kras geni mutasyonu saptanmayan hastalarda yukarıdaki ilaçların kullanılmasıyla klinik cevap alınacaktır (74).

Braf Geni

Braf, RAF gen ailesindedir ve 7. kromozomun uzun kolunda lokalizedir (7q34). Braf geni MAPK sinyal yolunda görevli ve serin/treonin kinaz aktivitesi olan bir M protein kodlar. Braf geninde meydana gelen çeşitli mutasyonların MAPK sinyal yolunun aktivitesini artırarak, çekirdek içi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile hücre çoğalmasına neden olduğu düşünülmektedir (75) (Şekil 2).



Şekil 2. Karsinogeneziste Kras ve Braf genlerinin rolü

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta seçimi

Çalışma öncesi Gaziantep Üniversitesi Etik Kurul onayı alındı. Çalışmamız aynı zamanda “Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri” kapsamında desteklenmiştir. Çalışmaya Haziran 2009-Haziran 2011 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı’nda böbrek tümörü ön tanısıyla radikal nefrektomi veya parsiyel nefrektomi yapılan 48 hasta seçildi. 13 hastanın patoloji sonucu renal hücreli karsinom dışı patoloji gelmesi üzerine çalışma dışı bırakıldı.

Radikal nefrektomi spesmenlerinden normal doku ve kanserli dokudan örneklemeler yapıldı. Patoloji sonucu benign ve üretelyal karsinom gelen hastalar çalışma dışı bırakıldı. Alınan örneklemeler DNA izolasyonları ve DNA dizi analizleri yapılmak üzere muhafaza edildi. DNA izolasyon işleminden sonra bu dokulardan genomik DNA eldesi gerçekleştirildi. Elde edilen DNA’lardan ABI-3130 DNA dizi analizi cihazı kullanılarak erime mutasyon tanımlanması yapıldı. Çalışma sonucu elde edilen sonuçlar Ki-kare anlamlılık testi ve Mann-Whitney testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2. Klinik Değerlendirme

Tüm hastaların klinik protokol numaraları, cinsiyet, yaş, meslek, semptom bulunup bulunmadığı, vücut kitle indeksi, sigara, bağımlılık yaratan madde kullanım öyküsü, ek hastalık öyküsü, özgeçmiş ve soy geçmişte kanser öyküsü, ailede böbrek kanseri öyküsü sorgulanarak kayıt altına alındı. Ayrıca preoperatif dönemde tüm hastalarda posteroanterior akciğer grafisi, üre-kreatinin değerleri, karaciğer fonksiyon testleri ve hemogram tetkikleri yapılarak kayıt altına alındı. Hasta grubuna preop evreleme amacı ile ek olarak tüm abdomen BT, gerekli görülen hastalarda Toraks BT yapıldı.

3.3. Patolojik değerlendirme

Çalışmaya dâhil edilen tüm hastaların böbrek spesmenleri öncelikle mikroskopik olarak primer tümör boyutu ve evresi açısından incelendi. Daha sonra spesmenler 3 mm'lik aralıklarla ince kesitler yapılarak incelendiler. Tümörlerin histolojik sınıflaması Union Internationale Contra le Cancer (UICC) ve American Joint Committee on Cancer (AJCC)'e göre, tümör nükleer derecelendirmesi ise Fuhrman dereceleme sistemine göre yapıldı. Çalışma kapsamına alınan 35 hastanın spesmenleri incelendiğinde Fuhrman dereceleme sistemine göre 3 hasta (%8) derece 1, 15 hasta (%43) derece 2 ve 17 hasta (%49) derece 3 olarak değerlendirildi.

3.4. Genetik değerlendirme

3.4.1 Örneklerin toplanması

Nefrektomi spesmenlerinden normal doku ve kanserli dokudan preparatlar hazırlandı. Preparatlar -80 derecede DNA izolasyonları yapılamak üzere azot tankında saklamaya bırakıldı.

3.4.2 örneklerden DNA izolasyonu

Bu çalışmada DNA izolasyonu için Roch High Pure PCR Template Preparation Kit kullanıldı. Çalışma üretici firmanın tavsiyelerine göre yapılmıştır. -80°C'de bulunan böbrek dokuları dondurucudan çıkartılarak 30-50 mg olacak şekilde küçük parçalara ayrıldı. Dokuların üzerine 200 ml Tissue Lysis Buffer eklenerek Qagen Tissue Lyser LT homojenizatör cihazı ile dokular homojenize hale getirildi. 40 ml Proteinaz K eklenerek 55°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından 200 µl Binding Buffer eklenerek 70 de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

Tüplere 100 µl isopropanol eklenerek filtreli tüplere alındı. 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. 500 µl İnhibitör Removal Buffer eklenerek 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. 500 µl Wash Buffer eklenerek 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. 200 µl Elution Buffer eklenerek tekrar 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı ve tüpün alt kısmında biriken DNA örnekleri saklanmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

3.4.3 Örneklerden DNA dizi analizi

DNA nükleotid dizileme işlemi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkezi Laboratuvarı Moleküler Tanı Birimi'nde ABI 3130 DNA Dizi Analiz Cihazı ile gerçekleştirildi. EGFR, Braf, Kras genine özgün primerler kullanılarak hedef bölge PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı. Elde edilen ürün agaroz jel elektroforezi yapılarak görüntülendi. Uygun büyüklükteki PCR (Polymerase Chain Reaction) ürünü varlığı tespit edildikten sonra sekans PCR'ı yapıldı. Dizi Analizi için, ABI Prism Big Dye, AmpliTaq DNA polimeraz enzimi, K-ras primerleri kullanıldı. DNA dizi analizi için hazırlanan PCR karışımı Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Otomatik DNA dizileme için hazırlanan PCR karışımı oranları

Kullanılan Reaktifler	Kullanılan Hacim
Big Dye Cyle Sequencing V3.1 Kit	2 µl
5x Dizileme Tamponu	2 µl
İleri yada geri primer	2 µl
Örnek DNA	2 µl
Su	2 µl
Toplam Hacim	10 µl

Hazırlanan PCR karışımı, 96 derecede 1 dakika bekletildi. Daha sonra, 96 derecede 10 saniye, 50 derecede 5 saniye ve 60 derecede 4 dakikadan oluşan 25 döngü ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve örnekler cihaza yüklenene kadar +4 derecede bekletildi. Otomatik DNA dizilemesinde, PCR ürünleri Sephadex'ten geçirilip temizlendikten sonra cihaza yüklendi. Bu amaçla 1 gr Sephadex 14 ml saf su içerisinde çözüldü ve kolonlara 600 µl olacak şekilde dağıtıldı. 2000xg'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra Sephadex'li kolonlar başka bir tüpe alındı ve 10 µl PCR ürünü Sephadex üzerine bırakıldı. Santrifüj işlemi 2000xg'de 2 dakika olarak gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası alttaki tüpe geçen ürünlerin DNA dizilemesi yapıldı. Otomatik DNA dizileme sistemi, Sanger'in DNA dizi sonlandırma yöntemine göre çalışmaktadır. DNA dizi analizinde kullanılan ddNTP'lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmişlerdir ve çoğaltılan DNA parçacıkları, kılcal borucuklara yüklenen "jel matris" içerisinde yürütülerek floresan boyaları otomatik olarak algılayan bir algılayıcıya yönlendirilmekte ve burada tanımlanmaktadır.

4. BULGULAR

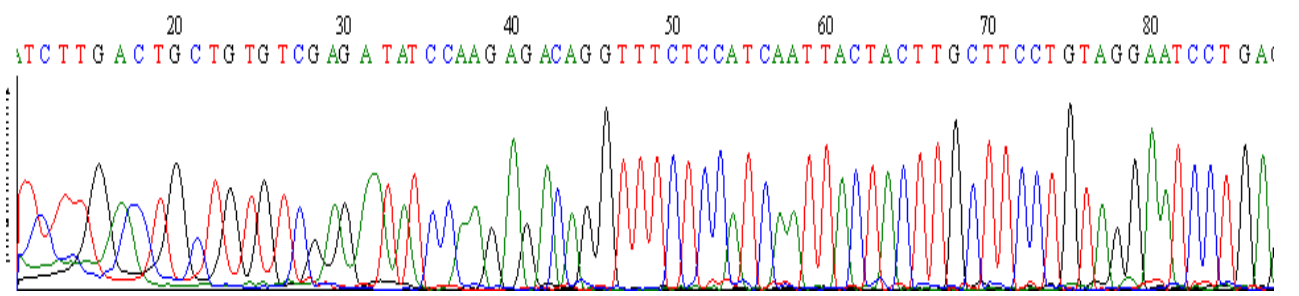
Renal hücreli karsinom dokusunda EGFR, Braf ve Kras gen mutasyonlarının DNA dizi analizi yöntemleri ile tespitinin yapılması amaçlı çalışmamıza böbrek tümörü ön tanısı ile 48 hasta dâhil edildi. Bu hastalardan 13'ünde patoloji sonucunun renal hücreli karsinom dışı patoloji gelmesi üzerine çalışma dışı bırakıldı.

Çalışmaya dahil edilen 35 hastanın 19'i erkek, 16'si kadın olup yaş ortalaması 59.3 (yaş aralığı 15-77) yıl olarak belirlendi. Çalışmaya dahil edilen 35 hasta histopatolojik olarak UICC ve AJCC sınıflandırma sistemi ile incelendiğinde 17(%48) hastada şeffaf hücreli RHK, 7(%20) hastada kromofob hücreli RHK, 11 (%32) hastada papiller tip RHK. Hastaların 27'sine(%77) açık radikal nefrektomi, 7'sine (%20) ise laparoskopik radikal nefrektomi, 1'ine(%3) laparoskopik parsiyel nefrektomi yapıldı. Tümörlerin 2009 TNM evrelemesine göre dağılımı incelendiğinde sırasıyla 11 (%31) hastada T1a, 8 (%23) hastada T1b, 3 (%8) hastada T2, 9 (%26) hastada T3a, 4 (%12) hastada T3b saptandı. Hastaların 23'i (%65) N0, 8'i (%23) N1, 4'ü (%12) ise N2 olarak değerlendirildi. Radikal nefrektomi preparatları kanserli doku ve normal doku olarak saklandı.

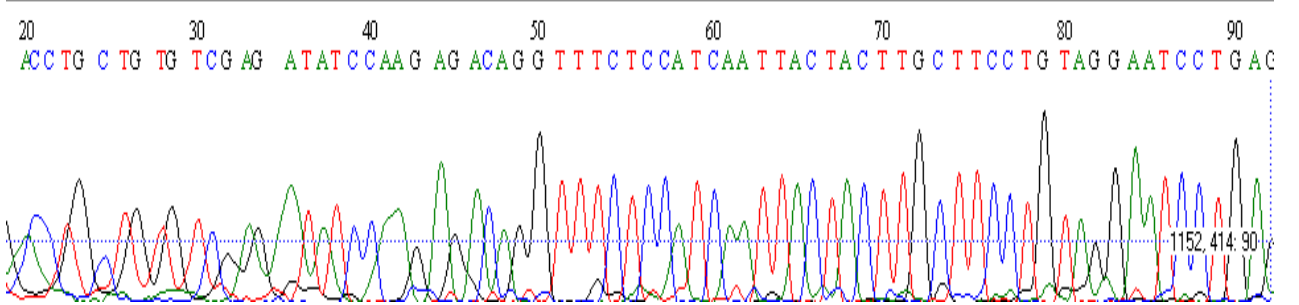
DNA izolasyonu yapıldıktan sonra EGFR, Braf, Kras genine özgün primerler kullanılarak hedef bölge PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı. DNA Dizi Analiz Cihazı ile gerçekleştirildi. Uygun büyüklükteki PCR ürünü varlığı tespit edildikten sonra sekans PCR'ı yapıldı. Dizi Analizi için, ABI Prism Big Dye, AmpliTaq DNA polimeraz enzimi, Kras primerleri kullanıldı. Aşağıdaki DNA dizi analizi sonuçlarına göre yapılan çalışma sonucu incelenen kanserli preparatlarda ve hastaların normal dokusunda EGFR, Braf ve Kras yolağı üzerinde taranan eksonların hiçbirinde mutasyon saptanmamıştır (Şekil 3-8).

Şekil 3. Örnek Dokuda Kras 13 Nolu Kodonu Görünümü

27 Nolu Örnek Tümör Antisens

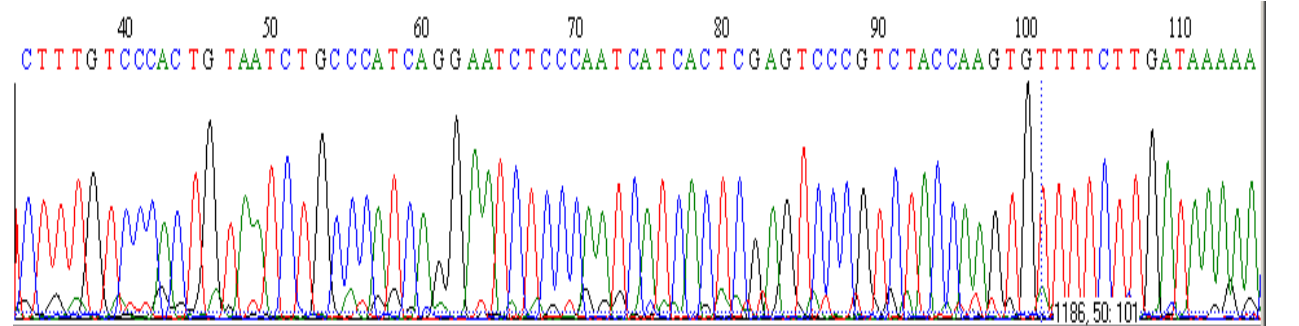


27 Nolu Örnek Normal Doku Antisens

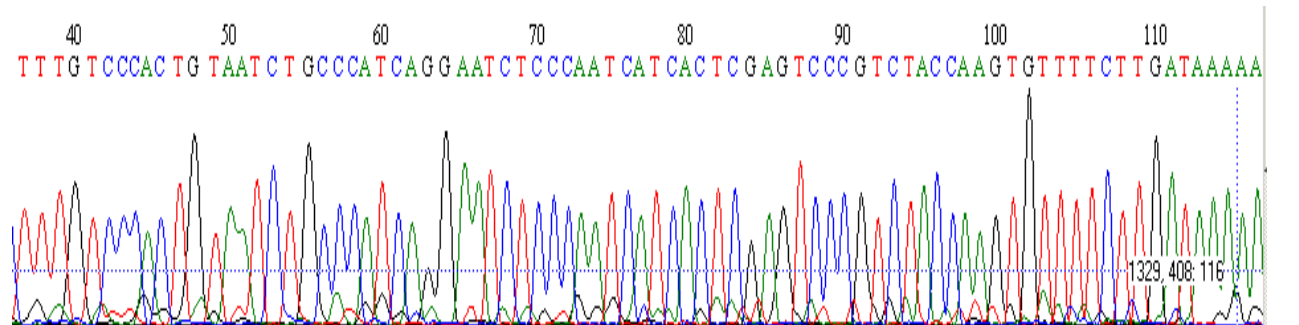


Şekil 4. Örnek Dokuda Braf 11no'lu Ekson Görünümü

2 Nolu Örnek Normal Dolu Sens

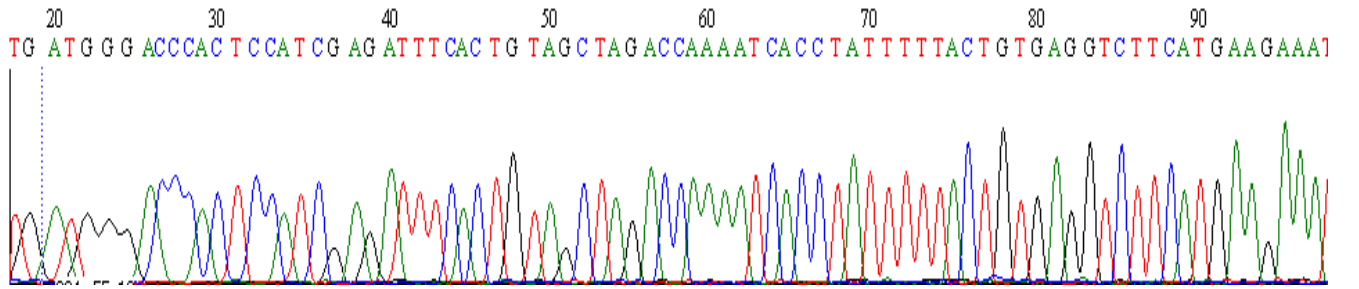


2 Nolu Örnek Tümör Sens

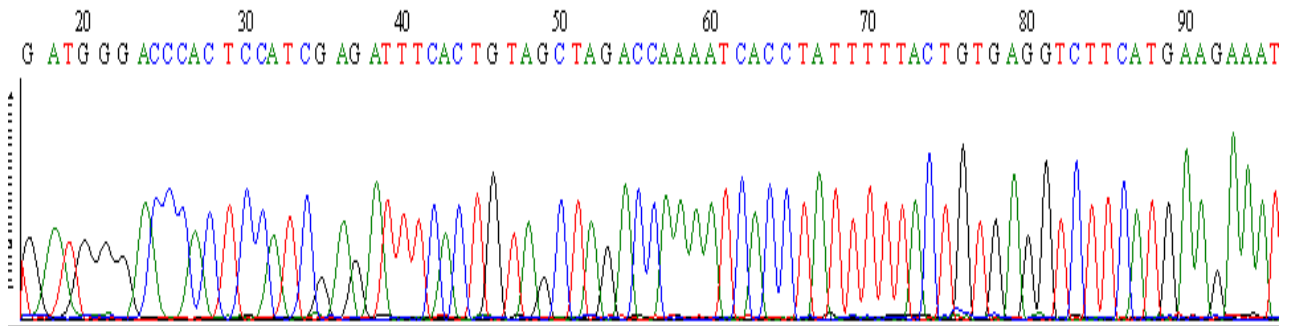


Şekil 5. Örnek Dokuda Braf 15 Nolu Ekson Görünümü

Örnek 4 Normal Sens

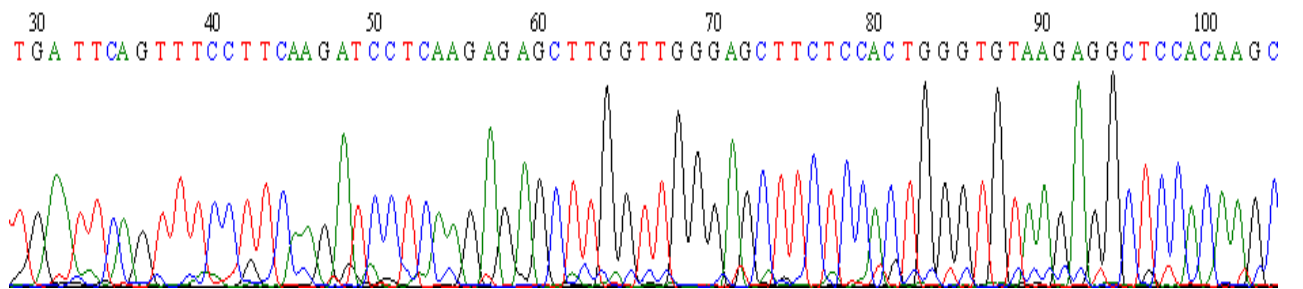


Örnek 4 Tümör Sens

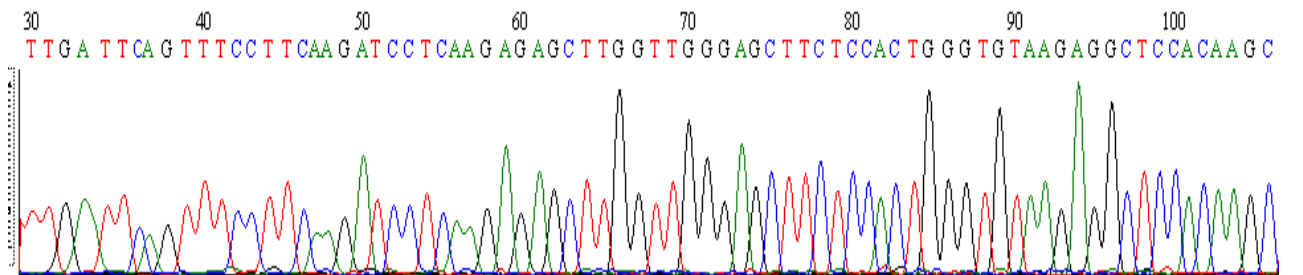


Şekil 6. Örnek Dokuda Egfr 18 No'lu Ekson Görünümü

Örnek 1 Normal Sens

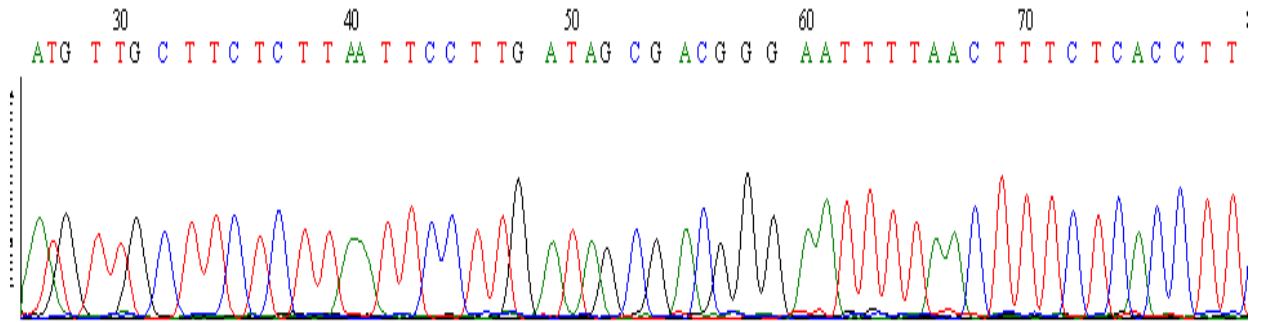


Örnek 1 Tümör Sens

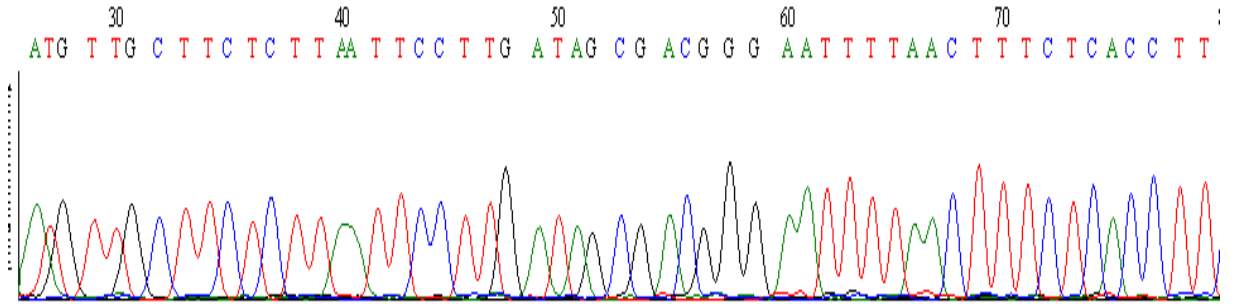


Şekil 7. Örnek Dokuda Egfr 19 Nolu Ekson Görünümü

Ekson 7 Nolu Normal Sens

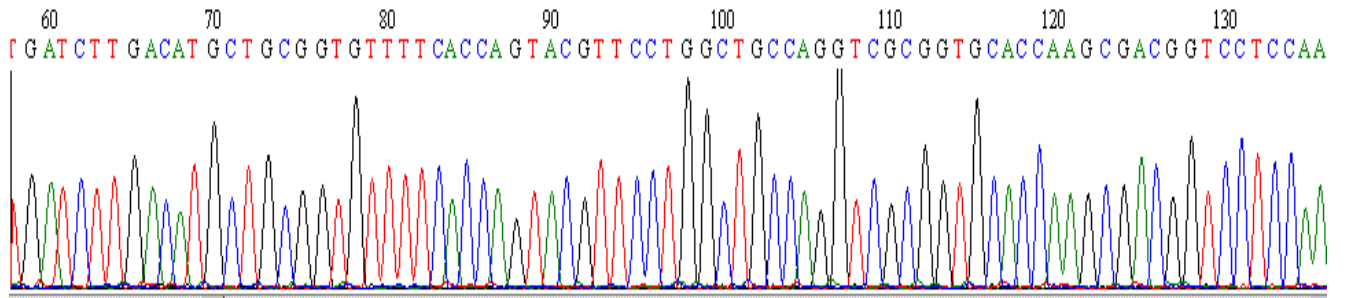


Ekson 7 Tümör Sens



Şekil 8. Örnek Dokuda EGFR 21 No'lu Görünümü

34 Nolu Örnek Normal Sens



34 Nolu Örnek Tümör Sens

5. TARTIŞMA

Son yıllarda sadece üroloji alanında değil, diğer tüm kanser türlerinin etiyopatogenezini anlamak ve doğrultuda ilaç geliştirme çabaları doğrultusunda moleküler genetik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Böbrek tümörlerinin konvansiyonel kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olması, sitokin tedavilerinin de yüz güldürücü sonuçlar sağlamaması ve ciddi yan etkileri nedeniyle bu alandaki çalışmalar neredeyse tamamen hedefe yönelik tedaviler- anjiogenez inhibitörleri alanına kaymıştır. Bu alanın dışında ikinci yol da tümör aşılı olmaktadır ancak o alanda rutine girmiş bir uygulama henüz yoktur.

Çalışmamızda araştırılan 3 gen loküsünden Kras ve Braf protoonkogen, EGFR ise sadece RHK ile değil diğer pek çok kanser türünde yüksek tespit edilmiş büyüme faktörünün reseptörünü kodlayan genlerdir.

Braf, RAF gen ailesindedir ve 7. kromozomun uzun kolunda lokalizedir (7q34). Görevi; hücre çekirdeği ile ilişkili MAPK sinyal yolağında görev alır çekirdekteki birtakım transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Dolayısıyla artmış ekspresyonu veya mutasyona uğraması neticesinde anormal hücre çoğalması tetiklenmektedir (75).

Kras ise Braf'ın aksine çekirdek membranında değil, hücre membranında yer alır, RAS ailesine mensup olup esas görevi hücreye dışarıdan gelen büyüme faktörlerinin iletiminde sorumludur. Mutasyonu neticesinde de hücreye anormal büyüme sinyalleri girişi oluşmaktadır (73).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olup karsinogenezis boyunca genel olarak hücre proliferasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. EGFR de Kras gibi hücre membran yerleşimli olup EGF'den gelen uyarıların hücre içine iletilmesinden sorumlu erb ailesine mensup bir proteindir. Sinyal ileti yolağında devamında RAS ailesi ile birlikte çalışmaya başlar (72). Dolayısıyla bir membran, bir de sitoplazmik komponenti vardır. Plazma zarından sinyal geçişinin düzenlenmesinde görev yapan RAS gen ailesinin üyesi olan K-ras proto-onkogeni nokta mutasyonları karsinogeneziste önemli rol oynamaktadır. K-ras mutasyonları pankreas, akciğer, kolon ve mide kanserinde yaygındır.

Kanser tedavisinde hücre içi sinyal iletiminin Kras proteini öncesindeki aşamalarını durduran ilaçların kullanılması, mutasyonlu Kras genini taşıyan ve Kras aktivasyonu çok güçlü olan hücrelerde yeterli cevabı sağlayamamakta ve bu hastaların klinik olarak bu tür kanser ilaçlarından yararlanmasına engel olmaktadır. (74)

2008 yılı başlarından itibaren çeşitli kanser saptanan hastalarda 7 parçadan oluşan Kras genetik bölgesinin incelenmesi ve inceleme sonrasında genetik değişimlerin bulunup bulunmamasına göre tedavi yönteminin belirlenmesi ağırlık kazanmıştır.

Kras geninin 1. ekzonu içerisinde yer alan ve kodon 12 ve 13 adı verilen kısmın genetik değişime uğramasının hastalarda ilaç direncine yol açtığı belirlenmiştir. Bu nedenle, tedavi öncesinde bu bölgenin incelenmesi tedavi yaklaşımını belirlemektedir. Benzer olarak baş-boyun bölgesi kanserlerinde de benzer yaklaşımın hastalar açısından önemli olduğu vurgulanmaktadır.

Kolorektal kanserlerin tedavisinde en önemli rolü oynayan Kras gen bölgesi kodon 12-13 mutasyonlarını rol oynar. 2009 yılı içerisinde yapılan araştırmalarda ise bunlara ilave olarak kolorektal kanser saptanan hastalarda Kras geninin 2. ve 3.ekzonunda da mutasyonlar tanımlanmış ve bu değişimlerin ekzon 1'de yer alan codon 12-13 mutasyonları gibi ilaç tedavisine yanıt ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda biyolojik cevap düzenleyicileri 1L-2 ve IFN ile metastatik hastalığı olanların bir kısmında cevap alınmıştır. Ayrıca, günümüzde süren klinik deneylerde, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve trombosit kökenli büyüme faktörünü de içeren, bir multikinaz inhibitörü olan "Sorafenib" tek başına ya da interferonla kombine olarak metastatik RHK tedavisinde kullanılmaktadır (76).

Kolorektal, pankreas ve akciğer başta olmak üzere bazı kanser türlerinde genetik mutasyonların saptanması ve tedavi konusunda başarı kazanılması ilgimizi renal kanserlere yöneltmiştir.

Kamai T ve ark, (77) Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) ile birlikte K-ras onkogeninin RHK surveyi ile ilişkisini değerlendirdikleri 51 hastalık çalışmalarında; 7/51 hastada serum PTHrP değerinde artış saptamışlardır. Ayrıca K-ras ve PTHrP'e ait mRNA ekspresyonunun da bu hasta grubunda diğer hastalarla ve normal dokularla karşılaştırıldığında anlamlı oranda yüksek olduğunu göstermişlerdir ($p<0.05$).

Kozma L ve ark.'nın (78) çalışmasında ise; 36 RHK hastasında quantitative dot-blot hybridization yöntemi ile tümörlü dokulardan c-myc and Kras amplikasyonu araştırılmış ve; c-myc amplikasyonunun 3 (%8.3) örnekte ortalamanın 2.47 kat üzerinde olduğunu bulmuşlardı ancak bu istatistiksel anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Buna karşın 6 (%16.6) örnekte ortalamanın 2.93 katı yükseklik anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Söz konusu Kras yüksekliğinin tümör derecesi ve çapı ile daha da yüksek oranda korelasyon gösterdiği, buna karşın lenf nodu tutulumu ile anlamsız olduğunu göstermişlerdir .

Kang S ve ark.'nın (79) servikal kanserlerde Kras ve Braf mutasyonlarını PCR ve DNA dizin analizi yöntemleri ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, 258 serviks kanserli doku örneği toplanmış ve; 27 (%23.5) adeno Ca hastasında Kras ve/veya Braf mutasyonu gösterilmiştir ($p=0.002$). Buna karşın skuamöz subtipde sadece 1 hastada pozitiflik saptanmıştır. Bu çalışmanın yorumunda, servikal kanserlerle yakın ilişkili olan HPV enfeksiyonları ile sözkonusu mutasyonların ilişkili olmayacağı yönünde veriler elde edildiği vurgulanmıştır.

Kras ve Braf ikilisinin kolorektal kanserlerle ilişkisini araştıran Seth R ve ark.'nın (80) çalışmasında da PCR ve DNA dizin analizi ile kanserli dokular değerlendirilmiş ve; Kras mutasyonu %54 hastada, Braf mutasyonu ise %29 hastada saptanmış ($p=0.005$).

RHK'da EGFR over ekspresyonu ve hatta bu durumun yüksek dereceli tümörler ve kötü prognozla ilişkisi esasen daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak Pu YS ve ark.'nın (81) çalışması bu konuya yeni bir boyut kazandırmıştır. Bu çalışmada 63 RHK hastasında immünohistokimyasal ve Western blotting tekniğiyle yöntemle EGFR ekspresyonu araştırılmış. EGFR membranöz boyanmasının normal dokuyla karşılaştırıldığında kanserli dokuda oldukça yüksek olduğu gösterilmiş ($p<0.001$), buna karşın stoplazmik boyanmanın normal dokularda kanserli dokulara göre anlamlı oranda daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.001$). Membranöz EGFR yüksekliği saptanan grupta sözkonusu bu yüksekliğin cinsiyet, tümör derecesi, T evresi ve sağkalımla korelasyonu gösterilememiştir ($p>0.05$). Bu çalışmanın sonuç kısmında, EGFR yüksekliğinin ve lokalizasyonunun hedefe yönelik tedavilere verilecek cevabın kestirilmesinde önemli olduğu vurgulanmıştır.

EGFR hücre reseptörünü hedef alan Cetuximab (Erbix) ve Panitumumab (Vectibix) ile yapılan bir çalışmada da; ilaçlarının kullanılmadan önce kanser dokusunda yapılan genetik test ile Kras geninin mutasyonlu olup olmadığı araştırılması ve esas klinik fayda sağlanacak grubun Kras geni mutasyonu saptanmayan hastalar olduğu ifade edilmiştir (74).

Szymańska K. Ve ark.'nın (82) yaptıkları çok merkezli bir çalışmada; 361 RHK hastasının doku örneklerinde TP53 (exons 5-9), EGFR (exons 18-21) ve Kras (codon 12) pozitifliği ve VHL mutasyonu ile ilişkisi araştırılmış ve şeffaf hücreli subtipin %4'ünde VHL mutasyonundan bağımsız olarak TP53 (+) bulunmuştur .

Şeffaf hücreli olmayan grubun hiçbirinde VHL mutasyonu saptanmamıştır. Benzer şekilde çalışmaya dahil edilen hastaların hiçbirinde EGFR ve Kras mutasyonu tespit edilmemiştir. Bu çalışmanın sonuç kısmında, TP53, Kras veya EGFR mutasyonlarının VHL geninde inaktivasyon olmadığı müddetçe RHK oluşumunda majör rol oynamadıkları ifade edilmiştir.

Bizim çalışmamızda da; EGFR, Braf ve Kras gen yolağı analizleri sonucunda herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Mutasyonla karşılaşmamış olması bu genlerin böbrek kanserlerinde etkin rolü olmadığını göstermez. Çünkü kanserlerde onkogen dediğimiz genlerin mutasyon göstermeden, açıklanamayan bir şekilde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.

Yaptığımız çalışmaya ek olarak, klinik fayda sağlaması açısından bu genlerin mRNA ekspresyonları ve protein ekspresyonları bakılması önem kazanmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda EGFR, Braf ve Kras gen yolağı analizleri sonucunda herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Mutasyonla karşılaşmamış olması bu genlerin böbrek kanserlerinde etkin rolü olmadığını göstermez. Çünkü kanserlerde onkogen dediğimiz genlerin mutasyon göstermeden, açıklanamayan bir şekilde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.

Yaptığımız çalışmaya ek olarak, klinik fayda sağlaması açısından bu genlerin mRNA ekspresyonları ve protein ekspresyonları bakılması önem kazanmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Landis SH, Murray T, Bolden S. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 1999;49:8-11.
2. Campbell SC, Novick AC. Renal Tumors; In: Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA (eds). *Campbell's Urology*, eighth edition. 2002;4:2672-2731.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(4):225-49.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.
5. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer.* 2005;114(1):101-8.
6. Muscat JE. The epidemiology of renal cell cancer. In: Brukowski RM, Novick AC (Eds.). *Renal cell Carcinoma*. Totowa (NJ): Humana pres. 2000. p. 3-14.
7. Menezes RJ, Tomlinson G, Kreiger N. Physical activity and risk of renal cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2007;107(4):642-6.
8. Shapiro JA, Williams MA, Weiss NS. Hypertension, antihypertensive medication use, and risk of renal cell carcinoma. *Am J Epidemiol.* 1999;150(6):521-38.
9. Hu J, Mao Y, White K. Diet and vitamin or mineral supplements and risk of renal cell carcinoma in Canada. *Cancer Causes Control.* 2002;14:705-14.

10. Rubagotti A, Martorana G, Boccardo FM. Epidemiology of kidney cancer. *Eur Urol*. 1998;50(5):558-65.
11. Sasagawa I, Nakada T, Kubota Y, Suzuki Y, Ishigooka M. Renal cell carcinoma in dialysis patients. *Urol Int*. 1994;53(2):79-81.
12. Parker AS, Cerhan JR, Lynch CF. History of urinary tract infection and risk of renal cell carcinoma. *Am J Epidemiol*. 2004;159:42-8.
13. Kırkalı Z, Öbek C. Clinical Aspects of renal cell carcinoma. *EAU Update series*. 2003;1:189-96.
14. Mahabir S, Leitzmann M, Virtanen MJA. Prospective study of alcohol drinking and renal cell cancer risk in a cohort of Finnish male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(1):170-175.
15. Burçin T, Kutsal Y. Böbrek ve mesane tümörleri Ege Patoloji Derneği Kursu, Kurs Notları. Ege Patoloji Derneği Etkinlikleri Yayın No:6 25-26 Aralık 2004.
16. Jayson M, Sanders H. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology*. 1998;51(2):203-5.
17. Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG, Bui MH, Han KR, Dorey FJ et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol* Nov. 2003;170(5):1742-6.
18. Heidenreich A, Ravery V. Preoperative imaging in renal cell cancer. *World J Urol* Nov. 2004;22(5):307-15.
19. Karstaedt N, McCullough DL, Wolfman NT, Dyer RB. Magnetic resonance imaging of the renal mass. *J Urol*. 1986;136:566-70.

- 20.Lim DJ, Carter MF. Computerized tomography in the preoperative staging for pulmonary metastases in patients with renal celi carcinoma. *J Urol*. 1993;150(4):1112-4.
- 21.Herts BR, Baker ME. The current role of percutaneous biopsy in the evaluation of renal masses. *Semin Urol Oncol*. 1995;13(4):254-61.
- 22.Hopper KD, Yakes WF. The posterior intercostal approach for percutaneous renal procedures: risk of puncturing the lung, spleen, and liver as determined by CT. *AJR Am J Roentgonol*. 1990;154(1):115-7.
- 23.Vassiliades VG, Bernardino ME. Percutaneous renal and adrenal biopsies. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 1991;14(1):50-48.
24. Medeiros LJ, Gelb AB, Weis LM. Renal Cell Carcinoma. Prognostic Significance Of Morphologic Parameters In 121 Cases. *Cancer* 1988:1639-1651.
25. Rodriguez A, Patard J, Lobel B. Renal cell carcinoma in young adults: incidence disease outcome and reiew ot literature. *Arch Esp Urol*. 2002;55:969-975.
- 26.Baltaci S, Orhan D, Soyupek S, Bedük Y, Tulunay O and Gögüs O: Influence of tumor stage, size, grade, vascular involvement, histological cell type and histological pattern on multifocality of renal cell carcinoma. *J Urol*. 2000;164:36-40.
- 27.Frank I, Blute ML, Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM. Independent validation of the 2002 American Joint Committee on cancer primary tumor classification for renal celi carcinoma using a large, single institution cohort. *J Urol*. 2005;173(6):1889-92.
- 28.B Ljungberg, Hanbury DC, Kuczyk AS, Merseburger PFA, Mulders, JJ, Patard IC. EAU Guidelines on Renal Celi Carcinoma. 2010;147-155.

29. Blom JHM, Van Poppel H, Marechal JM. Radical nephrectomy with and without lymph node dissection: preliminary results of the EORTC randomised phase 3 protocol 30881. *Eur Urol.* 1999;37:570-575.
30. Blute ML, Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM. A protocol for performing extended lymph node dissection using primary tumor pathological features for patients treated with radical nephrectomy for clear cell renal cell carcinoma. *J Urol.* 2004;172(2):465-9.
31. Fergany AF, Hafez KS, Novick AC. Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year followup. *J Urol.* 2000;163(2):442-5.
32. Uzzo RG, Novick AC. Nephron sparing surgery for renal tumors: indications, techniques and outcomes. *J Urol.* 2001;166(1):6-18.
33. Berger A, Brandina R, Atalla MA, Herati AS, Kamoi K. Laparoscopic radical nephrectomy for renal cell carcinoma: oncological outcomes at 10 years or more. *J Urol.* 2009;182(5):2172-6.
34. Jeschke K, Peschel R, Wakonig J, Schellander L, Bartsch G. Laparoscopic nephron-sparing surgery for renal tumors. *Urology.* 2001;58(5):688-92.
35. Stifelman MD, Sosa RE, Nakada SY, Shichman SJ. Hand-assisted laparoscopic partial nephrectomy. *J Endourol.* 2001;15(2):161-4.
36. Simon SD, Ferrigni RG, Novicki DE, Lamm DL. Mayo Clinic Scottsdale experience with laparoscopic nephron sparing surgery for renal tumors. *J Urol.* 2003;169(6):2059-62.
37. Rassweiler J, Tsivian A, Kumar AV, Lymberakis C, Schulze M. Oncological safety of laparoscopic surgery for urological malignancy: experience with more than 1,000 operations. *J Urol.* 2003;169(6):2072-5.

38. Wille AH, Tüllmann M, Roigas J, Loening S A, Değer S. Laparoscopic partial nephrectomy in renal cell cancer—results and reproducibility by different surgeons in a high volume laparoscopic center. *Eur Urol.* 2006;49(2):337-42.
39. Campbell SC, Novick AC, Belldegrun A, Blute ML, Chow GK. Practice Guidelines Committee of the American Urological Association: Guideline for management of the clinical T1 renal mass. *J Urol.* 2009;182(4):1271-9.
40. Matin SF, Ahrar K, Wood CG, Daniels M, Jonasch E. Patterns of intervention for renal lesions in von Hippel-Lindau disease. *BJU Int.* 2008;102(8):940-5.
41. Nguyen CT, Lane BR, Kaouk JH, Hegarty N, Gill IS. Surgical salvage of renal cell carcinoma recurrence after thermal ablative therapy. *J Urol.* 2008;180(1):104-9.
42. Marshall FF, Dietrick DD, Baumgartner WA, Reitz BA. Surgical management of renal cell carcinoma with intracaval neoplastic extension above the hepatic veins. *J Urol.* 1988;139(6):1166-72.
43. Wagner B, Patard JJ, Mejean A, Bensalah K, Verhoest G. Prognostic value of renal vein and inferior vena cava involvement in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2009;55(2):452-9.
44. Dimarco DS, Lohse CM, Zincke H, Chevillie JC, Blute ML. Long-term survival of patients with unilateral sporadic multifocal renal cell carcinoma according to histologic subtype compared with patients with solitary tumors after radical nephrectomy. *Urology.* 2004;64(3):462-7.
45. Stephenson AJ, Chetner MP, Rourke K, Gleave ME. Guidelines for the surveillance of localized renal cell carcinoma based on the patterns of relapse after nephrectomy. *J Urol.* 2004;172(1):58-62.

46. Freed SZ, Halperin JP, Gordon M. Idiopathic regression of metastases from renal cell carcinoma. *J Urol*. 1977;118(4):538-42.
47. Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, Bearman SI, Roy V, McGrath PC, Catton JR Jr, Munshi N, Crawford ED. Nephrectomy followed by interferon α -2b compared with interferon α -2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N Engl J Med*. 2001;345(23):1655-9.
48. Mickisch GH, Garin A, van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R. Radical nephrectomy plus interferon- α -based immunotherapy compared with interferon α alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Genitourinary Group. *Lancet*. 2001;358(9286):966-70.
49. Wyczółkowski M, Klima W, Bieda W, Walas K: Spontaneous regression of hepatic metastases after nephrectomy and metastasectomy of renal cell carcinoma. *Urol Int*, 66(2): 119-20, 2001
50. Gez E, Libes M, Bar-Deroma R. Postoperative irradiation in localized renal cell carcinoma: The Rambam medical center experience. *Lancet*. 2002;88:500-502.
51. Yu DS, Ma CP, Chang SY, Establishment and characterization of renal cell carcinoma lines with multidrug resistance. *Urol Res*. 2000;28:86-92.
52. Scheltema JMW, van Steenbrugge GJ, Beck WT. Decreased levels of topoisomerase II in human renal cell carcinoma lines resistant to etoposide. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1997;123:546-574.
53. Stadler WM, Huo D, George C, Yang X, Ryan CW. Prognostic factors for survival with gemcitabine plus 5-fluorouracil based regimens for metastatic renal cancer. *J Urol*. 2003;170(4):1141-5.

54. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2002;20(1):289-96.
55. Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database SystRev.* 2005;25(1):14-25.
56. Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Français d'Immunotherapie. *N Eng J Med.* 1998;338(18):1272-9.
57. Patel PH, Chadalavada RS, Chaganti RS, Motzer RJ. Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(24):7215-20.
58. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Eng J Med.* 2003;349(5):427-34.
59. Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Fergelot P. Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2006;49(4):633-43.
60. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S. Target Study Group: Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Eng J Med.* 2007;356(2):125-34.
61. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(1):16-24.

62. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Eng J Med.* 2007;356(2):115-24.
63. Hudes GI, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin RI, Kapoor A. A Phase 3, randomized 3-arm study of temsirolimus (TEMSR) or interferon-alpha (IFN) or the combination of TEMSR + IFN in the treatment of first-line, poor-risk patients with advanced renal cell carcinoma. 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings. *J Clin Oncol.* 2006;24(186):4-9.
64. Lane PA, Wei X, Vardeny ZV. Studies of Charged Excitations in pi-Conjugated Oligomers and Polymers by Optical Modulation. *J Phys Rev Lett.* 1997;78(8):1544-47.
65. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S. Tumor suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med.* 1995;1:822-826.
66. Zbar A. American Urological Association, Inc. Published by Elsevier Inc. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet.* 1997;16:68-73.
67. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-660.
68. Feldman AL, Alexander HR Jr, Yang JC. Prospective analysis of circulating endostatin levels in patients with renal cell carcinoma. *Cancer.* 2002;95:1637-1643.
69. Schmidt L, Duh M, Chen F. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal cell carcinomas. *Nat Genet.* 1997;16:68-73.
70. Clifford SC, Czaplak K, Richards FM. Hepatocyte growth factor-stimulated renal tubular mitogenesis: Effects on expression of c-myc, c-fos, c-met, VEGF and the VHL tumor suppressor and related genes. *Br J Cancer.* 1998;77:1420-28.

71. Morton DM, Barrack ER. Modulation of transforming growth factor β 1 effects on prostate cancer cell proliferation by growth factors and extracellular matrix. *Cancer Res.* 1995;55:2596-2602.
72. Salamon DS. Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Haematol.* 1995;19:1832-37.
73. Savas İ. Onkogenler. *T Klin Tıp Bilimleri.* 1995;15:374-377.
74. Van Cutsem E, Rougier P, Köhne CH. A meta-analysis of the CRYSTAL and OPUS studies combining cetuximab with chemotherapy (CT) as 1st-line treatment for patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Results according to KRAS and BRAF mutation status. *ECCO 15 – ESMO 34 2009*, Abstract No. 6.077.
75. Bellmunt J, Montagut C, Albiol S, Carles J. Present strategies in the treatment of metastatic renal cell carcinoma: an update on molecular targeting agents. *BJU Int.* 2006;1:77-83.
76. Bellmunt J, Negrier S, Escudier B. The medical treatment of metastatic renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2001;69(1):64-72.
77. Kamai T, Arai K, Koga F, Abe H, Nakanishi K, Kambara T. Higher expression of K-ras is associated with parathyroid hormone-related protein-induced hypercalcaemia in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2001;88(9):960-6.
78. Kozma L, Kiss I, Nagy A, Szakáll S, Ember I. Investigation of c-myc and K-ras amplification in renal clear cell adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 1997 1;111(1-2):127-31.
79. Kang S, Kim HS, Seo SS, Park SY, Sidransky D, Dong SM. Inverse correlation between RASSF1A hypermethylation, KRAS and BRAF mutations in cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 2007;105(3):662-6.

80.Seth R, Crook S, Ibrahim S, Fadhil W, Jackson D, Ilyas M. Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer. *Gut*. 2009;58(9):1234-41.

81.Pu YS, Huang CY, Kuo YZ, Kang WY, Liu GY, Huang AM, Yu HJ, Lai MK, Huang SP, Wu WJ, Chiou SJ, Hour TC. Characterization of membranous and cytoplasmic EGFR expression in human normal renal cortex and renal cell carcinoma. *J Biomed Sci*. 2009 12;16:82.

82.Szymańska K, Moore LE, Rothman N, Chow WH, Waldman F, Jaeger E, et al. TP53, EGFR, and KRAS mutations in relation to VHL inactivation and lifestyle risk factors in renal-cell carcinoma from central and eastern Europe. *Cancer Lett*. 2010;293(1):92-8.