

T.C.
SÜLEYMANDEMRELÜNVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**MESANE KANSERİNDE K-RAS PROTOONKOGEN
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Erdem ÇAPAR

**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Alim KOÇAR

ISPARTA-2012

T.C.
SÜLEYMANDEMRELÜNVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**MESANE KANSERİNDE K-RAS PROTOONKOGEN
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Erdem ÇAPAR

**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Alim KOŞAR

ISPARTA-2012

‘Mesane kanserinde k-ras protoonkogen mutasyonlarının araştırılması’ isimli 2928-TU-11 numaralı projem Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

TE EKKÜR

Üroloji uzmanlık eğitimim süresince en iyi şekilde yetiştiren, bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, bundan sonraki meslek hayatımda da değerli fikirlerinden destek bulacağım tez danışmanım, çok değerli hocam, Üroloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr. Alim KOÇAR'a; bu süreçte devamlı destek, ilgi ve yardımlarını gördüğüm değerli sayın hocalarımla Prof.Dr. T.Ahmet SEREL, Yrd.Doç.Dr. Taylan OKSAY ve Yrd.Doç.Dr. Alper ÖZORAK'a;

Tezimin hazırlanması sırasındaki destekleri için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından Yrd.Doç.Dr. Pınar ASLAN KOÇAR'a;

3 yıllık akademik süre ile birlikte çalıştığım ve deneyimlerini benimle paylaşan Prof.Dr. Hakkı PERK'e, Doç.Dr. Abdullah ARMAN'a, Doç.Dr. Sedat SOYUPEK'e;

Birlikte çalışmaktan onur duyduğum asistan arkadaşlarım ve üroloji servis çalışanlarına;

Asistanlık eğitimim ve hayatımın her anında desteklerini esirgemeyen anneme, babama, kardeşime ve bana gösterdiği özveriden dolayı canım eğitimci Hale Nur'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Erdem ÇAPAR, 2012

Ç NDEK LER

TE EKKÜR	ii
Ç NDEK LERiii
KISALTMALAR	vi
TABLÖLAR D Z N	viii
EK LLER D Z Nix
1.G R	1
2. GENEL B LG LER	2
2.1. Mesane Kanseri Epidemiyolojisi.....	2
2.2. Kanseri Tetikleyen Faktörler.....	2
2.2.1. Sigara Kullanımı.....	2
2.2.2. Çevresel Faktörler.....	3
2.2.3. Radyasyon Tedavisi.....	3
2.2.4. Diyetel Faktörler.....	3
2.2.5. Kronik İdrar Yolu Enfeksiyonları.....	3
2.2.6. Kemoterapi.....	4
2.3. Mesane Anatomi ve Histolojisi.....	4
2.4. Mesane Kanseri Histopatolojisi	8
2.4.1. Histoloji.....	8
2.4.2. Epitelial hiperplazi ve metaplazi.....	10
2.4.3. Displazi.....	10
2.4.5. nverted Ürotelial Papilloma.....	10
2.4.5. Von Brunn Nests.....	10
2.4.6. Cystitis Cystica Ve Cystitis Glandularis.....	11
2.4.7. Üretelial Karsinom.....	11
2.4.8. Skuamoz Hücreli Karsinom	12
2.4.9. Urakal Karsinom	12
2.4.10. Küçük Hücreli Karsinom.....	12
2.4.11. Mikropapiller Mesane Kanseri.....	12

2.4.12. Ürotelyal Karsinomun Adacık Türü.....	12
2.4.13. Sarkomatoid Karsinom Ve Karsinosarkom.....	12
2.4.14. Plazmasitoid Tür Ürotelyal Karsinom.....	12
2.5. Derecelendirme.....	13
2.5.1. Papilloma (grade 0)	13
2.5.2. İyi Differansiye Tümörler (Grade I, Low Grade)	13
2.5.3. Orta Derecede Diferansiye Tümörler (Grade II)	13
2.5.4. Kötü Differansiye Tümörler (Grade III, High Grade)	14
2.6. Mesane Tümörlerinin Yayılımı	14
2.6.1. Lokal Yayılım.....	14
2.6.2. Metastatik yayılım.....	15
2.6.3. İmplantasyon	15
2.7. Evreleme.....	16
2.8. Mesane Kanseri Patogenezi ve Prognostik Belirleyiciler (E)	18
2.8.1. Patogenez.....	18
2.8.2. Prognostik Belirleyiciler.....	19
2.8.3. Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri.....	20
2.8.4. Genetik ve Kromozomal Anomaliler.....	21
2.8.4.1. P53 Geni Mutasyonları.....	21
2.8.4.2. Retinoblastom Geni, Ürünleri ve Regülatörleri.....	22
2.9. Klinik ve Tanı.....	22
2.9.1. Semptomlar.....	22
2.9.2. Fizik Muayene.....	23
2.9.3. Görüntüleme.....	23
2.9.3.1. Ultrasonografi.....	23
2.9.3.2. İntravenöz Ürografi.....	23
2.9.4. İdrar Sitolojisi.....	23
2.9.5. İdrarda Moleküler Testler.....	23
2.9.6. Sistoskopi, Mesane Biopsisi Ve Tümörün Transüretal Rezeksiyonu (Tur-Tm)..	24

2.9.7. Floresan Sistoskopi.....	25
2.10. Tedavi.....	25
2.10.1. Transüretral Rezeksiyon (TUR)	25
2.10.2. Kasa nvaze Olmayan Mesane Kanserinde Tedavi.....	26
2.10.3. nvaziv Mesane Tümörlerinde Tedavi.....	26
2.11. RAS Protein Ailesi	27
3. MATERYAL VE METOD.....	30
3.1. Dokudan DNA zolasyonu.....	30
3.2. PLEX Gold Teknolojisi ile SNP Genotipleme.....	31
3.2.1. DNA zolasyonu ve Kalitesi.....	32
3.2.2. Çalı ma Dilüsyonu.....	32
3.2.3. Genotipleme Testi için Gereken PZR Primer ve Uzama Probu Dizayını.....	33
3.2.3.1. SNP veya mutasyon bölgesi seçimi.....	33
3.2.3.2. Amplifikasyon primerleri dizayn edilmesi.....	33
3.2.3.3. Uzama problemlerinin dizayn edilmesi.....	33
3.2.4. Sequenom MassARRAY® Protokol.....	34
3.2.4.1. DNA'nın Genotipleme için Ço altılması.....	34
3.2.4.2. dNTP Nötralizasyonu (SAP Reaksiyonu)	35
3.2.5. iPLEX Gold® Reaksiyonu Hazırlama (Tek baz spesifik uzama reaksiyonu).....	36
3.2.6. Resin ile temizleme.....	37
3.2.7. SpectroCHIP® Da ılımı.....	37
3.2.8. MALDI-TOF MS le Veri Analizi.....	37
4. BULGULAR.....	39
5. TARTI MA ve SONUÇ.....	45
ÖZET.....	56
ABSTRACT.....	57
KAYNAKLAR.....	58

S İMGELER VE KISALTMALAR

THK	:Transizyonel hücreli kanser
SHK	:Skvamoz hücreli karsinom
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
PUNLMP	:Düyük malign potansiyelli papiller hiperplazi
UICC	:Union Against Cancer
AJC	:American Joint Commission
TNM	:Tümör-Nod-Metastaz
RTK-RAS	:Receptor tyrosine kinase
FGFR3	:Fibroblast büyüme faktör reseptörü
N-CAD, E-CAD	:N ve E kadherin
MMPs	: Matrix metalloproteinazlar
VEGF	: Vasküler endotelyal faktör
TSP1	:Antianjiyogenik faktörler, trombospondin1
COX2	:Cyclooxygenase 2
K OMK	: İnvaziv olmayan mesane kanseri
CIS	:Karsinoma in situ
EORTC	:European Organization for Research and Treatment of Cancer
EGFR	:Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin
TGF-	:Transforme edici büyüme faktörü
MIS	:Müllerian inhibitör madde
HER2/NEU	: İnsan epitelial büyüme reseptörü

PDEGF	: Trombosit kökenli endotelial büyüme faktörü
RB	:Retinoblastom
K MK	:Kasa invaze mesane kanseri
US	:Ultrasonografi
IVU	: ntravenöz ürografi
BTA	: Bladder tümör antijen
CEA	: Karsinoembriyonik antijen
FISH	:Fluorescence in situ hybridization
TUR-TM	:Tümörün transüretal rezeksiyonu
HAL veya ALA	: Hexi-aminolaevulinik asit
BCG	:Bacillus Calmette-Guérin
MMC	:Mitomisin C
MVAC	:Methotrexate, vinblastine, doxorubicine (adriamycin) ve cisplatin
GC	:Gemcitabine ve cisplatin

TABLÖLAR D Z N

Tablo 1. Klasifikasyon.....	11
Tablo 2. TNM Evrelemesi	16
Tablo 3. Risk Grupları.....	19
Tablo 4. Skora göre nüks ve ilerleme olasılı ı.....	20
Tablo 5. Sequenom PCR Reagent Set kullanılarak PCR kokteyl hazırlanması.....	33
Tablo 6. SAP kokteylinin hazırlanması.....	34
Tablo 7. PLEX Gold Reaksiyon kokteylinin hazırlanması.....	35
Tablo 8. Olguların bazı sosyodemografik özelliklerine göre da ılımları.....	39
Tablo 9. Olguların mesane kanseri patoloji sonuçlarına göre da ılımları.....	40
Tablo 10. Olguların ilk kontrolleri sırasında kar ıla ılan nüks ve progresyon durumlarına göre da ılımları.....	40
Tablo 11. Hastaların mutasyon da ılımları.....	41

EK LLER D Z N

ekil 1. Mesane içyapısı.....	5
ekil 2. Mesane duvarı vertikal kesiti.....	5
ekil 3. Kadın pelvisi.....	6
ekil 4. Erkek pelvisi.....	7
ekil 5. 1973 WHO klasifikasyon ve 2004 WHO klasifikasyon ili kisi.....	14
ekil 6. Mesane tümörlerinde patolojik evreleme.....	17
ekil 7. Mesane kanseri genetik mutasyon eması.....	18
ekil 8. Hedef bölge amplifikasyonu, SAP inkübasyonu, tek baz spesifik uzama ve spectrum görüntüsü.....	38
ekil 9. B-Raf gen mutasyonları.....	43
ekil 10. K-Ras gen mutasyonları.....	44

1.G R

Mesane kanseri batıda 5. sıklıkta gözlenen nonkutanöz solid malign tümördür ve genitoüriner sistem tümörleri içerisinde ikinci sıklıkta gözlenen malignite türüdür. Erkeklerde kadınlardan 3 kat fazla görülmektedir. Mesaneden kaynaklanan malign tümörlerin yaklaşık %90'ı epitelyal orijinlidir ve bunların büyük çoğunluğu da i içi hücreli karsinomdur. Klini e ilk ba vuru anında mesane tümörlerinin yaklaşık %75-85'i klinik olarak yüzeyselken (evre Ta-Tis), kalan %15-25'i invaziv (T1,T2-T4) ya da metastatik lezyonlardır (1,2,3).

Yüzeysel tümörlü hastaların %70'den fazlasında ba langıç tedaviden sonra bir veya daha fazla rekürrens gözlenir ve yaklaşık bu hastaların üçte birinde hastalık progresyon gösterir. Bugün muhtemelen daha sonra invaziv karsinoma dönüşecek yüksek riskli yüzeysel tümörleri belirleyen yeni metodlara ihtiyaç vardır (4). Bu nedenle sistoskopiye onkogenik biyomarkırlarla desteklemek ve tedavi hedeflerini belirlemek amacıyla onkogenik mutasyonların tespit edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (5,6). Kasa invazyondan sonra do al seyir oldukça de i kendir fakat büyük oranda ölümcül seyredir. Agresif cerrahi rezeksiyonlar, radyoterapi ve/ya da kemoterapiye ra men, kür oranı %20-%50 arasında kalmaktadır. Bu hastalarda reseptör düzeyinde hedeflere ve onkogenlere yönelik tedaviler sonuçları iyile tirebilir (4).

Mesane kanseri geli iminde, bazı tümör baskılayıcı genler (p53, Rb, p21, p16), kromozom 9 delesyonları ve bazı onkogenler [c-erb-B2(HER-2/neu),HRas] önemli rol oynamaktadır.

Bizim çalı mamızda hücre biyolojisinin her alanında son derece kritik roller üstlenen RAS-RAF-MEK-ERK-MAP kinaz yola nda rol alan K-Ras ve B-Raf genlerindeki mutasyonlar ile mesane kanseri geli imi arasındaki ili ki ara tırılmı tır.

2.GENEL B LG LER

2.1. Mesane Kanseri Epidemiyolojisi

Mesane kanseri, kutanöz olmayan maligniteler içinde en sık rastlanan 4. kanserdir. Kanserden ölüm sebepleri arasında 9. sırada yer alır (3).

Mesane kanseri nedeni 2008 yılında dünyada 386300 yeni vaka ve 150200 ölüm bildirilmiştir (2). Amerika'da 2010 yılında 70530 yeni mesane kanserli hasta ve 14680 mesane kanseri nedeniyle ölüm saptanmıştır (3). Mesane kanseri erkeklerde kadınlardan 14 kat fazla rastlanır (2). Dünya çapında en sık rastlandığı ülkeler Avrupa, kuzey Amerika ve kuzey Afrika'dır. Kadınlar arasında en yüksek ölüm oranı Hindistan'da, en düşük ölüm oranı Malezya ve orta Afrika'da saptanmıştır (2).

2.2. Kanseri Tetikleyen Faktörler

Batı ülkelerinde sigara ve mesleki maruziyetler temel risk faktörüken, Afrika ve orta Asya'da %50'e varan insidansla schistosoma hematobiuma bağlı kronik enfeksiyon temel risk faktörüdür (2). Schistosomiaziste bağlı skuamoz hücreli karsinoma rastlanırken, sigara ve mesleki maruziyetlerde trasizyonel hücreli karsinoma rastlanır (2). Amerika'da ölüm hızı erkeklerde sabitlemi, bayanlarda azalmıştır (2). Avrupa'da sigara kullanımı ve mesleki maruziyetlerin azalmasıyla beraber ölüm hızı azalmıştır (2).

2.2.1. Sigara Kullanımı

Sigara günümüzde tüm mesane kanserlerinin %30-50'sinden sorumludur. Sigara içenlerde içmeyenlere göre kanser gelişme riski 4 kat daha fazladır. Kanseri riski içilen sigaranın sayısı, içilen süre ve dumanın inhalasyon miktarıyla ilişkilidir. Sigaranın bırakılması kanser riskini 1-4 yıl içinde %30 oranında azaltır. Sigaranın mesane kanseri yapıcı etkisi cinsiyetten bağımsızdır. Sigara içinde bulunan mesane tümörü oluşturmada sorumlu karsinogenler tam olarak aydınlatılamamakla birlikte nitrozaminler, beta-naftilamin ve özellikle de 4-aminobifenil bilinen önemli maddelerdir. Sigara içenlerin %50'sinde üriner karsinogenik triptofan metabolitlerinin idrarla atılımı artmaktadır. Sigara içenler ile içmeyen mesane kanserli hastalar değerlendirildiğinde p53 gen mutasyonlarının yer ve

tipleri arasında fark gözlenmezken, mutasyon olu umunun sigara içenlerde daha sık oldu u görülmü tür (7,8).

2.2.2. Çevresel Faktörler

Mesane tümörü açısından boya, gaz, deri, lastik ve petrokimya tesislerinde çalı anlar, rafineri i çileri, la ım i çileri ve laboratuvar teknisyenleri gibi eksojen karsinojenlerle temasta bulunanlar risk altındadırlar. Amino kökenli aromatik hidrokarbon, klorize alifatik hidrokarbonlar (kömür tozu), beta-naftilamin, 2-naftilamin, benzidin, ksenilamin, 4-nitro-difenil, 4-aminobifenil, 2-asetil aminofluoran gibi endüstride kullanılan maddelerin kimyasal karsinojen oldu u gösterilmi tir (7,8).

2.2.3. Radyasyon Tedavisi

Pelvisle uygulanan radyasyon, uygulanan doz ve süreye ba lı olarak mesane kanser riskini 2-4 kat arttırır (7,8).

2.2.4. Diyetel Faktörler

Allen ilk kez 1957'de yapay tatlandırıcıların karsinojenik etkilerinden söz etmi tir. Sakarin ve siklamidin etkileri tartı malı olmakla birlikte uzun süreli yüksek doz kullanımda tümör olu abilmektedir. Ya ve kolesterolden zengin diyetle beslenmenin, a ır ı çay ve kahve tüketiminin mesane tümör riskini arttırdı ı öne sürülmektedir (7,8).

2.2.5. Kronik drar Yolu Enfeksiyonları

Tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonları, ta lar ve uzun süre kateterizasyon epitelde skuamoz metaplazi, glandular metaplazi ve malakoplakiye neden olarak adenokarsinom ve skuamoz hücreli karsinom geli imine neden olabilirler. Uzun süreli üriner kateterizasyon uygulanan paraplejik hastalarda %2-10 oranında mesane kanseri geli ti i ve bunlarında %80'inin skuamoz hücreli karsinom oldu u bildirilmi tir. Ayrıca ekstrofi vezikale, mesane ta ı ve divertikül olgularında mesane kanseri geli ebilir. Schistosomia haematobium'un

neden oldu u schistosomiazis epitelde metaplazik de i ikli e neden olarak skuamoz hücreli karsinom olu umuna neden olabilmektedir. Bakterilerden proteuslar ve E.coli mesane kanseri olu umundan sorumlu tutulurken genitoüriner tüberkülozda mesane kanser riskinin arttı ı bildirilmi tir. Human Papilloma Virüs (HPV)ün mesane kanserindeki rolü pek çok çalı ma grubunca incelenmi ve çok çeli kili sonuçlar elde edilmi tir. Ara tırmalar HPV ile kontamine mesane kanseri olgularının %2 ile %35 arasında de i ti ini göstermektedir (7,8).

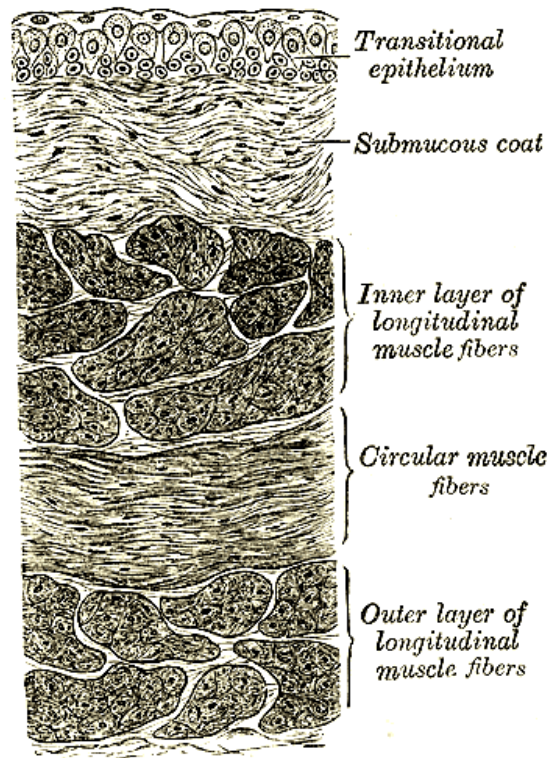
2.2.6. Kemoterapi

Siklofosamid, kemoterapötik olarak uzun süre ve yüksek dozlarda kullanıldı ında epitelium DNA'sında olu an hiperplazi ve hiperkromaziye ba lı olarak mesane kanseri olu abilmektedir. Siklofosamid kullanan hastalarda mesane kanser riskinin yakla ık 9 kat arttı ı bildirilmi tir (7,8).

2.3. Mesane Anatomi ve Histolojisi

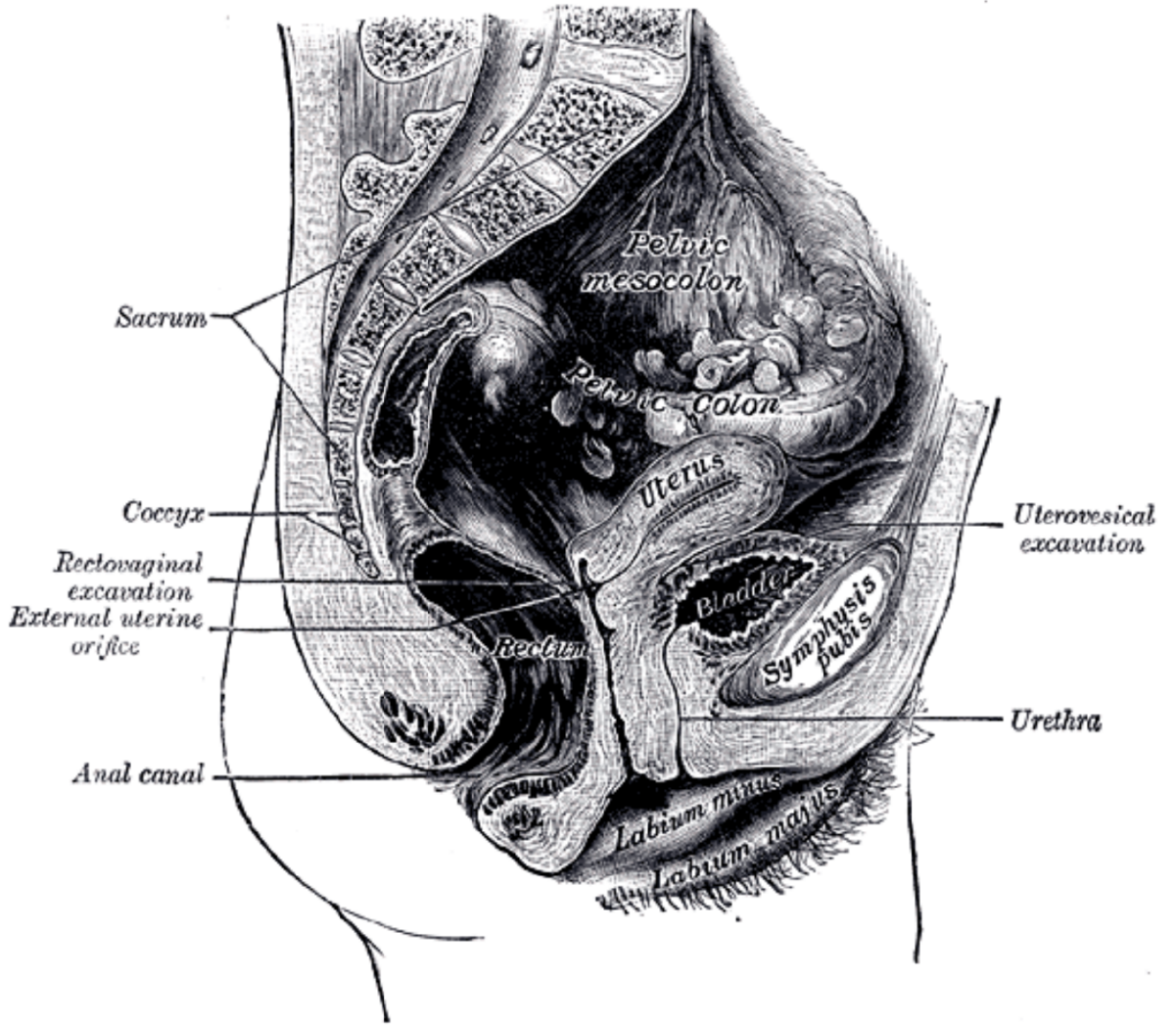
Mesane, kapasitesi ya a göre de i en ve eri kinde yakla ık 400 ml fonksiyonel hacme sahip, pelvik bir organdır. Bo mesane, eri kinde simfisis pubisin arkasında yer alırken, bebek ve çocuklarda daha yüksek seviyede bulunur. Mesane dolu iken simfisisin üzerine çıkar ve palpe edilebilir. Mesane duvarı lümeden dı a do ru, yüzeyel olarak epitel ve lamina propria ile daha derinde müskularis propria (detrusör kas), ya dokusu ve adventisya/seroza tabakalarından olu ur. Epitel tabakası transizyonel, çok katlı de i ken ya da güncel olarak ürotelyum olarak adlandırılır. Muskularis propria ortada dairesel, iç ve dı kısımlarında uzunlamasına kas demetlerinden olu ur. Mesanenin en dı ında ise süperior yüzde pelvik periton (seroza), di er yüzlerde ise ba dokusu (adventisya) yer alır (9).

ekil 1. Mesane içyapısı (9)

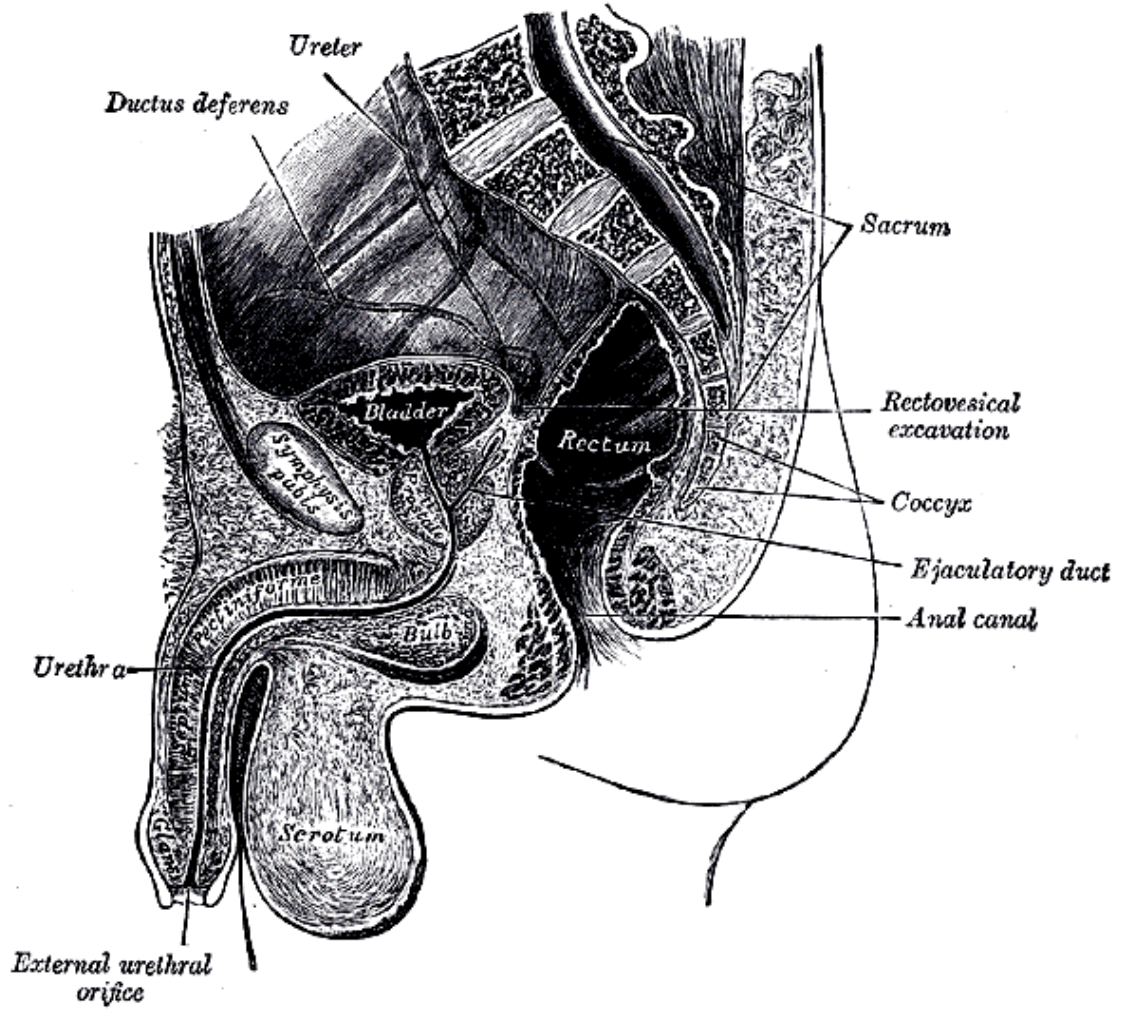


ekil 2. Mesane Duvarı Vertikal Kesiti (9)

Ürotelyum kalınlığı mesanenin dolu veya boş olmasına ve mesanedeki anatomik yere göre değişir. Mesane içinde üreterlerin açıldığı iki adet orifis vardır. Her orifis ve mesane boynu arasında üçgen eklemlerde trigon adı verilen bölge bulunur (9). Boş bir mesanede bir apeks, bir superior yüz, iki anterolateral yüz, bir taban veya arka yüz ve bir de boyun mevcuttur. Yalnızca üst yüz peritonla kaplıdır. Üst yüz kadınlarda uterus ve ileum, erkekte kolon ve ileumla, taban erkekte rektum, vaz deferens, vezikula seminalis ve üreterler, kadında uterus ve vajinayla komşuluk yapar. Anterolateral yüzler M.levator ani, N.obturatorius ve büyük iliak damarlarla komşudur. Apeksinden mediyal umbilikal ligaman adı verilen urakus artığı fibröz bir bantla umblikulusa bağlanır (9).



ekil 3. Kadın Pelvisi (9)



ekil 4. Erkek Pelvisi (9)

Arterleri: A. iliaca internanın dalları olan a. vezikalis inferior, media ve superiordan kanlanır. A.glutea inferior ve A.obturatoriusan ve kadınlarda A.uterinadan da dallar almaktadır.

Venleri: Mesane çevresinde geni bir venöz a vardır ve V. iliaca internaya dökülürler.

Sinirler: Mesanenin hem sempatik hem de parasempatik innervasyonu vardır.

Sempatik lifler T11-T12 segmentlerinden gelir. Hipogastrik pleksustan sonra aortik pleksusa ve hipogastrik sinir aracılığı ile mesaneye ulaşılarak mesane boynu ve trigonu innerve eder.

Parasempatik lifler ise S2-4 segmentlerinden gelir. Pelvik sinir aracılığı ile detrüsr kasını innerve eder. Gerilme duyusu ve mesane dolumu hissi parasempatik sistem ile, ağrı ve sıcaklık duyusu ise sempatik sistem kılıflı A ve kılıfsız C lifler aracılığı ile taşınır (9).

2.4. Mesane Kanseri Histopatolojisi

2.4.1. Histoloji

Mesane duvarı dört tabakadan oluşur:

- a.Epitel (urotelyum)
- b.Lamina propria
- c.Muskularis propria
- d.Adventisya/ seroza

a. Urotelyum; Mesane, ureterler, renal pelvis ve kalikslerin histolojik yapısı aynıdır. Bu organların mukozası çok katlı deskuamant (transizyonel) epitel ile döşelidir. Transizyonel epitel terimi, epitelin histolojik görünümünün non-keratinize skuamöz ve psödostratifiyel kolumnar epitel arasında bir geçi göstermesi nedeniyle kullanılmaktadır. Mesane boşken epitel kalınlığı 5-6 sıradır, dolu olduğu zaman ise epitelium kalınlığı 3-4 sıra olur ve yüzeydeki hücreler yassılaşır. Epitelde, yüzeyel hücreler,intermediyer hücreler ve bazal hücreler olmak üzere, üç hücre tabakası vardır (9,10).

Yüzeyel hücreler, üriner bölük ile ilişkili olup büyük, eliptik ve emsiye benzeri görünümündedirler. Intermediyer hücrelerden daha küçük olan bu hücreler, çift çekirdekli ve yoğun eozinofilik stoplazmaya sahiptirler. Intermediyer hücreler boş mesanede büyük hücre kalınlığında ve bazal membran uzunluğuna dik olarak uzanırlar. Nükleusları, yuvarlak olup ince granüler kromatine sahiptir. Sitoplazmaları geni ve vakuollü olabilir. Bu hücreler desmozomlarla birbirleri ile bağlantılı olup stoplazmik membranları belirgindir. Mesanenin dolu olduğu bölgelerde ise bu tabaka seçilemeyebilir veya sadece bir hücre kalınlığında ve düzleşmiş olarak görülür. Bazal tabaka sadece boş mesanede bulunan ve küboidal hücrelerden oluşan ince bir tabaka halinde izlenir (9,10).

b. Lamina Propria; Lamina propria, mukozal bazal membran ile muskularis propria arasında uzanır. Damar yapılarından zengin olup lenfatik kanallar, duyuşal sinirler ve bir miktar elastik lif içeren gev ek ba dokusundan meydana gelir. Mesane ve üreterde lamina propria gev ek oldu undan mesanenin kasılması kalın mukozal katlanmalara neden olur. Mesanenin lamina propriasının orta kısmında ise orta büyüklükte arter ve venler bulunur. Lamina propriada bulunan düz kas demetleri sıklıkla bu damarlar ile ili kili olup muskularis propria ile ili kili de ildir. Bunlar izole bantlar şeklinde görülebilece i gibi sürekli kalın bir kas tabakası ekinde de görülebirlirler (9,10).

Muskularis mukozanın ince ve devamlılık göstermeyen kas lifleri muskularis proprianın kalın fasikülleri ile karı tırılmamalıdır. Lamina propriadaki bu kas lifleri yaklaşık olarak orta bölgede yerler, yüzeye paralel uzanırlar ve sıklıkla ince duvarlı damarlar ile birlikte dirler. Tümörün evresini ve tedavisini etkilemesi nedeniyle cerrahi ve biyopsi materyallerinde muskularis propria ve yüzeyel kas demetlerinin ayrımı önemlidir (9,10).

c. Muskularis Propria; Muskularis propria, içte ve dı ta longitudinal, ortada sirkuler olmak üzere üç tabaka halinde düz kas demetlerinden oluşur. Gerçekte bu tabakalar sadece mesane boynunda devamlılık gösterir. Diğer bölgelerde bu longitudinal ve sirkuler tabakalar birbirlerine karı r halde bulunur ve uzanımları belirsizdir (9,10).

Erkeklerde mesane boynunda muskularis propria demetleri, prostatın fibromuskuler dokusuna kadar devam ederken, kadınlarda üretra duvarı içinde kas fibrilleri ile devam eder. Diğer tabakalarda oldu u gibi muskularis proprianın kalınlı ı ki iden ki iye, ya a ve dolgunlu unun derecesine ba lı olarak de i iklik gösterir. Evreleme için muskularis proprianın yüzeyel ve derin olarak iki segmente ayrılmasında anatomik bir belirteç yoktur (9,10).

d. Adventisya/Seroza; Mesanenin en dı tabakası ba dokudan oluş an adventisyadır. Sadece üst tarafta üzeri pelvik periton tarafından çevrilidir (9,10).

2.4.2. Epitelyal hiperplazi ve metaplazi

Epitelyal hiperplazi, nükleer ya da yapısal anormallikler olmaksızın hücre sayısında artışı ifade eder (9).

Üretelyal metaplazi, genellikle mesane tabanında, sıklıkla fokal alanlarda epidermoid (skuamoz) ya da glandular (adenomatöz) metaplazi gelişim ekinde, nontransizyonel epitelyal görünümdedir. Hücresel atipiden yoksun skuamoz metaplazi ya da belirgin keratinizasyon, benign bir durumdur. Sistitis sistika, üretelyumun eozinofilik likefaksiyona uğramış ektir. Sistitis glandularis de sistitis sistikaya benzer, ancak farklı olarak transizyonel hücreler glandular metaplaziye uğrarlar. Sistitis glandularis adenokarsinom için bir prekürsör olabilir (9).

2.4.3. Displazi

Displazi, normal ürotelyum ve karsinoma in situ (iddetli displazi) arasındaki epitelyal de i ikliktir. Displastik hücreler büyük, yuvarlak, çentikli normal epitelyal polaritede saptanmayan bazal yerleşimli çekirdeklere sahiptir (9).

2.4.5. Inverted Ürotelyal Papilloma

Ürotelyal neoplazmların yaklaşık %1'ini oluşturur. Nadiren saptanır. Daha çok 6.-7. dekatta, erkeklerde kadınlarda 7.3 kat daha fazla saptanır. Hastalar hematurî, irritatif i eme semptomları ve nadiren obstrüktif i eme semptomlarıyla başvururlar (11). Genellikle trigon ve mesane boynunda yerleşirler. Çoğunlukla <3cm olmakla beraber 8 cm'e kadar ulaşabilirler. Tekrarlama riski %5'in altındadır. Tek bir progenitör hücreden gelişen, klonal ve diploid bir neoplazmdir. Yaklaşık %45'inde FGFR3 ve TP53 mutasyonu izlenir. Düşük malign potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm ve düşük dereceli ürotelyal karsinoma ilerleyebilir (12). UROVYS ON FISH yöntemiyle yapılan immunohistokimyasal analizde inverted ürotelyal karsinomda bulunan ci67,p53,CD20 de i ikliklerinin inverted papillomada bulunmadığı saptanmıştır. Bu bulgular inverted papillomanın ürotelyal karsinomdan farklı patojenik mekanizmalardan geliştiğini göstermiştir (13).

2.4.5. Von Brunn Nests

Enflamatuvar hasara sekonder olarak ürotelyal ürolmektedir. Otopside % 85-90 rastlanmaktadır. Düzgün mukozal nodüller ekinde görülürler (14).

2.4.6. Cystitis Cystica Ve Cystitis Glandularis

Von brunn nestlerden santral hücrelerin kaybolmasıyla olu an küçük kistik kavitelerdir. Toplumda yakla ık %60 civarında gösterilebilir (14).

2.4.7. Üretelyal Karsinom

Mesane tümörlerinin yakla ık %90-95'ini ürotelyal hücreli kanserler olu turur. Geri kalanını ise mezen imal neoplazmlar , inverted lezyonlar ve di er epitelyal tümörler olu turur (15).

Transizyonel hücreli kanserdir (THK) dı ındaki tipler iyi ayırt edilmelidir. Çünkü ço u agresif seyirlidirler ve alternatif tedavi gerektirirler. Agresif seyirli bu THK dı ı tümörler tanı anında yüksek evreleri ile kötü sa kalım oranına sahiptirler (15).

THK'ların %10'u glandüler morfolojide alanlar içerir ve %60'ı fokal skuamöz differansiasyon gösterirler (15).

Üretelyal neoplaziler 2004 yılında WHO tarafından klasifiye edilmi tir (Tablo 1).

Tablo 1. Klasifikasyon (16)

nvaziv olmayan ürotelyal neoplazi
• Hiperplazi (atipi bulunmayan ya da papiller olmayan yassı lezyon)
• Reaktif atipi (atipi bulunan yassı lezyon)
• Önemi bilinmeyen atipi
• Ürotelyal displazi
• Ürotelyal karsinoma <i>in situ</i>
• Ürotelyal papillom
• Ürotelyal papillom, invert tip
• Dü ük dereceli papiller ürotelyal karsinom
• Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom
nvaziv ürotelyal neoplazi
• Lamina propria invazyonu
• Muscularis propria (detrusor muscle) invazyonu

2.4.8. Skuamoz Hücreli Karsinom

Skuamoz hücreli karsinom (SHK) mesane kanserlerinin %5'ini oluşturur. SHK risk faktörleri uzun süreli kateterizasyon, nonfonksiyone mesane, ürolitiazis, istosoma hematobium kronik enfeksiyonudur. Mesane SHK tümörlerinin çoğu agresif seyirlidir ve pT3 evresindedirler (15).

2.4.9. Urakal Karsinom

Urakal karsinom nadirdir. Mesane kanserlerinin %1'inden azını oluştururlar. Genellikle urakal epitelyumdan köken alırlar. Çoğu urokal neoplaziler adenokarsinom tipindedirler (15).

2.4.10. Küçük Hücreli Karsinom

Küçük hücreli karsinom ürotelyal tümörlerin %0.5-0.7'sini oluşturur. Akciğerdeki nöroendokrin türde leri gibi hızlı progresyon gösterirler (15).

2.4.11. Mikropapiller Mesane Kanseri

Mikropapiller mesane kanseri nadir bir formdur. Agresif seyreder (15).

2.4.12. Ürotelyal Karsinomun Adacık Türü

Ürotelyal karsinomun adacık türü lamina propria ve muskularis propriada, atipik neoplastik hücrelerden oluşur. Agresif seyri dolayısıyla benign karakterdeki nested papilloma, von brunn's nests, cystitis cystica ve nefrojenik metaplaziden ayırd edilmeleri önemlidir. Genellikle 60 yaş üzeri erkeklerde gözlenirler (15).

2.4.13. Sarkomatoid Karsinom Ve Karsinosarkom

Sarkomatoid karsinom ve karsinosarkom mesanenin difazik tümörüdür. İki farklı germ yapılı epitelyal ve mezodermal komponentlerden oluşmaktadır. Kötü prognozludurlar (15).

2.4.14. Plazmasitoid Tür Ürotelyal Karsinom

Plazmasitoid tür ürotelyal karsinom plazma hücrelerine benzer. Nadir agresif bir türdür (15).

2.5. Derecelendirme

Mesane kanseri için üzerinde uzlaşılmı tek bir derecelendirme sistemi bulunmamaktadır. Sıklıkla kullanılan sistem tümör hücrelerinin anaplazi derecesini esas alır. Buna göre karsinomlar iyi, orta ve kötü diferansiye tümörler olarak gruplandırılır. Tümörün grade'i ve evresi arasında sıkı bir ilişki vardır. Tümör hücresinde anaplazinin kriterleri; epitelyal hücre tabakası sayısının artması, anormal hücre olgunlaşması, dev hücreler, çekirdek/sitoplazma oranında artma, çekirdekçi in belirginleşmesi, kromatin kümeleşmesi, hücre polaritesinin kaybı, mitotik bölünme sayısının artmasıdır (17,18).

Mesane kanserlerinde en sık kullanılan derecelendirme Dünya Sağlık Örgütü (WHO) grade'leme sistemidir (17,18).

2.5.1. Papilloma (grade 0)

Normal mesane mukozasının ince fibrovasküler bir çekirdek örtmesi ile oluşan papiller bir lezyondur. Papillomların 7'den fazla epitelyal hücre tabakası yoktur ve histolojik olarak bir anormallik göstermezler (17,18).

2.5.2. İyi Diferansiye Tümörler (Grade I, Low Grade)

Önce fibrovasküler bir sap ve 7 tabakadan fazla hücreden oluşan kalınlı epiteli ihtiva eder. Hücreler sadece belirgin anaplazi ve pleomorfizm gösterirler. Çekirdek/sitoplazma oranı artmıştır. Nükleer membran belirgindir. Nadir mitotik ekillere rastlanır. Mukoza tarafından çevreledikleri takdirde bunlar düşük malign potansiyeli olan papiller ürotelyal tümörler olarak adlandırılmaktadır (17,18).

2.5.3. Orta Derecede Diferansiye Tümörler (Grade II)

Geni fibrovasküler bir çekirdek içerirler. Tabandan yüzeye doğru hücresel olgunlaşma da ilımı daha fazla olan ve hücre polarite kaybı daha yüksek olan tümörlerdir. Çekirdek/sitoplazma oranı daha fazla olmakla birlikte, daha fazla nükleer pleomorfizm görülür ve çekirdekçi daha belirgindir. Mitotik ekillere daha sık rastlanır (17,18).

2.5.4. Kötü Differansiye Tümörler (Grade III, High Grade)

Tabandan yüzeye doğru gidildikçe hücrelerde farklılaşma görülmez. Yüksek çekirdek/sitoplazma oranıyla birlikte belirgin nükleer pleomorfizm göze çarpar. Mitotik ekillere sık rastlanır (17,18).

WHO/ISUP sistemindeki PUNLMP lezyonlarda malignansinin sitolojik özellikleri yoktur, normal ürotelial hücreler papiller bir yapı oluşturur. Bunların ilerleme olasılığı ihmal edilebilir ancak nüks e ilimleri vardır. Bu sistemde ürotelial karsinomlar yüksek ve düşük grade olarak ikiye ayrılmıştır ve eski sistemdeki orta diferansiye grup kaldırılmıştır (17,18).

WHO/ISUP sistemi risk potansiyellerini daha iyi belirleyerek tümörlerin daha doğru tanımlanmalarına olanak sağlar ve günümüzde kullanılması önerilen dereceleme sistemidir (17,18).

1973 WHO		2004 WHO
Papilloma	→	Papilloma
Grade 1	→	PUNLMP
Grade 2	→	Low grade
Grade 3	→	High grade

ekil 5. 1973 WHO klasifikasyon ve 2004 WHO klasifikasyon ilişkisi (16,18)

2.6. Mesane Tümörlerinin Yayılımı

Mesane kanseri; lokal, metastatik ve implantasyon yayılımı vardır.

2.6.1. Lokal Yayılım

Tümör %60 oranında bir blok halinde mukoza altına invaze olur. Tümör hücrelerinin meydana getirdiği enzimler bazal membranda dejenerasyona neden olur ve tümör öncelikle bazal membrana ve ip musküler dokuya ve serozaya yayılır. Submukoza ve musküler dokudaki kan damarları ve lenfatiklere tümör hücreleri girerek, uzak veya bölgesel lenf bezi metastazları meydana gelir. Kas invazyonu ile uzak metastazlar arasında

anlamli bir ili ki vardir. Lokal yayilm ile tümör mesane içinde orifislere ve trigona, mesane dı ında ise üreter, uterus, vajina, üretra, prostat ve rektuma yayilabilir. Mesane kanseri karın duvarına, ürotelyal tabakaları zedelenmi mukozaya, rezeke edilmi prostatik fossaya veya travmatize edilmi üretraya implante olabilir. mplantasyon yüksek grade'li tümörlerde daha sık görülür (17).

2.6.2. Metastatik yayılım

Tümörün lamina propriayı a ması ile invazyon süreci hızlanır, lenfatik ve vasküler kanallara ula ılmasıyla metastaz meydana gelir. Kasa invaze olmayan papiller mesane tümörlü olguların yakla ık %5'inde lenfatik veya vasküler invazyon vardır. Lenfatik yayılım, mesanenin kas dokusuna invaze olmu tümör hücrelerinin lenfatik dola ıma katılmasıyla meydana gelir. Bazı olgularda hematojen metastazdan ba ımsız olarak erken lenfatik metastaz meydana gelir. Mesane kanserinden ölen olgularda yapılmı otopsi çalı maları, olguların yakla ık dörtte birinde pelvik lenf bezi metastazı olmadığını göstermiştir. Mesane kanserinin en sık metastaz yaptığı yer pelvik lenf nodları olup, olguların yakla ık %78'inde görülür. Bunların içinde; %16 paravezikal lenf bezleri, %74 obturator lenf bezleri, %65 eksternal iliak lenf bezleri tutulumu vardır. Mesane kanserinin en sık hematojen metastaz yaptığı organlar; %38 karaci er, %36 akci er, %27 kemik (vertebra), %21 adrenal bez ve %13 barsaklardır. Bunun dı ında literatürde mesane tümörünün deri, santral sinir sistemi, penis, kalp, tiroid, gluteal bölge, deltoid kası gibi ender görülen metastazları da mevcuttur (17).

2.6.3. mplantasyon

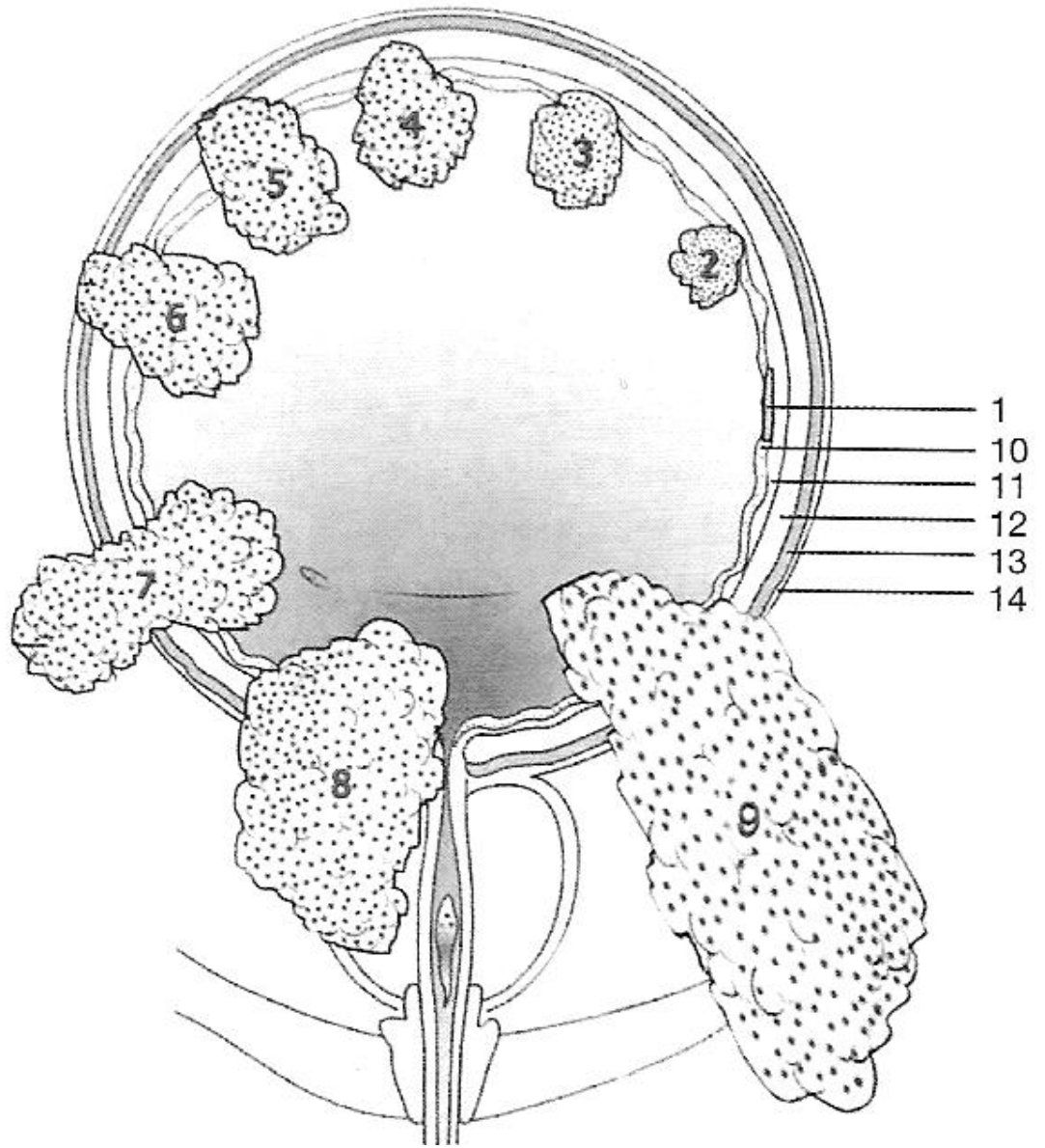
Mesane kanserleri implantasyon yoluyla abdominal duvar, travmatize olmu ürotelyum, rezeke prostatik fossa ve travmatize üretraya yayilabilirler. Bu tür yayılım genelde yüksek grade'li tümörlerde görülür. Renal pelvis ve üreter de mesane gibi çok katlı de i içi epitel hücreleri (ürotelyum) ile örtülü olduğundan mesane tümörü olgularında ileride pelvis renalis ve üreter tümörü oluşabilice i gibi, aynı ekilde mesanede de pelvis renalis ve üreter tümörü sonrası implantasyon yolu ile tümör görülebilir (17).

2.7. Evreleme

Günümüzde mesane tümörlerinin evrelendirilmesinde International Union Against Cancer (UICC) ve American Joint Commission (AJC) tarafından ortakla a geli tirilmi ve daha sonra düzeltilmi olan Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sistemi kullanılmaktadır. Birincil tümörün invazyonu (T), bölgesel lenf dü ümlerinde metastaz mevcudiyeti ve bunun seviyesi (N), uzak organ ve doku metastaz mevcudiyeti ve bunun seviyesi (M) olarak de erlendirilir (TNM evreleme sistemi, Tablo2) (19).

Tablo 2. TNM Evrelemesi (19)

Tx	Primer tümör de erlendirilemiyor.
Tis	Karsinoma in situ.
Ta	Noninvaziv papiller karsinom
T1	Tümör subepitelyal ba dokusu invazyonu yapıyor.
T2	
T2a	Tümör yüzeyel kas (iç yarı) invazyonu yapıyor.
T2b	Tümör derin kas (dı yarı) invazyonu yapıyor.
T3	
T3a	Tümör mikroskopik perivezikal doku invazyonu yapıyor.
T3b	Tümör makroskopik perivezikal doku invazyonu yapıyor.
T4	
T4a	Tümör prostat, uterus, vajina invazyonu yapıyor.
T4b	Tümör pelvis duvarı, karın duvarı invazyonu yapıyor.
Nx	Bölgesel lenf dü ümleri de erlendirilemiyor.
No	Bölgesel lenf dü ümlerinde metastaz yok.
N1	Tek bir lenf dü ümünde metastaz var; en büyük çapı <2 cm
N2	Tek bir lenf dü ümünde metastaz var; en büyük çap >2 cm, <5 cm veya 5 cm'den büyük olmayan birden çok lenf dü ümüne metastaz var.
N3	En büyük çapı 5 cm'den büyük olan lenf dü üm metastazı var.
Mx	Uzak metastaz de erlendirilemiyor.
Mo	Uzak metastaz yok.
M1	Uzak metastaz var.



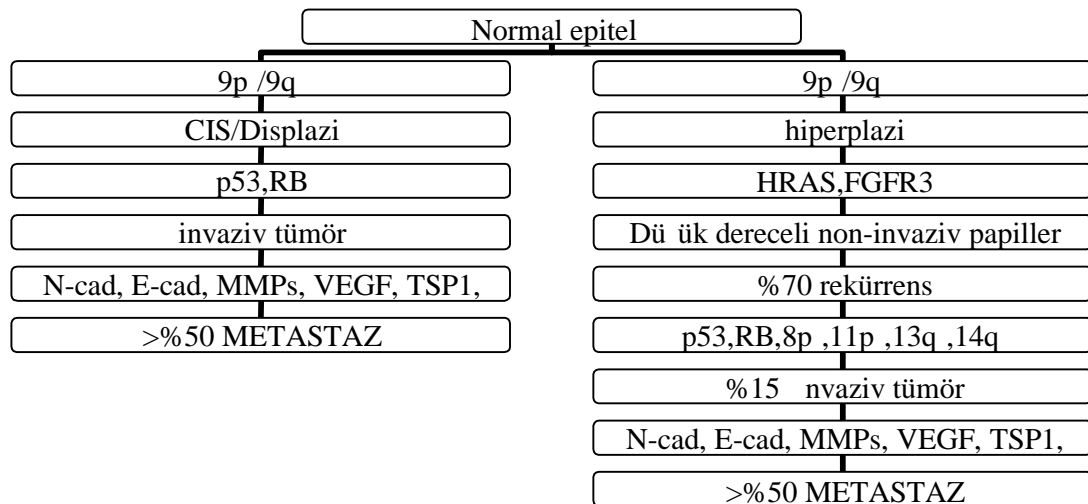
ekil 6. Mesane tümörlerinde patolojik evreleme (19)

1-Tis, 2-Ta, 3-T1, 4-T2a, 5-T2b, 6-T3a, 7-T3b, 8-T4a, 9-T4b, 10-Epitel, 11- Subepitelyal konnektif doku, 12-Yüzeyel kas (iç yarı), 13-Derin kas(dı yarı), 14-Perivezikal ya dokusu (19)

2.8. Mesane Kanseri Patogenezi ve Prognostik Belirleyiciler

2.8.1. Patogenez

Ürotelyal karsinomlar düşük dereceli papiller tip ve invaziv tümör olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Mesane kanserinde tümör invazyonu ve progresyonu multifaktöriyel bir süreçtir ve mikroçevresel değişiklikler tarafından tetiklenmektedir. Klinik bilgi ve deneysel çalışmalarda ürotelyal tümörlerin iki farklı yolda progresse olduğunu saptanmıştır (2g,2.3.A). Normal mesane epitelinin 9. kromozom kısa ve uzun kol delesyonlarıyla ürotelyal tümöregenez başlar. Ürotelyal tümörlerin %70-80'i birinci yolda basit papiller hiperplazi ile başlar. RTK-RAS aktivasyonu tümöregenezde erken ve kritik rol oynar. H-RAS geni ve (fibroblast growth faktör reseptörü-3) FGFR3 mutasyonları gelişir. Gelişen hiperplazilerin %70'i rekürrens gösterir. Rekürrens tümörlerin %15'i 8p, 11p ve 13q, 14q mutasyonları eklenerek invaziv hale dönüşür. Ürotelyal tümörlerin %20-30'u ikinci yolda CIS ve displazi ile başlar. Displazilerin %50'si p53, RB gen defektleriyle invaziv hale gelir. Her iki yolda invaziv ürotelyal tümörlerin %50'den fazlası N ve E kadherin (N-cad, E-cad), matrix metalloproteinazlar (MMPs), vasküler endotelial faktör (VEGF) ve antiangiyojenik faktörler, trombospondin1 (TSP1) ve cyclooxygenase2 (COX2) gen mutasyonlarıyla metastazlara dönüşür (4,15,20)



ekil 7. Mesane Kanseri Genetik Mutasyon teması (15,21)

2.8.2 Prognostik Belirleyiciler

Mesane kanserindeki prognostik faktörler arasında en önemlileri; derece, evre ve CIS varlığıdır (17). Çok deneşimli analizler sonucunda elde edilen prognostik faktörler yardımıyla yüzeysel mesane tümörü olan hastalar için farklı risk grupları oluşturulmuştur (Tablo 3). Bu sayede K OMK'ler düşük risk (%50), orta risk (%35) ve yüksek risk (%15) grubu olarak üçe ayrılabilir.

Tablo 3. Risk grupları (17)

Düşük Risk Grubu	Orta Risk Grubu	Yüksek Risk Grubu
Grade 1, evre Ta, Grade 1, evre T1, 3 cm tek tumor	Grade 1, evre T1, multipl tümör Grade 2, evre Ta,T1, > 3 cm tek tümör	Grade 2, evre T1, multipl tümör Grade 3, evre Ta Grade 3, evre T1 Karsinoma in situ İlk 3 ayda nüks

European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)'nin hazırladığı skorlama sistemiyle ve risk tabloları sayesinde nüks ve progresyon için riskleri ayrı ayrı belirlemek mümkündür.

Skorlama sistemi için belirlenen 6 önemli klinik ve patolojik faktör aşağıda belirtilmiştir (17):

- *Tümör sayısı
- *Tümör çapı
- *Daha önceki nüks hızı
- *T evrelemesi
- *CIS varlığı
- *Tümör derecesi

Tablo 4. Skora Göre Nüks ve İlerleme Olasılı 1 (17)

Nüks skoru	1. yılda nüks olasılı 1 (%95 CI)	5. yılda nüks olasılı 1 (%95 CI)
0	%15 (%10, %19)	%31 (%24, %37)
1-4	%24 (%21, %26)	%46 (%42, %49)
5-9	%38 (%35, %41)	%62 (%58, %65)
10-17	%61 (%55, %67)	%78 (%73, %84)
İlerleme skoru	1. yılda ilerleme olasılı 1 (%95 CI)	5. yılda ilerleme olasılı 1 (%95 CI)
0	%0.2 (%0,0 %0.7)	%0.8 (%0, %1.7)
2-6	%1 (%0.4, %1.6)	%6 (%5, %8.0)
7-13	%5 (%4.0, %7.0)	%17 (%14, %20)
14-23	%17 (%10, %24)	%45 (%35, %55)

2.8.3 Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri

Malign ürotelyum üzerindeki epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin (EGFR) anormal ekspresyonunun tümörün daha agresif davranışına neden olduğu gösterilmiştir (4,21,22). EGFR sinyalleri sadece büyümeyi değil, aynı zamanda kanser hücre motilitesini (4,21,22) ve matris metalloproteinaz-9 (MMP-9) ekspresyonunu indükler (21,22). Her iki basamak da invazyon ve metastaz için gereklidir.

Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) aralarında müllerian inhibitör madde(MIS), inhibin ve aktivinin de bulunduğu bir dizi birbiri ile ilişkili proteinden oluşmaktadır (21,22). TGF- β 1 ekspresyonunun ürotelyal karsinomlarda normal ürotelyuma göre arttığı saptanmıştır (21,22). Diğer yandan TGF- β 'lerin aynı zamanda güçlü anjiojenik aktivitesinin olduğu saptanmıştır (21,22). HER2/NEU onkogeninin amplifikasyonu nadiren görülmekle birlikte varlığında mesane kanseri progresyonu ile yakından ilişkilidir. Ancak HER2/NEU (ERBB2)'nin normalden fazla ekspresyonu genin amplifikasyonundan daha sık görülür ve tümör nüksü ya da progresyonu ile ilişkilidir. Bu genin ekspresyonunun, prognostik bir belirleyiciden çok hastalının bir belirteci olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (21,22).

Trombosit kökenli endotelial büyüme faktörü (PDEGF) güçlü bir anjiojenik faktör olan bir timidin fosforilazdır. Bu faktörün tümör dokularındaki konsantrasyonunun tümör evresi ve derecesi ile doğrudan ilişkisi olduğu bildirilmiştir (21,22).

2.8.4 Genetik ve Kromozomal Anomaliler

Onkogen indüksiyonu normal genin de i ikli e u rayarak malign fenotip kodlayan gene dönü mesi ve normal büyüme mekanizması kontrolünden kaçmaya imkân veren hücrelere dönü mesidir. ERBB-2, EGF(ERBB1) ile fonksiyonel ve anatomik bağlantısı olan ve büyüme faktörü reseptörü kodlayan bir onkogen olup, mesane kanserini de içeren birçok malignite ile ilgilidir (21,22). Karsinogenezde onkogenlerin dominant etkisi daha kolay fark edilebiliyorsa da, hücre büyümesi kontrolü, DNA tamiri ya da apoptozisi sağlayan proteinleri kodlayan tümör süpresör genlerin inaktivasyonu da buna etki edebilir. Bu genlerin inaktivasyonu veya delesyonu, kontrolsüz büyümeye ve hasarlı DNA hücrelerinin programlı ölümünde bir bozukluğa neden olabilir. Genetik olarak farklılaşmış hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucunda hücrelerde hatalı DNA kopyaları oluşur ve bu durum genetik instabilite meydana getirir.

2.8.4.1 P53 Geni Mutasyonları

P53 geni insan kanserlerinde en sık de i ikli e u rayan tümör süpresör genidir . Normal protein wild-type p53'ün çe itli görevleri olup, bunlar arasında hücre proliferasyonunu süprese eden bir transkripsiyon faktörü gibi davranmak, hasarlı DNA'sı bulunan hücreleri DNA replikasyonundan önce apoptozise yönlendirmek (hücre döngüsünün S fazında), çekirdekte deoksiribonükleotid trifosfat üretimini indükleyerek hasarlı DNA'ların onarımını sağlamak ve diğer mekanizmalara katkıda bulunmak yer alır. P53 mutasyonları hücre döngüsünün kontrolsüz bir şekilde devam etmesine sebep olurken, aynı zamanda anormal DNA içeren hücrelerin apoptozise gitmelerini de engelleyerek genomik instabiliteyi hızlandırır. Bu nedenle, p53 mutasyonlu mesane kanserlerinin daha agresif davranışlı görünmesi sürpriz değildir (20,21,22,23,24,25).

Kromozom 17p delesyonları tümör progresyonu ile ilişkilidir. Bunun nedeni bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün 17p'nin silinen kısmı ile birlikte kaybolmasıdır. Sistektomi yapılan olgularda p53'ün artmış nükleer ekspresyonunun azalmış ya da aynı süresi ve artmış progresyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (21,22). p53'ün artmış nükleer ekspresyonu aynı zamanda kemoterapiye yanıtı da belirleyebilir (21,22). Bununla birlikte

K OMK'li hastalarda, tümör derece ve evresinden ba ımsız olarak p53'ün nükleer artımı ekspresyonunun prognostik açıdan anlamlı de eri olmadı ı görülmü tür (21,22).

2.8.4.2 Retinoblastom Geni, Ürünleri ve Regülatörleri

Rb geninin yerle ti i kromozom 13q'nun kayıpları mesane kanseri ile ili kilidir (26).

Rb geninin normal protein ürünü (pRb), birkaç siklin ba ımlı kinaz ile fosforlanır. Fosforlanmış proteinler hücre çekirde inde bulunur ve hücre siklusunda çe itli basamakları kontrol eder. Rb geninin ve protein ürünlerinin mutasyon ya da delesyonu hücre döngüsünün G1'den S'e kadar olan kontrol noktalarında ilerlemesine izin vererek inhibe edilemez bir poliferasyona neden olur (21,22). pRB'yi fosforlayan siklin ba ımlı kinazların inhibitörleri (p15,p16,p19,p21,p27) hücre siklusunda regülatör olarak görev alırlar. Bu regülatörlerin veya pRb kodlayan genlerin ürünlerindeki anormal artı sonucunda inhibe edilemeyen proliferasyon, malign transformasyon ve tümör progresyonu görülebilir (21,22). pRb'nin tek ba ına ya da p53 ile beraber yapılan analizlerinde ba ımsız prognostik de eri oldu u bulunmu tur (21,22).

En çok rastlanan kromozomal anomalilerden biri kromozom 9'un delesyonudur. Moleküler ara tırmalar sonucunda K OMK nüksünde 9q12 delesyonu oldu u bildirilmi tir (21,22).

Kromozom 9q anomalilerinin sıklıkla dü ük dereceli yüzeysel tümörlerle ili kisi olup bu genin delesyonunda, genetik stabilite, tümör motilitesi, ço alması, invazyonu, metastazları ve anjiogenezi kontrolünü sa layan mekanizmaların tamamen kaybı söz konusu de ildir. p53 ve pRb genlerinde meydana gelen anomaliler ve 17p kromozomundaki delesyonlar ise yüksek dereceli ve kasa invaze tümörlerle daha sıklıkla ili kilidir (21,22).

2.10 Klinik ve tanı

2.10.1 Semptomlar

Mesane kanserinde en sık görülen bulgu a rısız hematüridir ve hastaların yakla ık % 85'inde görülür (15,27). Amerikan üroloji derne inin asemptomatik hematüriye yakla ım panelinde arka arkaya alınan 2-3 idrar örne inde büyük büyütme 3 ve üstünde eritrosit saptanması mikroskopik hematüri olarak tanımlanmı tir (27,28). Mesane

irritabilitesi, sık idrara çıkma, urgency ve dizüriden oluşan semptomlar kompleksi ikinci en sık görülen gelişimdir ve yüzeysel mesane kanserinden ziyade genellikle yaygın CIS ya da kasa invaziv mesane kanserini (KMK) düşündürür (27,29). Bunun dışında pelvik kitle ve lenfatik obstruksiyona bağlı olarak alt ekstremitelerde ödem, ilerleme veya yayılımı mesane kanserine bağlı olarak tahsızlık, kilo kaybı, halsizlik, karın ağrısı ve kemik ağrısı gibi metastatik yakınmalar da görülebilir (15,27).

2.10.2 Fizik Muayene

Fizik muayenede rektal ve vajinal bimanuel palpasyon mutlaka yapılmalıdır. Lokal ileri evre tümörü olan hastalarda ele gelen pelvik kitle bulunabilir (7).

2.10.3 Görüntüleme

2.10.3.1 Ultrasonografi

Ultrasonografi (US), üriner sistemin değerlendirilmesinde ilk inceleme olarak artan sıklıkta kullanılmaktadır. Transabdominal US renal kitlenin karakterini tanımlamaya, hidronefrozun saptanmasına ve mesane lümeni içindeki dolmuş defektinin görüntülenmesine olanak verir. Hematüri nedeninin aydınlatılmasında direkt üriner sistem grafisi ile kombine edildiğinde, VU kadar doğruluğu olabilir (7).

2.10.3.2 intravenöz Ürografi

Büyük tümörler mesanede bir dolma defektinde görülebilirler. intravenöz ürografi (ivü) aynı zamanda kaliksler, pelvis renalis ve ureterlerdeki dolmuş defektlerinin tanınmasında ve bir ureter tümörünün varlığının göstergesi olabilen hidronefrozun saptanmasında kullanılır (7).

2.10.4 İdrar Sitolojisi

İdrarın veya mesane yıkantı suyunun dökülen kanser hücreleri açısından muayenesi, özellikle CIS veya yüksek dereceli malignite varlığında yararlıdır (7).

2.10.5 İdrarda Moleküler Testler

Mesane tümörünün tespitinde bu testlerin çoğu iyi bir sensitiviteye sahiptir, ama spesifiteleri düşüktür. Sonuçta yanlış pozitif sonuçlar gereksiz görüntüleme ve mesane

biopsilerine neden olabilir (H). Sistoskopinin sensitivite ve spesifitesi %100 kabul edilerek tümör belirteçlerinin de eri saptanmı tır. Yüksek sensitivite hastalık progresyon ve ölüm riskini hesaplamaya, yüksek spesivite yanlı pozitiflerdeki invaziv sistoskopik giri imi engeller.

Bladder tümör antijen (BTA) testi idrara salınan kompleman faktör H ve kompleman faktör H-related protein antijenleri ölçülür (30,31,32). FDA onaylıdır. Nitel de er veren BTA stat testi, nicel de er veren BTA trak testidir (30,31,32).

NMP 22 (nükleer matrix protein) mitoz ve apoptoz sırasında salıverilir. FDA onaylı nitel bir testtir. Tekrarlayan tümör saptamalarında dü ük sensitivitelidir. E lik eden ürolojik patolojilerde %25 yanlı pozitiflik verir (30,31,32).

mmunoCyt mesane kanser müsın ve CEA (karsinoembriyonik antijen) monoklonal antikoru içerir. FDA onaylıdır. Rekürrens eden CIS'ta sitolojinin sensitivitesini %100'e çıkarır. NMP 22 ve BTA'ya göre, küçük tekrarlayan tümörleri saptaması , dü ük derece ve evredeki tümörlere daha sensitif olması ve di er ürolojik patolojilerden etkilenmemesi avantajlarıdır (30,31,32).

FISH (fluorescence in situ hybridization) 3,7,17 ve 9p 21(P16 tümör supresör gen) kromozomlardaki sentromer bölgelerine özgüdür. Tekrarlayan yüksek dereceli tümör ve CIS 'ta elveri li iken, dü ük dereceli ve evreli tekrarlayan tümörlerde sensitivitesi sitolojiden iyi de ildir (30,31,32).

Microsatellite Analiz'de polimorfik , küçük DNA parçacıklar de erlendirilir. FDA onayı yoktur (30,31,32). Hiyaluronik Asit ve HYL1 Type Hiyaluronidaz ;Tümör büyümesi, invazyon ve anjiyogenezde rol alır. Tümör derecesi, lenf nod tutulumu, progresyon ve dü ük ya am oranıyla ili kilidir(30,31,32).

2.10.6 Sistoskopi, Mesane Biopsisi Ve Tümörün Transüretal Rezeksiyonu (Tur-Tm)

Mesane kanseri tanısı mesanenin sistoskopik muayenesi ve çıkarılan dokunun histolojik de erlendirilmesine ba lıdır. Genel olarak, sistoskopi ba langıçta fleksible aletler kullanılarak ofiste yapılır. Daha önceki görüntüleme çalı malarında bir mesane tümörü

görülürse veya daha önceki idrar sitolojisi pozitif bulunursa, hasta her halikarda TUR geçirece i için tanısal sistoskopi atlanabilir (7).

Tümörün yapısı ve tümörün mesane duvarına yayılımının daha iyi ortaya konulabilmesi için TUR-Tm mümkün oldu unca derin yapılmalıdır. Tümörün mesane duvarındaki katmanlarda yayılımı evrelemede ve prognozu belirlemede kullanılır. Patolojik de erlendirme için; rezeke edilen tümörün yüzeysel kısmı ve derin kısmı ayrı ayrı gönderilmelidir. Koterin yaygın kullanımı patolojik detayları bozabilece inden koter kullanıma ba lı koter artefaktından kaçınılmalıdır. Taban biyopsisi tercihen biyopsi pensi ile alınmalıdır (7).

Hastalı ın yaygınlı ını belirlemek için tümörden ve üpheli alanlardan biyopsi alınmalıdır. Histolojik yapının ve hastalı ın yayılımının tespiti için so uk biyopsi ve TUR biyopsiler yapılabilir. Sitoloji pozitifli i var ancak papiller tümör yok ise ya da solid, düzeysel tümör varlı ında, normal mukozadan rastlantısal biyopsilerin alınması gereklidir. Tek odaklı papiller lezyonlarda bu biyopsilerin alınması kontrendikedir. Çünkü ilave bir bilgi sa lamaz ve biyopsi alanlarına tümör ekilmesi gibi bir risk ta ır. Prostatik üretraya yüksek sıklıkta yayılımından dolayı Cis üphesi varlı ında; prostatik üretradan TUR biyopsi alınmalıdır (7).

2.10.7 Floresan Sistoskopi

Standart bir prosedür olarak, sistoskopi ve TUR-Tm beyaz ı ık kullanılarak yapılırlar. Bununla beraber, beyaz ı ık kullanımı var olan, ama görülmeyen lezyonların gözden kaçmasına neden olabilir. Mavi ı ık ve porfirin-tabanlı fotosensitizatörü [(hexi)-aminolaevulinik asit (HAL veya ALA) kullanarak yapılan flosesan sistoskopi, mesanede C S için üpheli alanları veya beyaz-ı ıklı sistoskopide görülemeyecek geli mekte olan papiller tümörü ortaya çıkaracaktır. Ara tırma döneminde olan bu yöntem günlük pratikte rutin olarak henüz uygulanmamaktadır (7).

2.11. Tedavi

2.11.1 Transüretal Rezeksiyon (TUR)

Tanısal, prognostik ve tedavi olarak kullanılmaktadır. Evreyi kesinle tirmek için yüksek derece Ta tümörlerde, yetersiz rezeke edilmi tümörlerde, özellikle preperatta kas dokusu içermeyen T1 tümörlerde ilk tanıdan 2-6 hafta sonra 2. TUR Tm yapılır (15,17,33).

2.11.2 Kasa nvaze Olmayan Mesane Kanserinde Tedavi

Tedavideki amaç tekrarlamayı ve kasa yayılmayı engelleyip kansere ba lı ölüm oranını azaltmaktır. Tekrarlama riskini azaltmak için epirubisin, mitomisin C (MMC), thiotepa veya pirarubicin'den herhangi biri TUR Tm hemen sonrasında intravezikal olarak uygulanabilir. Postoperatif kemoterapi genellikle hemen TUR bitiminde yada ilk 6 saat içinde uygulanmaktadır (15,17).

Tümör tekrarlama riskini azaltmak için adjuvan intravezikal tedavi uygulanmaktadır. Tekrarlayan dü ük dereceli Ta tümörlerde, yüksek dereceli Ta ve T1 tümörlerde TUR Tm sonrası adjuvan intravezikal kemoterapi veya immunoterapi önerilir (15,34). Tekrarlayan CIS lezyonlarda intravezikal Bacillus Calmette-Guérin(BCG) önerilmektedir (15,34). BCG idame tedavisi Ta, T1 tümörlerde tekrarlama oranını MMC tedavisinden daha fazla azaltmaktadır (15,35).

BCG ba arısızlı nda çe itli çalı malarda lokal MMC ile birlikte microwave hipertermi, elektromotive intravezikal MMC instilasyonu, oral 5-ALA alımını takiben photodinamik tedavilerin tümör tekrarlama oranını azalttı ı saptanmıştır (15,36).

CIS ve yüksek dereceli T1 tümörlerde tanıdan 6 ay sonra agresif tümör geli irse, 2 kür BCG tedavisi sonrası tümörün gerilememesi durumlarında radikal sistektomi önerilmektedir (15,17,36).

Takipte sistoskopi ve idrar sitolojisi ilk 2 yıl 3 ayda bir daha sonraki yıllarda uzayan aralıklarla önerilmektedir (15,34). Yüksek dereceli tümörlerde 1-2 yılda bir üst üriner sistemin görüntülenmesi önerilmektedir (15,34).

2.11.3 nvaziv Mesane Tümörlerinde Tedavi

T2 kasa yayımlı tümörlerde radikal sistektomi ve üriner diversiyon önerilmektedir (15,34).

Üriner diversiyon i leminde en sık ortotopik yeni mesane yöntemi uygulanmaktadır. Ortotopik yeni mesane için kesin kontrendikasyonlar uzun süreli obstrüksiyon, KBY, ciddi karaci er yetmezli i ve ürektomi yapılması gereken olgulardır. Göreceli kontrendikasyonlar ise mental retardasyon, eksternal sfinkter yetmezli i, tekrarlayan üretral darlıklardır. Eski günlük hayatına hızlı dönmek isteyen özellikle ya lı hastalar,

toplumdan izole ya ayan hastalar, vücut imgesi problemi olmayan hastalarda inkontinan kutanöz diversiyon (conduit) cerrahisi tercih edilmektedir (7,15).

Sistektomi yapılan ço u hasta standart evreleme yöntemleriyle saptanmayan metastazlara sahiptir (15,34). Yüksek riskli T3,T4 ve lenf nodu pozitif mesane tümörlü hastaların %50'sinden fazlası sistektomi sonrası sistemik relaps olur. Kasa yayımlı tümörlü hastalarda mikrometastazları tedavi ederek, tümör evresini dü ürmek, cerrahi sırasında dola ım sisteminden tümör hücrelerinin dokulara yayılmasını önlemek ve ya am süresini uzatmak için neoadjuvan kemoterapi kullanılmaktadır (15,34).

Neoadjuvan methotrexate, vinblastine, doxorubicine (adriamycin) ve cisplatin (MVAC) kemoterapisinin ciddi granülositopeni, bulantı, kusma, stomatit, diyare ve konstipasyon yan etkileri vardır.

Gemcitabine ve cisplatine (GC) kemoterapisi MVAC kombinasyonu ile benzer etkinlik ve daha az toksisiteye sahiptir. Nötropeni, mukozit, nötropenik ate yan etkileri vardır. Böbrek yetmezli i olan hastalarda cisplatine yerine daha az toksik karboplatine tercih edilmektedir.

nvaziv mesane tümörlü hastalar yakın takip edilmelidir. İlk 2 yıl 3-12 ayda bir üriner sitoloji, serum elektrolit ve kreatinin takibi, akci er grafisi ve batin görüntülenmesi ara tırılmalıdır. 6-12 ayda bir üretral yıkama sitolojisi çalı ılmalıdır. Kemik metastaz üphesi olan ve T3 evredeki pN(+) hastalara kemik sintigrafisi çekilmelidir.

2.12. RAS Protein Ailesi

RAS proteini monomerik GTP ba layan bir GTPaz'dır (37). RAS proteinleri hücre zarının sitoplazmik yüzüne bakan kısmına ba lanmak için bir lipit grubu içermektedir. RAS gen ailesi, Harvey RAS (HRAS), Kristen RAS A ve B (KRAS), ve nöroblastom RAS (NRAS) olmak üzere 4 fonksiyonel genden oluşur. Bunlar 21 kDa (p21) molekül a ırlı nda, birbirine çok benzer ve korunmuş proteinleri kodlarlar (37,38). Farklı hücrelerde görevli farklı RAS proteinleri bulunur. RAS hücreye gelen sinyali hücre yüzeyinden ba ka bölgelere yaymaya yardımcı olur (39). Örne in tirozin kinazlar gen ifadesini de i tirerek hücre ço alması ve farklılaşması sinyalini iletmede kullanılırlar (38,39,40,).

RAS proteini GTP ba layan bir protein olarak 2 belirgin konformasyon arasında gidip gelen bir anahtar gibi davranır. GTP ba ladı ında aktif ve GDP ba ladı ında inaktiftir. Aktif ve inaktif durumlar arasındaki geçi i Guanin nükleotid de i toku elementleri (GEF) düzenler. GEF'ler GDP'nin ayrı masını ve sonrasında GTP'nin sitenolden alımını uyararak RAS'ı aktifle tirirler. GTPaz etkinle tirici proteinler (GAP) RAS'taki GTP'nin hidroliz hızını arttırarak RAS'ı inaktive ederler. Mutant RAS formları GAP'a duyarsızdır ve sürekli GTP ba lı aktif durumda kalırlar. Böylece kanser olu umunu te vik ederler. Tirozin kinaz reseptörleri GEF'leri aktifle tirerek, GAP'ları bo luyarak RAS'ı aktifle tirebilirler.

Aktif Ras, di er sinyal ileti proteinlerini aktifle tirerek sinyalin pek çok yolak üzerinden iletilmesini sa larlar. Bu yolaklardan birisi evrim sürecinde oldukça iyi korunmu olan serin/treonin fosforillenme proçesidir. Bu kaskadın fosforlanması ile tirozin kinazlar aktifle tirken, fosfotazlar ile inaktifle tirler. Hücrelerin ço alma ve farklıla abilmesi için kısa ömürlü sinyal iletim i lemi sinyali sürdürüp, gen ifadesini de i tirmek için çekirde e iletebilecek uzun ömürlü i lemlere döndürülmelidir.

GTP ba lı konformasyondaki Ras ailesi proteinleri, sinyal yola ının alt basamaklarında bulunan efektör proteinlere do rudan ba lanarak bu proteinleri (efektörleri) aktif hale geçirirler. RAF ("Ras Associated Factor") ve MAPK/ERK ("Mitogen Activated Protein Kinase" ve "Extracellular Signal Regulated Kinase") kaskadındaki en önemli efektör, Raf1, Ras efektörü olarak tanımlanan ilk proteindir. Memelilerde A-Raf, B-Raf ve Raf-1 olarak adlandırılmı üç tane Raf izoformu vardır. Aktif haldeki GTP-Ras, bir serin/treonin kinaz olan Raf1'in fosforillenmesine yol açar, ve MAPK/ERK (MEK) ile ba layarak ERK1/2 ile devam eden ve E26-transkripsiyon faktörünün (ETS) aktivasyonuna yol açan sinyal yola ının fosforillenme elalesi ile aktive olmasını tetikler. Kontrolsüz olarak aktif hale gelen Raf-MEK-ERK sinyal iletiminin kemirgen hücre hatlarının onkogenik transformasyonu için yeterli oldu u ve benzer bir bozulmanın insanda kanserle meye yol açtı ı gösterilmi tir (63,64,65).

Aktif olan Map-kinaz protein kinaz ve gen düzenleyici proteinleri fosforilleyerek sinyali çekirde e iletirler. Çekirdekte gen ifadesini düzenleyen bile enleri fosforilleyerek gen ifadesinde de i ikliklere neden olur. Böylece, Ras-MAP kinaz sinal ileti yola ı, hücre yüzeyinden gelen sinyali çekirde e ta ır ve gen ifadesinde anlamlı de i ikliklere neden

olur. Bu yolakla etkinle en genler arasında G_1 siklinleri kodlayan genler gibi hücre ço alması için önemli genler de bulunur. Mapkinazlar, tirozin veya treonin fosfatlardan birinin uzakla tırılması ile etkisizle tirilirler.

Ras proteinleri büyüyen hücrenin proliferatif ve de i im sinyallerinde aktif rol aldı ı için tüm kanserlerde somatik kazanımlı fonksiyonel mutasyonlara çok açıktır. Bu eklede intrinsik GTPase aktiviteli proteinlerin yapısı de i ir (38,39,40). Bazı tümörler üzerinde yapılan çalı malar RAS gen ailesinde nokta mutasyonlara yatkın olan bazı ‘hot spot’ları göstermi tir. Sık mutasyonlar kodon 12 de glisinin valine, kodon 13 te glisinin sisteine ve kodon 61 de glutaminin arginin/lizin/lösine de i imi eklede olmaktadır. Hotspot kodonlar 12, 13 (segment 1) veya 61 (segment 2) deki mutasyonlar spesifik aminoasit de i imlerine neden olur ve GTPaz aktivitesinin kaybıyla sonuçlanır (38,41,42). Guanozin trifosfatazın sinyal aktarımında (genetik bilgi aktarımında) moleküler anahtar oldu u iyi ortaya konmu tur. Ve farklı ekstrasellüler sinyal çe itleri RAS-GDP’nin RAS-GTP aktif biçimine dönü ümünü stimüle eder. RAS proteininin ana fonksiyonu devamlı mitojenik sinyalizasyonla sonuçlanan ve ölümsüz hücrelerin dönü ümü ile sonuçlanan a a ı yönde kinaz kaskadının aktivasyonunu indüklemektir (43).

RAF gen ailesi üyesi olan BRAF geni, v-raf murin sarcoma viral onko gen homolog B1 olarak tanımlanır ve kodladı ı protein kinaz (sitoplazmik serin/treonin kinazı), MAPK sinyal yolunda, hücre farklılaşması ve proliferasyonunda görev alır (67,68,69). BRAF alelleri, yedinci kromozomun kısa kolunda (7q) bulunmaktadır. Yeni çalı malarda, malignmelanoma, kolorektal karsinoma gibi kanserlerde BRAF genine ait somatik olarak mutasyon varlı ı rapor edilmi tir (67). Kanser olu umunda etkili oldu u dü ünülen BRAF genindeki somatik mutasyonlar, BRAF kinaz domaininin iki bölgesinde görölmektedir. Bunlar, G loop (ATP ’nin ba lanmasına aracılık eden motif) ve aktivasyon segmenti (substrat ba lanan bölgeyi koruyan motif) olarak tanımlanmı tır (67).

BRAF ’ın ekzon 15’indeki kinaz aktivasyon domaininde, 1796 T-A trans versiyonu (V600E-valinin glutamik asite de i imi)yanlı anlamlı mutasyon olarak (missens mutasyon) tek bir amino asit de i imiyle sonuçlanır (67). Tanımlanan BRAF mutasyonlarının %90’ı için, mutasyon T1796A’ nın etkisi altında olan V600E olarak rapor edilmi tir (67,68). V600E (GTG-GAG), yanlı anlamlı mutasyonu, Kumar ve ark. tarafından yeniden adlandırılarak V600E mutasyonu adını almı tır (70).

3. MATERYAL VE METOD

Çalı mamız prospektif bir çalı ma olup, 1 Ocak 2007 – 30 haziran 2011 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Klini i'ne ba vuran ve mesane tümörü tanısıyla transüretal mesane tümörü rezeksiyonu (TUR-MT) uygulanan hastalar çalı maya dahil edildi. Hastaların mesane tümör dokularına PCR tabanlı MassARRAY® teknoloji (PLEX®) ile tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) genotiplenmesi i lemi uygulanmı tır.

Elde edilen dokular i leme kadar -80 °C 'de saklanmı tır.

3.1. Dokudan DNA zolasyonu

- a. zolasyon i lemine ba lamadan önce sıcak su banyosu (Termal Labaratuvar Aletleri 820-3, Türkiye) 55°C' ye ayarlandı.
- b. Steril mikrosantrifüj tüplere doku bisturi yardımıyla parçalandıktan sonra yerle tirildi.
- c. Tüplere 180 µl PureLink Genomic Digestion Buffer (nvitrogen K1820-02) ve 20 µl Proteinaz K eklendi ve iddetli vorteks (Nüve NM 110, Türkiye) yapıldı.
- d. Tüplerin içindeki doku parçaları homojen hale getirilmek amacıyla 55°C su banyosunda bir gece bekletildi.
- e. Bu sindirim i leminden sonra tüplerde alına doku örneklerine ait homojen olmayan herhangi bir parça kalmı olma ihtimaline kar ı lizat maksimum hızda oda sıcaklı ında 4 dakika santrifüjlendi.
- f. Süpernatant yeni steril mikrosantrifüj tüpe transfer edildi.
- g. Lizata 20 µl RNase A eklendi, vorteks yapıldı ve 3 dk oda sıcaklı ında inkübe edildi.
- h. 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve vortekslendi.
- i. Lizata 200 µl %96' lık etanol (Riedel-de Haen 32221) eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
- j. PureLink Spin Column içerisine hazırlanan lizat eklendi ve 13000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi.
- k. PureLink Spin Column alt kısmındaki tüpler de i tirilerek yıkama i lemine geçildi.

- l. 500 µl Wash Buffer 1 PureLink Spin Column'a eklendi ve 13000 rpm de 1.5 dakika santrifüj edildi.
- m. 500 µl Wash Buffer 2 PureLink Spin Column'a eklendi ve 13000 rpm de 1.5 dakika santrifüj edildi.
- n. PureLink Spin Column filtrelili kısmı yeni steril ependorf tüpe yerle tirildi.
- o. 100 µl PureLink Genomic Elution Buffer PureLink Spin Column filtrelili kısma eklendi, oda sıcaklı ında 1 dakika inkübe edildikten sonra maksimum hızda 2 dakika santrifüjlendi.
- p. Ependorf tüplerde doku örneklerine ait saf genomik DNA elde edildi.

3.2. PLEX Gold Teknolojisi ile SNP Genotipleme

MassARRAY® teknolojisi (PLEX®) tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) genotiplenmesi için son derece yüksek verime sahip bir sistemdir. Nükleik asit de i ikliklerini saptamak için hedef bölgeler ba langıçta MassARRAY® TYPER 4.0 genotipleme yazılımı kullanılarak özel olarak tasarlanmı primer çiftleri ile ço altılır ve sonrasında tek kütlesi modifiye edilmi nükleotidler kullanılarak tek baz uzama reaksiyonuna tabi tutulur. Bu a ama sonrasında elde edilen ürünlerin matris çipe aktarılması ve MassARRAY® kütle spektrometrisi (Sequenom, San Diego, CA, USA) ile iyonizasyon sonrası e zamanlı deteksiyonu gerçekleştirilir. Bu i lem Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight kütle spektrometrisi'ne (MALDI-TOF) dayanmaktadır. Kısaca, lazer enerjisi matris tarafından absorblanır, bunun sonucunda minimal hasar ve fragmentasyonla substratın kısmi buharlanması meydana gelir. yonize örnekler elektrostatik hızla mass-to-charge oranının saptanması için kütle spektrometresine transfer edilir. Bu platformun geleneksel deteksiyon sistemlerine göre bazı avantajları mevcuttur. Ürün kütlesi, yüksek analitik do ruluk (%0.1–0.01) ile belirlenir. ndirekt analiz de kullanılan radyoaktif veya flouresan i aretleycilere ihtiyaç duymaz. Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sayesinde yüksek verim kapasitesine sahiptir. Tek kuyuda maksimum 36 farklı SNP'yi kuyu ba ına 20 ng'dan az DNA miktarı ile çalı abilme kapasitesine sahip olu u ve MassARRAY® TYPER 4.0 genotipleme yazılımı sayesinde hızlı analiz imkanı yüksek verim elde edilmesine olanak sa lamaktadır. Nükleik asitlerin hızlı analizi için MALDI-TOF kütle spektrometrisi, farklı a ırlıklardaki DNA kütlelerinin analizine dayanarak genotipleri ayırtmaya yarayan bir araç olarak geli tirilmi tir.

Yava latılmı ekstraksiyon teknolojisi; kütle analizöründe iyonların iyonizasyon ve ekstraksiyon arasında olu an zaman farkını tanıyarak, rezolüsyon ve hassasiyeti artırmaktadır. Bu esnada çip üzerinde var olan matriks (3-hidroksipikolinik asit) arka plan kirlili ini azaltarak kütle belirleme hassasiyetini artırır. Bu teknik oligonükleotid sekans varyasyonlarının çoklupolimorfizlerinin tek reaksiyonda çalı ılmasına olanak sa lamaktadır. Kullanımı oldu u yeni nesil teknoloji ve sa lamı oldu u bu avantajlardan dolayı MALDI-TOF kütle spektrometrisi yüksek verimli genotipleme çalı maları için çok etkin bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

SNP genotipleme çalı ması esnasında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için kullanılacak periferik kan veya parafine gömülü dokulardan (FFPE) elde edilecek DNA örneklerinin belirli yüksek kalite standartlarında olmaları gerekmektedir. İgili genetic varyasyon bölgesini ço altmada genomik DNA (gDNA) kalıp olarak kullanılacaktır. MassARRAY® sisteminde kullanılacak olan ampikon uzunlukları ortalama 70-150 baz çiftidir. Bu da çalı mamızın bir bölümünde kullanaca ımız parafine gömülü doku örneklerinin kolaylıkla de erlendirilmesinde di er teknolojilere göre avantaj sa layaca mını dü ünmekteyiz (48,49,50,51).

3.2.1. DNA zolasyonu ve Kalitesi

MassArray® sisteminde kullanılmak üzere, yüksek miktarda PZR ampikonu yapmak için gDNA kalıbının çok saf ve degrade olmaması gerekmektedir. zolasyon sonrasında ve PZR öncesinde gDNA kantitasyonu mutlaka yapılmalıdır. Ultraviyole (UV) spektrofotometre ölçümlerinde 260 nm ve 280 nm dalga boyu sonuç oranlarının 1.7 ve 2.0 (ör. $A_{260}/A_{280} = 1.7-2.0$) aralı nda olması gerekmektedir (48).

3.2.2. Çalı ma Dilüsyonu

Kantitasyon sonrasında DNA'nın büyük bir kısmını 50ng/µl stok konsantrasyonunda dilüe edilecektir. Bu stok konsantrasyon dilüe edilerek genotipleme çalı malarında kullanılacaktır. Genotipleme çalı masında her bir reaksiyon için 10-20ng DNA gereklidir (48).

3.2.3. Genotipleme Testi için Gereken PZR Primer ve Uzama Probu Dizaynı

3.2.3.1. SNP veya mutasyon bölgesi seçimi

Kademeli PZR'da BRAF genin 15. ekzonundaki 600. kodonunu çoğaltmak amacıyla tasarlanan primerler; ileri dizi (Forward) primeri: 5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-3', geridizi (Reverse) primeri; 5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3' ve Kras geninin 12 ve 13. ekzonundaki primerler; 5'ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3' ve 5'TTCTCCATCAATTACTACTTGCTTCCTGTA-3' eklindedir.

Tanımlanmış SNP'lerin referans sekans numaraları (rs) ve özellikleri açık veri tabanlarından (ENSEMBL Genome Browser (44); NCBI Entrez database (45); Wellcome Trust Sanger Institute Cosmic database (46) taranarak çalışılma kapsamına alınmıştır (49).

3.2.3.2. Amplifikasyon primerleri dizayn edilmesi

PZR mutiple amplifikasyon primerleri Sequenom'un Assay Designer yazılımı kullanılarak dizayn edilmektedir. Amplifikasyon primer çiftleri ortamda yer alan template dizileri ile hibridize olarak reaksiyonu başlatmaktadır. Assay Designer yazılımına adresinden de ulaşılabilmektedir. Başlangıç PZR primer kütle ve dizi bilgileri ek dosya 1'de gösterilmektedir (50).

3.2.3.3. Uzama problemlerinin dizayn edilmesi

Tek baz uzama problemleri Sequenom'un Assay Designer yazılımı kullanılarak dizayn edilmektedir. Problemler amplifikasyon aşamasında modifiye edilen PZR ürününe spesifik hibridizasyon gerçekleştirilerek ortamda var olan her bir allelin belirlenmesi için tek baz spesifik uzama gerçekleştirilir. Assay Designer yazılımına adresinden de ulaşılabilmektedir. Uzama prob kütle ve dizi bilgileri ek dosya 1'de gösterilmektedir (50).

Multiplex iPLEX Gold reaksiyonunda en iyi sonuçlar için uzama primerleri ve ürünlerinin kütlelerinin en azından 30 Da farklı olması gerekmektedir (aynı assayın allelleri hariç) ve tercih edilen analit kütleleri 4500-9000 Da arasında olmalıdır (50).

3.2.4.Sequenom MassARRAY® Protokol

3.2.4.1. DNA'nın Genotipleme için Ço altılması

Nükleik asit de i imlerinin belirlenebilmesi ve MassArray® sisteminde kullanılabilmesi için önce gDNA'daki hedef bölge, dizayn sonucu elde edilen primer çiftleri kullanılarak multipleks PZR ile ço altılacaktır. Uygulanacak çalı ma kondüsyoları a a ıdaki gibidir (49,50).

Protokol: her kuyu için aynı multipleks assay, kuyularda farklı DNA

PZR karı ımı a a ıdaki gibi hazırlanır.

Tablo 5. Sequenom PCR Reagent Set kullanılarak PCR kokteyl hazırlanması (49)

Reagent	5µL reaks. Final konst.	5µl 'dekiReagenthacmi [µl]
dH ₂ O, HPLC grade	N/A	2.8
10 x PCR Buffer (20mM MgCl ₂)	2mM MgCl ₂	0.5
25mM MgCl ₂	2mM	0.4
25mM dNTPMiks	500µM	0.100
0.5uM Primer Miks	0.1µM	1.00
5U/µl PCR Enzim	1 Unit	0.200
20ng/uL DNA	20ng/rxn	Çalı ma tüpüne aktarılıp, suyu kurutulmu haldeolacak
Total hacim [µL]	n/a	5.000

Her bir kuyuya 4µl PCR kokteyli konur.

1 µl uygun genomik DNA (10-20 µg/ml) her ilgili kuyuya konur.

Nazikçe karı tırılır ve 1000 rpm hızında santrifüj edilir.

Thermocycler Pzr reaksiyonları;

94°C 2dk

94°C 30sn

56°C 30 sn

72°C 1dk

72°C 1dk

45 siklus

4°C bekleme

3.2.4.2 dNTP Nötralizasyonu (SAP Reaksiyonu)

Amplifikasyon ürünlerindeki ba lanmamı dNTPleri shrimp alkaline phosphatase (SAP) ile nötralize etmektir. SAP, serbest dNTP'den bir fosfat keserek geri dönü ümsüz olarak dNDP'ye çevirir. Ba lanmamı , serbest bulunan dNTPleri defosforile etmek için a a ıdaki basamaklar uygulanır.

SAP Reaksiyon Kokteyli a a ıdaki gibi hazırlanır:

Tablo 6. SAP kokteylinin hazırlanması (50)

Reagent	7µL reaksiyon hacmi içindeki final hacim (PZR + SAP)	2µL of SAP kokteyl içersindeki reagent miktarı [µL]
Nanopuresu, Otoklavlı	n/a	1.53
SAP Buffer	0.24x	0.17
SAP Enzime(1.7U/ul)	0.5U	0.30
Total hacim [uL]	n/a	2

2µl shrimp alkaline phosphatase enzimi(SAP) her örnek kuyusuna yüklenir.

Örnek plateleri nazikçe karı tırılır ve 1000 rpm hızında santrifüf edilir.

37°C 40dk, 85°C 5 dk, 4°C sonsuz inkübasyonları yapılır.

3.2.5.iPLEX Gold® Reaksiyonu Hazırlama (Tek baz spesifik uzama reaksiyonu)

Ürünler daha sonra PLEX uzama reaksiyonuna tabi edilir, dizay edilen probler hedef bölge ile hibridizasyonu ve tekkütle-modifiye nükleotid uzaması gerçekleştirir. Uzama probu ve multiplex detayları ek tablo1 de mevcuttur (49,50).

PLEX gold reaksiyon kokteyli a a ıdaki gibi hazırlanır:

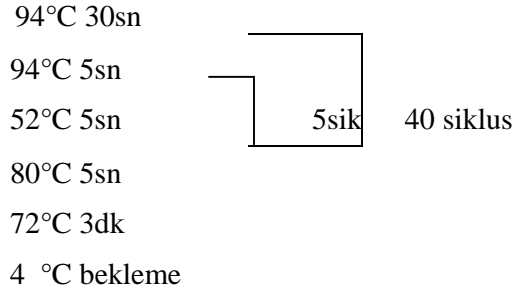
Protokol: her kuyu için aynı multiplex assay ve kuyulara farklı DNA

Tablo 7. PLEX Gold Reaksiyon kokteylinin hazırlanması (49,50,51)

Reagentlar	9µL reaksiyon hacmindeki final konsantrasyon	2µL cocktail içersindeki reagent hacmi [µL]
Nanopuresu	N/A	0.619
iPLEX GOLD Buffer	0.222X	0.200
IPLEXTerminasyon miksi	1X	0.200
Iplex Extend Primer Miksi 8/10/15 µM or linear regression karı ımı	0.84/1.04/1.57	0.940
iPLEX Enzim	1X	0.041
Hacim [µl]	n/a	2.000
SAP+PCR reaksiyonu	n/a	7.000
Total Volume [µll]	n/a	9.000

iPLEX Gold reaksiyon karı ımı hazırlanır. Gold reaksiyon karı ımı 1000 rpm hızında 1 dk santrifüf edilir. Her kuyuya 2 µl iPLEX reaksiyon karı ımı eklenir. Örnek plateleri nazikçe karı tırılır ve thermocycler a aması öncesinde 1000 rpm'de santrifüf edilir.

iPLEX gold reaksiyon kokteylinin thermocyclerda i lem görmesi;



3.2.6. Resin ile temizleme

Kütle spektrometrik analiz optimizasyonu için iPLEX reaksiyon ürünleri Na^+ , K^+ , and Mg^+ gibi iyonları uzakla tırarak arka plan kirlili ini minimum indirmek için katyonik de i im sa layan resin ile minimum 30dk muamele edilir. Örnekler 25ul ddH₂O ve 6mg resin kullanılarak dilüe edilir. Bu a amanın hazırlanması için 6 mg çukur plate kullanılır. Muamele sonrası PZR ürünleri 4000 rpm hızında santrifüj edilerek fazla resin kuyu dibine gönderilir (40,50,51).

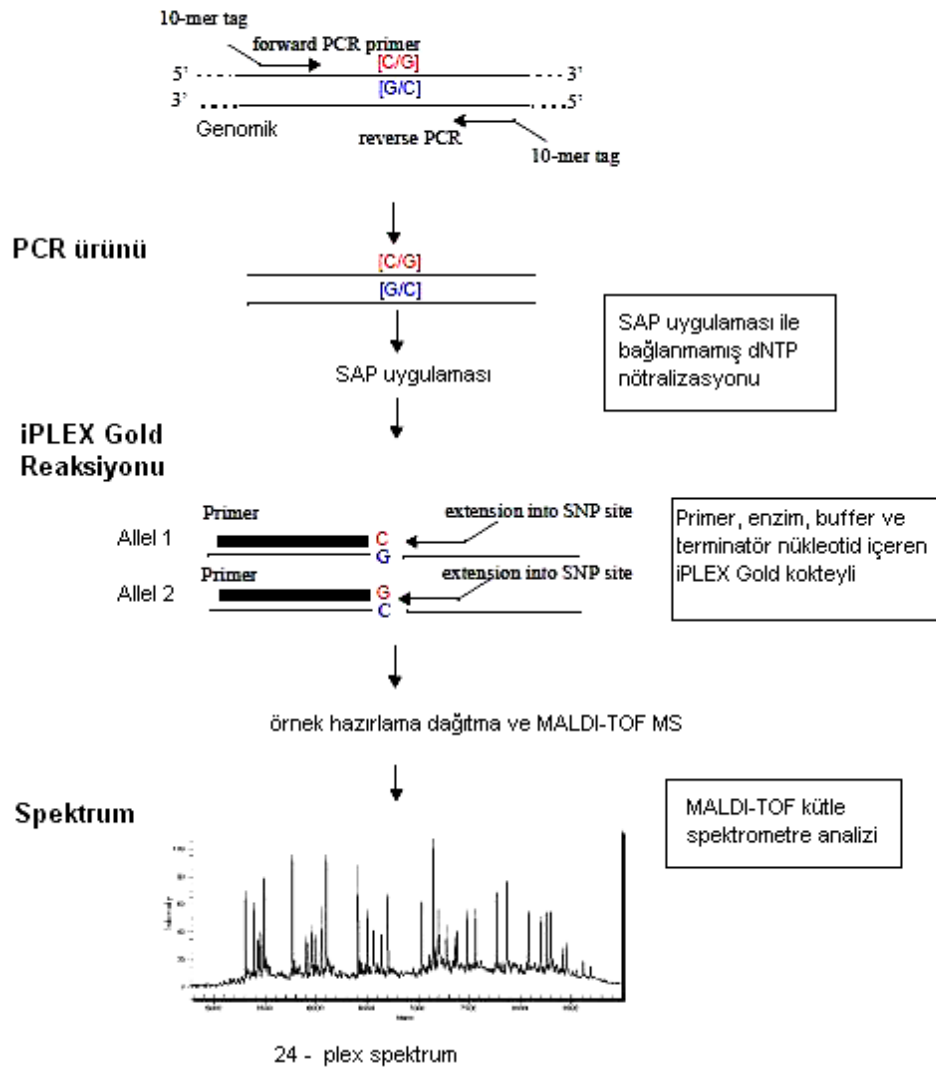
3.2.7.SpectroCHIP® Da ılımı

Hedef bölgenin amplifikasyonu , SAP uygulaması ile ba lanmamı serbest bulunan dNTP'leride fosforile etme, tek baz spesifik uzama reaksiyonu ve ortamdaki tuzların uzakla tırılması için resin uygulanması a amalarını takiben elde edilen modifiye ürünü, nanolitre (nl) hacminde ortalama 15nl PZR ürünü 384-element SpectroCHIP® II üzerine da ıtmak için nanodispenser (Sequenom) kullanılır (40,50,51).

3.2.8.MALDI-TOF MS le Veri Analizi

Nanodispenser ile üzerine PZR ürünü da ıtılan 384-element SpectroCHIP®II analizi için MassARRAY® Analyser 4 cihazına yüklenir. Cihaza yükleme a amasından sonra sonuç alımı maksimum 40 dk sürmektedir. Lazer atımı sonrası elde edilen verilerin analizi, spektro görüntüsünün ve allel spesifik piklerin elde edilmesi için (iPLEX SpectroCHIP®II analizi) MassARRAY® TYPER 4.0 genotipleme yazılımı kullanılmaktadır. Deney dizayn a amasında elde edilen dizayn bilgileri, spektra da do ru analitin beklenen pozisyonunun hesaplanması için sistem tarafından kullanılmaktadır (40,50,51).

Amplifikasyon



ekil 8. Hedef bölge amplifikasyonu, SAP inkübasyonu, tek baz spesifik uzama ve spectrum görüntüsü (40)

4.BULGULAR

Ara tırmaya alınan mesane kanserli olgular toplam 46 ki iydi. Olguların %84,8'i (39) erkek, %15,2'i (7) kadındı. Ya ortalaması 66 yıl (38-86) idi. Ya grupları de erlendirildi inde olguların %60,9'u (n=28) 65 ya ve üzerindeydi (Tablo 8).

Olguların en kısa takip süresi 4 ay, en uzun takip süresi 60 aydı. Takip süresi içerisinde 14 olgu mesane kanseri nedeniyle ölmü tür.

Tablo 8. Olguların bazı sosyodemografik özelliklerine göre da ılımları

Sosyodemografik Özellikler	Sayı	Yüzde %
Cinsiyet		
Kadın	7	%15,2
Erkek	39	%84,8
Toplam	46	%100
Ya grupları		
< 65 ya	18	%39,1
65 ya	28	%60,9
Toplam	46	%100

Tablo 9. Olguların mesane kanseri patoloji sonuçlarına göre dağılımları

İlk Patoloji Sonucu	Sayı (n)	Yüzde (%)
Yüzeyel tümörler		
TaG1	3	%6,5
TaG2	5	%10,8
T1G2	7	%15,3
T1G3	12	%26
İnvaziv tümörler		
T2G2	2	%4,3
T2G3	7	%15,3
T3aG2	1	%2,1
T3bG2	2	%4,3
T3bG3	5	%10,8
T4aG3	1	%2,1
T4bG3	1	%2,1
Toplam	46	%100

Olguların izlem sırasında ilk kontrollerinde 9'unda (19,5) nüks, 1'inde (11,1) progresyon görülmüştür.

Tablo 10. Olguların ilk kontrolleri sırasında karşılaşılan nüks ve progresyon durumlarına göre dağılımları

Takip	Sayı	Yüzde %
Nüks	9	%19,5
Progresyon	1	%11,1

Nüks göstermi olan 9 hastanın takibinde 1 hastada progresyon gelişimi saptandı. Sonuç olarak, toplam 1 hastada progresyon gelişimi izlenmiş olup bunun Ta tümör olduğu görüldü.

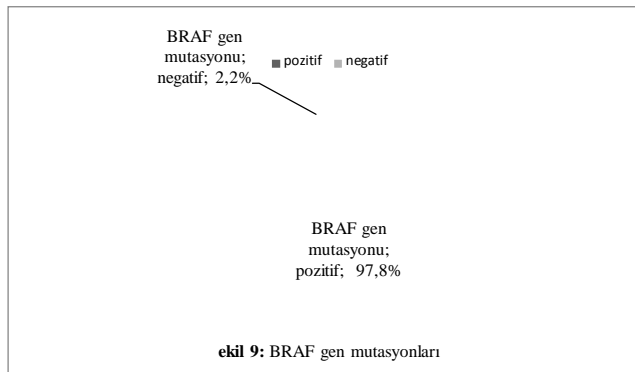
Tablo 11. Hastaların mutasyon dağılımları

Numara	Ya	Cinsiyet	Sigara	Evre	BRAF V600E	Gly12Serin	Gly13asp	Gly13Cys	Gly12Ile	Gly12Leu
1.	77	K	-	T3G2	+	-	-	-	-	-
2.	62	E	+	TaG2	+	-	-	-	-	-
3.	61	E	+	T1G2	+	-	-	-	-	-
4.	63	E	+	T3bG3	+	-	-	-	-	-
5.	66	K	+	T1G3	+	-	-	-	-	-
6.	75	E	+	T1G2	+	-	-	-	-	-
7.	84	E	-	T2G3	+	-	-	-	-	-
8.	59	E	+	TaG2	+	-	-	-	-	-
9.	60	K	-	T3aG3	+	-	-	-	-	-
10.	61	E	+	T2G2	+	-	-	-	-	-
11.	70	E	+	T2G3	+	-	-	-	-	-
12.	82	K	+	T1G2	+	-	-	-	-	-
13.	66	E	+	T1G2	+	-	-	-	-	-
14.	80	E	+	T4aG3	+	-	-	-	-	-
15.	71	E	+	T2G3	-	+	-	-	-	-
16.	80	E	+	T1G3	+	-	-	-	-	-
17.	50	E	+	T2G3	+	-	-	-	-	-
18.	65	K	-	T1G3	+	-	-	-	-	-
19.	67	K	-	T1G2	+	-	-	-	-	-

20.	55	E	+	T1G3	+	-	-	-	-	-
21.	78	E	+	T1G3	+	-	-	-	-	-
22.	38	E	+	T2G3	+	-	-	-	-	-
23.	65	E	+	T1G3	+	-	-	-	-	-
24.	74	E	-	T3bG2	+	-	-	-	-	-
25.	76	E	-	T2G3	+	-	-	-	-	-
26.	72	E	+	T3bG3	+	-	-	-	-	-
27.	42	E	+	T1G2	+	-	-	-	-	-
28.	65	E	+	TaG1	+	-	-	-	-	-
29.	77	E	+	TaG2	+	-	-	-	-	-
30.	54	E	-	TaG1	+	-	-	-	-	-
31.	62	E	-	TaG2	+	-	-	-	-	-
32.	66	E	+	T1G3	+	-	-	-	-	-
33.	75	E	-	T3bG3	+	-	-	-	-	-
34.	64	K	-	T3aG2	+	-	-	-	-	-
35.	69	E	-	T3bG3	+	-	-	-	-	-
36.	85	E	-	T1G3	+	-	-	-	-	-
37.	69	E	+	T1G3	+	-	-	-	-	-
38.	56	E	+	T3bG3	+	-	-	-	-	-
39.	75	E	+	TaG1	+	-	-	-	-	-
40.	66	E	+	T1G3	+	-	-	-	-	-
41.	63	E	+	T2G3	+	-	-	-	-	-
42.	78	E	-	T2G2	+	-	-	-	-	-

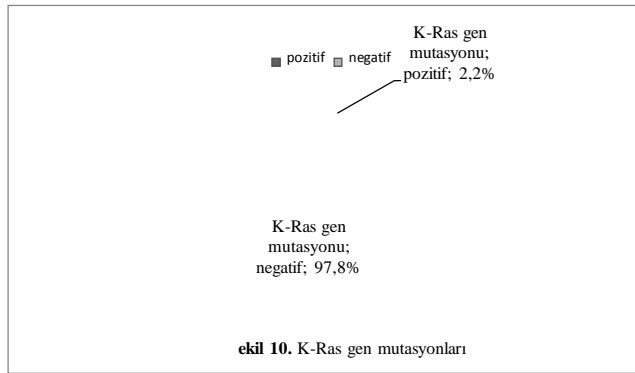
43.	66	E	+	TaG2	+	-	-	-	-	-
44.	86	E	+	T3bG3	+	-	-	-	-	-
45.	60	E	+	T1G3	+	-	-	-	-	-
46.	60	E	+	T1G3	+	-	-	-	-	-

Olguların 45 (%97.8)'inde T1796A transversiyonuna ba lı BRAF V600E mutasyonunun varlı ı tespit edilmi tir. Bu 45 olguda KRAS mutasyonu saptanmamı tır.



Bir olguda KRAS geninin 12. Kodonunda GGT>AGT transisyonu sonucu meydana gelen Gly12Serin aminoasidine de i imine yol açan bir mutasyonu saptanmı tır. Bu olguda BRAF mutasyonu saptanmamı tır.

KRas gen mutasyonu saptanan olgu 71 ya ında erkek hastaydı. Hastanın mesleki maruziyet öyküsü yoktu. Sigara kullanım öyküsü vardı. Hastanın mesane tümörünün patolojik tanısı T2G3 olarak saptanmı tır. Sistemik metastaz saptanmamı tır.



Ayrıca literatürde bildirilen KRAS geni 13. Kodon (G>T) Gly13Cys ve (G>A) Gly13Asp mutasyonları ile 12. Kodon (GG>CT) Gly12Leu ve (GG>AT) Gly12Ile mutasyonları çalışmamızda hiçbir hastada saptanmamıştır.

Çalışmamızda herhangi bir istatistik çalışmaya olanak vermeyen veriler elde edilmiştir. Küçük örnek olduğu için normal istatistiksel yaklaşımlar uygun olmamaktadır. Yapılan fisher-exact testi sonucunda da p-value her seferinde '1' olarak bulunmuştur.

5.TARTI MA ve SONUÇ

Mesane kanserlerinin %90-95'ini ürotelyal karsinomlar olu turur. Ürotelyal karsinomların %75-80'i tanı anında kasa invaze olmayan tümörlerdir . K OMK'nin ilk tanı anında %70'i Ta, %20'si T1 ve %10'u CIS (CIS)'dur (15,17).

K OMK'nin kabul görmü tedavi protokolü TUR-MT ve takiben intravesikal kemoterapi veya immunoterapiden olu ur. Genel olarak bakıldı nda makroskopik tümörlere uygulanan TUR ve bunu takiben verilen intravezikal terapi sonrasında tedaviye cevap %70-80'lere yakla maktadır. Bununla birlikte nüks ve progresyonsuz hayatta kalım oranları yüzeysel tümörün klinik evresine göre de i mektedir. Bu tümörler için ortalama nüks oranı %75, progresyon oranı ise %15-20 arasında bildirilmektedir. Ta papiller tümörü olan hastalarda ise %60-70 nüks ve %15 progresyon izlenmektedir. T1 tümörler de i ken ve kestirilemeyen biyolojik potansiyele sahip olan, ço unlukla yüksek dereceli, progresyon ve metastaz için yüksek risk ta ıyan tümörlerdir. T1G3'lü hastalardaki en önemli prognostik faktör e lik eden CIS varlı ıdır. Beraberinde CIS görülmeyen T1G3'lü hastaların 1. ve 5. yıldaki progresyon olasılıkları sırası ile %10 ve %29 olarak belirtilmi tir. T1G3 ve CIS birlikteli inde bu oran sırasıyla %29 ve %74 olarak bildirilmi tir . Yapılan retrospektif ara tırmalarda T1 ürotelyal karsinomlu hastaların %5-30'unda mesane kanserine ba lı ölüm bildirilmi tir. Veriler bu tümörlerin mortalite potansiyelini vurgulamaktadır. Bu hastaların hemen hemen tamamı, basit lokal progresyon sonucunda de il metastatik hastalık sonucu hayatını kaybetmektedir (15,17).

Lamina propria tabakası, kan ve lenfatik damarlardan oldukça zengindir. K MK olan hastaların büyük ço unlu unda lamina propriadaki lenfovasküler damarlar tutulmu tur. Bu bulgu mikrometastatik hastalık riskini belirgin derecede artırmaktadır. Bu yüzden mikrometastatik hastalık geli meden mesane kanserini ortadan kaldırmak hayati önem ta ımaktadır (17).

Sylvester ve arkada ları, toplam 2596 K OMK hastasını kapsayan 7 EORTC çalı masında nüks ve progresyonu predikte etmek amacıyla 6 klinik ve patolojik faktörü [nüks sıklı ı, tümör derecesi, invazyon derinli i (evre), tümör sayısı (çok odaklılık), tümör boyutu ve CIS birlikteli i] de erlendirmeye almı ve bu faktörlere göre bir skorklama sistemi düzenlemi tir. Buna göre 1. yıldaki nüks oranları %15-61 arasında de i mekte iken, progresyon oranları %1-17 olarak bildirilmi tir. 5. yıldaki nüks oranları ise % 31-78

arasında ve progresyon oranları % 1-45 olarak belirtilmiştir. Çalı ma klinisyenlere takip ve tedavi açısından yol gösterici olmasına rağmen, hala bazı hasta gruplarında hangi tedavi yaklaşımına karar verileceği konusunda kuşaklar devam etmektedir. Bu çalışmada yer verilmeyen ancak KOMK hastalarının seyrini kestirmekte faydalı oldukları gösterilmiş olan bazı histopatolojik faktörler de bulunmaktadır (17,52).

Mesane kanseri hastalarının prognozlarını kestirmek amacıyla biyolojik araştırma laboratuvarlarında tümör dokusu, idrar veya kan örnekleri kullanılarak ELISA, reverse transkriptaz PCR, floresans in situ hibridizasyon ve immunohistokimya teknikleriyle yapılan moleküler ve genetik çalışmalar sonucunda her geçen gün mesane kanseri ile ilgili yeni belirteçler bulunmaktadır (30,31,32).

Gen ekspresyonu microarray'lerinin (gen çipi) kullanımıyla mesane kanserinin evre, derece, progresyon ve metastaz yapma olasılıkları kestirilebilmektedir. Genomik instabilite üzerinde yapılan çalışmalar da prognozu ön görmek açısından oldukça yararlı bilgiler vermektedir, bununla birlikte genomik instabilitenin etkinliği gen ekspresyonundan daha düşük görünmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda mesane kanserinde prognozu predikte edebilecek belirteçlerden en değerlileri Ki-67 , fibroblast büyüme faktörü reseptörü-3 (FGFR-3) , vasküler epidermal büyüme faktörü (VEGF) , gen hipermetilasyonları , survivin , epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) , hücre siklusu belirteçleri ; E-Cadherin / kateninler ; N-Cadherin ; timidin fosforilaz (TF-Platelet Derived Endotelial Growth Factor) , NMP-22 ve Cox-2 olarak sıralanabilir. Fakat araştırmalar şu ana kadar hiçbir moleküler belirtecin sistoskopiyle yer de i tirecek duyarlılık veya özgüllü e sahip olmadığını göstermiştir (7,21,22).

P53 geninin hücre proliferasyonu, apoptozis ve genetik stabilitenin kontrolünde temel rolü bulunmaktadır. Immunohistokimyasal tekniklerle nükleus içinde p53 overekspresyonu saptanılması, p53 mutasyonu için bir işaret olarak kabul edilmiştir. Mesane kanserindeki moleküler belirteçler arasında en fazla araştırma konusu olanı p53'tür. Malats ve arkadaşları p53'ün mesane kanserinde nüks, progresyon ve mortaliteyi predikte etmedeki rolünü ortaya koymak amacıyla 1993-2003 yılları arasında yayınlanmış olan 698 orijinal makaleyi taramış ve 10026 mesane kanserli hastayı kapsayan toplam 117

ara tırma üzerinde bir metaanaliz yapımı lardır. 72 (%62) çalı manın Avrupa'da, 23'ünün (%16) A.B.D'de, 19'unun (%16) Asya'da ve 4'ünün(%3) dünyanın di er yerlerinde yapıldı ı bildirilen çalı maların meta-analizinde ortalama takip süresi 5,5 yıl olarak belirtilmi tir. Hastaların ortalama ya ı 66,1 olup bunların %82'si erkektir. Sadece 15 çalı manın (%13) prospektif oldu u bildirilmi tir. 3 çalı manın (%3) sadece K OMK olgularını, 9'unun (%8) sadece K MK olgularını ve di er 105'inin (%90) bütün tümör evrelerindeki olguları kapsadı ı ve bütün olgulardan %76'sının yüksek dereceli tümörü oldu u rapor edilmi tir. 6609 (%66) hastanın K OMK ve 3417 (%34) hastanın K MK oldu u bildirilmi tir. Çalı maların %20-25'inde cinsiyet ve ya gibi sosyodemografik bilgilerin eksik oldu u görülmü tür. P53 mutasyonu tespitinde 112 (%96) çalı mada immunohistokimyasal yöntemler kullanılırken, 5'inde (%4) moleküler analiz yapılmı tir. 70 çalı mada nüks, 42 çalı mada progresyon, 62 çalı mada mortalite, 10 çalı mada kemoterapiye cevap ve 4'ünde radyoterapiye cevap de erlendirilmi tir. 18 çalı mada (%16) sonuçlar yalnızca istatistikî testlerle ili kilendirilmi olup bunlarda hayatta kalım analizi yapılmamı tir. Sadece çalı mada çok de i kenli analiz yapılmı olup bunların birkaç tanesinde riskin sa kalım üzerindeki etkileri (hazard ratio) belirtilmi ve sadece 27'sinde %95 güven aralı ı bildirilmi tir. Çalı maların büyük ço unlu unda p53'teki de i iklikler ile K MK arasında ba lantı kurulmu tur. Bununla birlikte K MK normal popülasyonda ortalama %25 gibi oranlarda görülmekte iken meta-analizde K MK'li hastalara daha çok yer verildi i (%34) görülmü tür. Çok de i kenli analizler sonucunda p53'ün, tüm çalı maların %27'sinde nüks, %50'sinde progresyon ve %29'unda mortalite ile belirgin olarak ili kisi oldu u rapor edilmi tir (53).

Garcia-Rojo ve arkadaş ları 2008 yılında, p53'ün artımı ekspresyonu ve mesane kanserindeki prognostik önemini ortaya koymak amacıyla u ana kadar yayınlanmı en geni seri (1356 hasta) olan çok merkezli prospektif çalı malarını açıklamı lardır. Çalı manın sonucunda p53 ekspresyonu ile yüksek evre, yüksek derece, büyük tümör boyutu ve çok odaklılık arasında belirgin korelasyon oldu u bildirilmi tir. P53 overekspresyonunun %20'den fazla oldu u tümörlerde hastaların nüks, progresyon ve mortalite açısından anlamlı risk ta ıdıkları belirtilmi tir. Bu çalı madan elde edilen önemli veri, p53 ekspresyonunun K OMK hastalarında prognozu yeterli düzeyde predikte edemedi idir. Bu bulgu daha önce yapılan bazı ara tırma sonuçlarıyla çeli mektedir (54).

K OMK'deki takip protokolü konservatif tedavi yaklaşımları ile mesanenin korunmasına izin veriyor gibi görünmektedir. Ancak yakın aktif izleme rağmen bu süreç içerisinde bazı tümörler kasa invaze hale gelmektedir. Yüzeysel mesane kanserlerinin endoskopik takip sürecinde erken yakalanan evre T2 tümörün, ilk tanı anında T2 saptanan de novo hastalara göre daha iyi prognoza ve hayatta kalım oranlarına sahip olacakları düşünülmektedir. Mantıklı görünse de, TUR-MT sonrasında patolojik evrelemesinin normalden daha düşük olabileceği ve T2 evresindeki bir tümörün daha geç yakalanabileceği de akılda tutulmalıdır. Bir çalışmada takip sürecinde kasa invaze hale gelen yüzeysel mesane kanserli hastaların, de novo T2 tanısı alan mesane kanserli hastalara göre hayatta kalım süresi açısından belirgin dezavantajları oldukları ortaya konulmuştur. Yüksek dereceli T1 tümörlerde intravesikal tedaviye geçilmeden önce ilk TUR'dan 2 hafta sonra re-TUR yapılması önerilmektedir. T1 tümörler için re-TUR yapılması ile düşük evreleme riski bir miktar azaltılmıştır. Ancak radikal sistektomi yapılan T1 tümürlü hastaların yaklaşık %30'unda patolojik evrelemenin pT2 ve daha üstü olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak önemli bir hasta grubunda re-TUR yapılsa bile hala düşük evreleme yapıldığı görülmektedir (17).

Kısa süreli takiplerde mesane koruyucu yaklaşım (TUR-MT ve intravesikal kemoterapi veya BCG) ile takip edilen pT1 ürotelyal karsinomlu hastalarda %10-20 oranında progresyon bildirilmiştir (E). Uzun süreli takiplerde ise 15 yıldan sonra hastaların yarısının kasa invazif tümörelere ilerlediği ve üçte birinin mesane kanseri nedeniyle öldüğü belirtilmiştir (17).

K OMK'de intravesikal tedaviye yanıt çok önemli bir prediktif faktördür. Çünkü yüksek dereceli pT1 ürotelyal karsinomlarda ek tedavi yaklaşımları olmadan nüks gelişme riski %80'lere yaklaşmaktadır. Bundan sonraki yaklaşım tek doz intravesikal kemoterapi ile başlar ve takiben intravesikal BCG terapisiyle devam eder. BCG idame tedavisinin progresyonda %37 oranında azalma sağladığı bildirilmiştir. BCG idame tedavisi alan hastalarda median hayatta kalım süreleri, almayanlara göre 2 kat uzamaktadır (15,35).

Yüksek dereceli T1 tümörlerde TUR'u takiben BCG terapisi verilmesi kadar erken radikal sistektomi de kabul görmüş bir tedavi seçeneğidir. Yüksek dereceli T1 ürotelyal karsinomlu hastalarda intravesikal BCG'yi radikal sistektomi ile karşılaştıran prospektif çalışmaları henüz bulunmamaktadır. Literatürdeki hemen tüm sistektomi serilerinde daha

önceki intravesikal terapinin başarısız olduğu kasa invaziv olmayan ürotelyal karsinomlu hastalara odaklanılmıştır (55).

Radikal sistektominin benign bir prosedür olmadığını göstermektedir. Literatürde %3 ve altında operatif mortalite ve %20-30 morbidite yüzdeleri bildirilmektedir. Burada önemli olan üroloji uzmanının ne zaman sistektomi yapacağına karar vereceğidir (34).

Yüksek riskli K OMK'de radikal sistektominin zamanlaması hastaların prognozu ve uzun süreli hayatta kalımları açısından önemlidir; erken sistektominin sonuçları oldukça iyi görünmektedir. Tedaviye dirençli T1 veya CIS'li mesane kanseri hastalarında erken sistektomi sonrası yapılan patolojik değerlendirilmede kas tutulumu, ekstrasvesikal yayılım ve metastatik hastalığa ait bulgular saptandıında, gecikmiş sistektomi yapılanlara göre belirgin derecede daha iyi prognoza sahip oldukları görülmüştür. Bununla birlikte hastalığın progresyon gösterdiğinin ortaya konulması ve gecikmiş sistektomi yapılması durumunda hayatta kalımın dramatik bir şekilde düştüğü belirtilmiştir. Erken sistektomi yapılır ve patolojik evreleme T1 olarak bulunursa uzun süreli kansere özgü hayatta kalım oranları %95'tir. Bunun yanı sıra radyoloji ve patoloji tekniklerindeki gelişmelere rağmen klinik T1 hastalarının %34-75 oranında düşük evrelendirildiği rapor edilmiştir (15,17,36).

Klinik T1G3 hastalarda erken sistektominin 3 primer avantajı vardır. Öncelikle mesane kanseri için güçlü prediktörler olarak bilinen patolojik evreleme ve lenf nodu durumu ortaya konulmaktadır. Bu okült metastatik hastalığı olan yüksek riskli gruba selektif adjuvan terapiler düzenlenmesine (sistemik kemoterapi) olanak sağlar. İkinci olarak, erken evre tümörde sinir koruyucu sistektomi ile beraber kontinan ileal neobladder oluşturulabilir. Böylece seksüel fonksiyonlar korunurken doğala yakın bir yaşam sürdürülmektedir. Bu cerrahi yaklaşım büyük T2 tümörlerde veya geniş ekstrasvesikal yayılım olan durumlarda oldukça problemlidir. Son olarak, sistektomi hastalarda geç nüksleri büyük oranda azaltır. Takip protokolü de oldukça basittir ve 3. yıldan sonra iyice azalır. Taoluumu, üreteral striktürler veya üst üriner trakt veya üretral nüksler, radyolojik ve laboratuvar değerlendirilmeyle takip edilebilecek oldukça nadir durumlardır (15,34).

Klinisyen yüzeysel mesane kanserli hastayı takip ederken oldukça dikkatli olmak zorundadır. Konservatif tedaviyi bırakıp sistektomi kararı almak için çok iyi zamanlama

yapmak arttır. Klinik olarak düşük evreleme yapılabilmesi, tümör nüksü ve progresyonu olasılığı ve ölüm riski göz önüne alındığında yüksek riskli hastalarda radikal sistektomiyi tercih etmek için geç kalınmamalıdır. Bu yararların ötesinde radikal sistektomi ile önemli prognostik bilgi sağlanmakta ve patolojik kriterlere dayanarak gerekirse hastaya adjuvan terapi verilebilmektedir (7, 56).

Uzun süreli için elimizde konservatif tedavi sürecindeki mesane kanserlerinin kasa invaze hale geçmelerini engelleyecek bir takip protokolü mevcut değildir. EAU multipl rekürren tümörlerde, yüksek derece'li T1 tümörlerde, CIS'in eklenmesiyle birlikte yüksek dereceli tümörlerde ve intravesikal immunoterapiye dirençli tümörlerde erken radikal sistektominin tercih edilebileceğini belirtmektedir (7,57). Bununla birlikte uzun süreli takibi olan çalışmalarda intravesikal BCG terapisi alan T1G3 hastalarının yaklaşık üçte birinde hiç nüks görülmediği bildirilmiştir (17,58). Eğer bu hastaları klinik olarak ayırt edebilirsek radikal sistektomi bu olgularda oldukça gereksizdir.

Hangi hastada kanserin progresyon göstererek KMK gelişmesini kestirmek oldukça güçtür. Bugüne kadar belirlenmiş olan önemli belirteçlerin mesane kanserinde nüks ve progresyon riskini ortaya koyarak klinik tedavi ve takip yaklaşımlarına katkı tutmaları beklenmektedir. Gelişen teknolojiler ve güvenilir belirteçlerin rutin klinik kullanıma sokulmasıyla, bu hastalardaki morbidite ve mortalite oranlarında belirgin azalma olacaktır ve tedavi süreçlerinde de ekonomik açıdan bir avantaj sağlanacaktır. Bu amaçla, mesane kanserinde hedef olarak seçilecek kitle KMK'li hastalar olmalıdır. Bir belirteçten beklenen hangi tümörün kasa invaze hastalığı ilerleme potansiyelinin yüksek olduğunu ortaya koyarak, üroloji uzmanı tümör kasa invaze hale geçmeden önlem almasını sağlaması ve gerektiğinde konservatif tedavide ısrar etmeyip erken sistektomi kararını almada yardımcı bir araç olmasıdır. Bu nedenle araştırmamızda amacımız, Ras/Raf protoonkogen ekspresyonlarının prognozu ve özellikle evre T2'ye progresyonu predikte edebilecek güvenilir bir belirteç olup olmayacağını ortaya konulmasıydı. Böylelikle özellikle yüksek dereceli T1 tümörlerde ciddi risk grubunun belirlenmesi ile doğru seçilmiş hastalarda konservatif tedavi yaklaşımlarında uzun süre ısrarlı olmayıp, erken radikal sistektomi kararı almada Ras/Raf protoonkogenlerinden yararlanılabilecekti.

46 hastayı kapsayan çalı mamızda ilk tanı anındaki patolojik evreler 8 hastada (% 17,3 Ta) yüzeysel, 19 hastada (% 41,3 T1) ise lokal invaziv, 19 hastada (% 41,3) invaziv olarak saptandı.

Olguların izlem sırasında ilk kontrollerinde 9'unda (% 19,5) nüks, nüks eden hastaların 1'inde (% 11,1) progresyon görülmü tür.

Bir olguda KRAS geninin 12. Kodonunda GGT>AGT transisyonu sonucu meydana gelen Gly12Serin aminoasidine de i imine yol açan bir mutasyonu saptanmı tır. Bu olguda BRAF mutasyonu saptanmamı tır. Di er bir olguda da KRAS geninin 12. Kodonunda (GG>AT) Gly12Ile mutasyonu ve 13. Kodonunda (G>A) Gly13Asp mutasyonları saptanmı tır.

Ayrıca literatürde bildirilen KRAS geni 13. Kodon (G>T) Gly13Cys ve 12. Kodon (GG>CT) Gly12Leu mutasyonları çalı ma grubumuzda hiçbir hastada saptanmamı tır.

RAS mutasyonları ilk kez insan mesane kanser hücre hattı T24'te saptandı. Mesane kanserli hastalarda de i ik RAS gen mutasyon oranları bildirilmı tır (38). Hiç RAS mutasyonu belirlemeyen seriler mevcutken %84 gibi yüksek mutasyon oranları bildiren seriler mevcuttur. Bu çalı malarda daha çok HRAS mutasyonları de erlendirilmı tır.

nsan mesane tümörlerinde RAS gen mutasyonlarını ara tıran pek çok çalı ma yapılmı tır. Tümörögeneziste yer alan pek çok aktif RAS mutasyonu bildirilmı tır. RAS mutasyonların insidansı de i kendir ve büyük oranda kanser hücrelerinden üretilen doku ya da hücre tipine ba lıdır. Genetik yapısı de i tirilmı fareler üzerinde yapılan bir deneysel çalı mada bir K-ras transgeninin doku spesifik salınımı sonucu ürotelyal hiperplazi ve yüzeysel papiller tümör olu tu u gözlenmi tır (38). Bu gözlem RAS aktivasyonunun mesanedeki karsinogenezisin erken basamaklarına etki etti ini göstermektedir.

Kültüre olmamı mesane tümörlerinin analizi örneklerin yalnız %10'unun mutasyona u ramı HRAS içerdi ini gösterdi (41,63). Buna ra men, sonraki raporlar daha sık oranlar bildirdiler. Fitzgerald ve arkadaşları mesane kanserli hastaların idrar sedimentlerinde %44 oranında HRAS gen mutasyonları bildirdi (38). lave olarak, Przybojewska ve arkadaşları PCR kullanarak mesane kanserli hastaların %84'ünde HRAS

mutasyonu bulmuşlardır (43). Czerniak ve arkadaşları HRAS mutasyonlarının, mesane kanserlerinin %45'inde spesifik olarak kodon 12 ile bağlantılı olduğunu gözlemlediler (38). Diğer taraftan kodon 12'de RAS mutasyonunun pek çok düzeyi son zamanlarda mesane kanserinde bildirilmiştir. Zhu ve arkadaşları ve Buyru ve arkadaşları kodon 12'de HRAS nokta mutasyonlarını sırasıyla %46,7 ve %39 oranında bildirmişlerdir (59). Yine bu çalışmaların bazılarında mesane kanserli hastalarda RAS gen alt gruplarının hangi sıklıkta mutasyona uğradığı araştırılmıştır. Bu çalışmalar üriner sistem tümörlerinde HRAS mutasyonlarının KRAS ve NRAS gen mutasyonlarından çok daha sık gözlemlendiğini gösterdi. Jebar ve arkadaşları 98 mesane tümörü ve 31 mesane hücre hattında RAS mutasyonlarını örneklerin her ikisinde de %13 oranında saptadılar (38). Totalde HRAS'ta 10 mutasyon, KRAS'ta 4, ve NRAS'ta 4 mutasyon vardı. Kompier LC ve arkadaşlarının 257 mesane kanserli hasta grubunda yaptıkları çalışmada 28 hastada RAS mutasyonu (%11) saptamışlardır. Bu mutasyonların 14 tanesi HRAS, 13 tanesi KRAS ve 1 tanesi NRAS geninde gözlemlenmiştir (6).

Yukardaki tartışmaların tersine Karimianpour ve arkadaşları 35 hastalık bir mesane kanser serisinde hiçbir hastada herhangi bir düzeyde RAS gen ailesinde mutasyon saptamamışlardır. Bu çalışmaları olan toplumunda yapılan bir çalışmadır. Araştırmacılar RAS gen mutasyonunun olmamasını genetik ve kültürel durumla bağlantılı olabileceğini bildirmişlerdir (38). Başka bir çalışmada Hindistan'ın Kaimir bölgesindeki mesane kanserli hastalarda K-ras gen mutasyonu sıklığı araştırılmıştır (38). Bu çalışmada farklı evre ve derecedeki 60 tümörde mutasyon insidansı incelenmiştir. K-RAS mutasyonlarının sıklığı etnik Kaimir topluluğunda da düşük oranda (%11,7) bulunmuştur. Bu çalışmalar RAS mutasyon sıklığının etnisiteden etkilendiğini göstermektedir. Yine bu son çalışmada K-RAS mutasyon sıklığı lenf nodu tutulumu ve tümör rekürrensi ile korele bulunmuştur. Ayrıca sigara içenlerde ve yüksek dereceli tümörü olan hastalarda oran yüksek bulunmuştur (38).

Ayan ve ark. sınırlı sayıda mesane tümör dokularında DNA izole etmişlerdir. Elde ettikleri DNA'lardaki KRas genlerini PCR-SSCP yöntemi ile analiz etmişlerdir. Bir hastada KRas onkogeninin 2. ekzonunda agaroz jel elektroforezinde heterozigot mutasyon saptamışlardır. 4 hastada, SSCP yöntemi ile nokta mutasyonları saptamışlardır. Örnek sayısı az olmasına rağmen bulgular anlamlıdır (59).

Bilindi i üzere Fosfolipaz- D aktivasyonunun baskılanması apoptotik hücrelerin ölümü ile sonuçlanırken, fosfolipaz- D 'nin yükselmesi kanser hücrelerinde ya am sinyalinin olu masını sa lamaktadır. Fosfolipaz-D aktivasyonunun artması Ras'a ba ımlıdır. Aktive olmu fibroblastlarda Shi ve ark. yaptıkları çalı mada HRas mutasyonlarının fosfolipaz D artı ma, böylece kanser geli imine sebep oldu unu saptamı lardır (61).

Otofaji kanser geli iminde esansiyeldir. Otofajinin kanser olu umundaki moleküler etkisi bilinmemektedir. Deneysel çalı malarda retrovirüs aracılı ıyla K-Ras a ırı ekspresyonu sa lanmakta, bu da otofajik valuol olu umuna neden olmaktadır. Sonuçta insan hücrelerinde malign transformasyon geli mektedir. Kim ve ark. onkojenik K-Ras'ın indükledi i kanserli hücretransformasyonunda otofajinin etkisini ara tırmı lardır. Otofajinin K-Ras'ın a ırı eksprese oldu u hücrelerde hücre transformasyonu için gereklili i ara tırıldı. Bunun için hücreler otofajinin ilk basamak enzimlerinin inhibitörleri bafilomycin A2 (selektif vakuolar H-ATPaz inhibitörü) ve methyladenin (class 3 phosphatidylinositol 3 kinases ,PI3Ks inhibitörü) ile beslendi. Sonuçta K-Ras'ın aktifle tirdi i hücre büyümesi ve otofaji olu umu bloke oldu. Böylece insan hücrelerinde K-Ras'ın aktifle tirdi i kanser hücrelerinde transformasyonda otofajik vakuol olu umu kritik role sahiptir (43).

Wnt sinyal yola ı (nükleer -catenin) üretelial hücreli mesane kanserlerinin (ÜHMK) yakla ık %25'inde rol oynamaktadır. Ahmad ve ark. Ras mutasyonlarının tetikledi i mesane tumörögenesinde -catenin aktifle mesinin rolünü ara tırmı lardır. Bu ili ki dolayısıyla MAPK sinyalizasyonun ÜHMK'deki rolü -catenin mutasyonunun Ras mutasyonu ile kombine ili kisinin Cre-LoxP teknolojisiyle ara tırılmasıyla saptanmı tır. Ne Ras mutasyonu ne de -catenin mutasyonu ÜHMK'a tek ba larına sebep olamazken, beraber rastlandıklarında ÜHMK hızlıca geli ir. ÜHMK'da Ras mutasyonu ve -catenin ili kisi p21 düzeylerinde azalmayla ve MAPK sinyal yola ına ba ımlıdır (62).

Çalı mamızda olguların 45 (%97.8)'inde T1796A transversiyonuna ba lı B-Raf V600E mutasyonunun varlı ı tespit edilmi tir. Literatürde V600E mutasyonunun kanser örneklerinde görülme sıklı ının yakla ık %90 oldu u belirtilmektedir. Bizim çalı ma grubumuz da mesane kanserli dokulardan elde edilen DNA'larda B-Raf mutasyonu açısından anlamlı sonuçlar elde edilmi tir.

Ras/Raf MAPKinaz yola ındaki genler kolon kanserinde erken evrelerde rol almaktadır.(71)

DNA mismatch repair genleri kolon ve endometrium kanserlerinde yüksek evrede rol alır.(72,73)

MMR azalmı ekspresyonları kolon kanserinde K-Ras ve B-Raf mutasyonlarının ortaya çıkmasıyla ili kilidir (74,75). B-Raf mutasyonları özellikle kolon, melanom, tiroid ve over kanserlerinde saptanır (76,77,78). B-Raf kolon kanserinde %15 saptanmı tır (79). MMR ekspresyon azalı ında B-Raf %32 saptanmı tır (80). Mutah ve ark., K-Ras 12,13,61 mutasyonlarının sırasıyla %19.9 ,3.4 ve 0.7 oranında saptamı ve MMR ekspresyon azalı ıyla pozitif korelasyon saptamı lardır (82).

Fenk ve Ark., B-Raf mutasyonunu %21 oranında saptamı lardır (81). Solvesen ve Ark. MMR ve endometriyel kanser arasında ili ki saptamı lardır (82). Fakat MAP- kinaz Ras-Raf genleriyle ili ki saptanması MMR bozukluklarında yeni hedef genlerin bulunmasına ihtiyaç göstermektedir.

Sonuç olarak, RAS/RAF/MAP kinaz yola ında meydana gelen çe itli mutasyonların pek çok kanserle ili kili oldu u literatürde belirtilmektedir. Ara tırmamızda 45(%97.8)'inde T1796A transversiyonuna ba lı B-Raf V600E mutasyonunun varlı ı tespit edilmi tir. Ayrıca çalı mamızda tek bir olguda K-Ras mutasyonunun saptanması Türk toplumunda mesane kanserine yatkınlıkta önemli bir rolü olmadı nı göstermi tir. Bir Ras efektör proteini olan B-Raf'ta meydana gelen mutasyonlar proteinlerin aktivitelerini etkileyerek yola ın normal dı ı çalı masına ve kanser hücrelerinin kontrolsüz hücre büyümesi, kontrolsüz farklılaşma ve apoptoza direnç gibi özellikler kazanmalarına yol açmaktadır.

Çalı ma grubumuzda, aynı hastaların kan, sa lıklı ve tümör dokularından elde edilen genomik DNA larda ilgili mutasyonlar çalı ılmı tir. Aynı bireyin kan ve sa lıklı mesane dokularında RAS/RAF/MAP kinaz yola ında hiçbir mutasyon saptanmazken, bu bireylerin tümörlü dokularında sinyal yola ının farklı basamaklarında de i ik mutasyonlar tespit edilmi tir.

Tümöre ba lı olarak bozuldu unu dü ündü ümüz sinyal yolunun her ne kadar tümör geli imine neden olmadı nı tespit etmi olsak da tümörün progresyonu, invazyonu,

metastazı ve prognozu açısından objektif veriler elde edebilmek için hasta sayıları artırılarak çalı ılmaya devam edilmesi gerekmektedir.

Sinyal yolunda farklı nedenler ile meydana gelen mutasyonların mesane dokusunda kanserle meye neden oldu u literatürde yer almaktadır. Ancak, çalı mamızın sonucunda tümör geli imine ba lı olarak sinyal iletiminin bozuldu unu ayrıca mesane kanserinin tümörögenезisinde farklı patwaylerin rol oynadı ını dü ünmekteyiz.

Erdem ÇAPAR, 2012.

ÖZET

Mesane Kanserinde K-Ras ProtoOnkogen Mutasyonlarının Ara tırılması

Erdem ÇAPAR

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Ana Bilim Dalı

Danı man: Prof. Dr. Alim Ko ar

Giri : Yüzeysel mesane tümörlü hastaların %70'den fazlasında ba langıç TURM (mesane transüretal rezeksiyonu) sonrası bir veya daha fazla rekürrens gözlenir, ve yakla ık bu hastaların üçte birinde hastalık progresyon gösterir. Rekürrens ve progresyon hızı nedeniyle mesane kanserinde hayat boyu sistoskopik kontrole ihtiyaç duyulur.

Bu nedenle tedavi hedeflerini belirlemek ve üretelyal tümörlerin tanısında sistoskopinin etkinli ini arttırmak için onkogenik mutasyonların tesbit edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

nsan kanserlerinde RAS/RAF/MAPKinaz yola ı protoonkogenlerinin mutasyonları en sık görülen genetik de i ikliklerdendir. somatik mutasyonlar primer ve rekürren üretelyal tümörlerde erken tanıda ve tedavi takibinde kullanılabilir.

Materyal ve metod: Çalı mamıza histolojik tanıları konulmu 46 mesane kanserli olgunun tümörlü dokuları, sa lıklı dokuları ve kanlarından elde edilen DNA'larda ilgili mutasyonların kar ıla tırılması planlanmı tır. Dokularında BRAF ve KRAS proto-onkojeni polimorfizmlerini saptamak için polimeraz zincir reaksiyonu tekni ine dayalı MassARRAY® teknolojisi (PLEX®) ile tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) genotipleme tekni i kullanılmı tır.

Bulgular: Olguların tümör dokularında 45(%97.8)'inde T1796A transversiyonuna ba lı BRAF V600E mutasyonunun varlı ı tespit edilmi tir. Bir olguda KRAS geninin 12. Kodonunda GGT>AGT transisyonu sonucu meydana gelen Gly12Serin aminoasidine de i imine yol açan bir mutasyonu saptanmı tır. Bu olguda BRAF mutasyonu saptanmamı tır. Çalı mamızda herhangi bir istatistik çalı maya olanak vermeyen veriler elde edilmi tir. Küçük örnek oldu u için normal istatistiksel yakla ımlar uygun olmamaktadır. Yapılan fisher-exact testi sonucunda da p-value her seferinde '1' olarak bulunmu tur.

Sonuç olarak, RAS/RAF/MAP kinaz yola nda meydana gelen çe itli mutasyonların pek çok kanserle ili kili oldu u literatürde belirtilmektedir. Ara tırmamızda 45(%97.8)'inde T1796A transversiyonuna ba lı B-Raf V600E mutasyonunun varlı ı tespit edilmi tir. Ayrıca çalı mamızda tek bir olguda K-Ras mutasyonunun saptanması Türk toplumunda mesane kanserine yakınlıkta önemli bir rolü olmadı ını göstermi tir. Bir Ras efektör proteini olan B-Raf'ta meydana gelen mutasyonlar proteinlerin aktivitelerini etkileyerek yola ın normal dı ı çalı masına ve kanser hücrelerinin kontrolsüz hücre büyümesi, kontrolsüz farklıla ma ve apoptoza direnç gibi özellikler kazanmalarına yol açmaktadır.

Anahtar kelimeler: onkojenler, mesane kanser

ABSTRACT

Investigation of K-Ras Protooncogene Mutations in Bladder Cancer

Erdem ÇAPAR

Süleyman Demirel University, Medical Faculty, Urology Department

Supervisor: Prof. Dr. Alim KO AR

Objectives: After initial TURB, 70% of patients with non-muscle-invasive bladder cancer have develop one or more recurrences and one third of them will progress to invasive tumor. The recurrence risk and risk of progression necessitate a life-long follow-up by cystoscopy. Otherwise, it is necessary to discover oncogenic mutations to increase effectiveness of cystoscopy for diagnosis of urothelial tumors, and to determine therapy targets.

RAS/RAF/MAP Kinase pathway protooncogene mutations in the human cancers are the most common observed genetic alterations. In urothelial tumors somatic mutations in the RAS/RAF/MAP Kinase pathway genes may be of use for early detection of primary and recurrent tumors, for follow up targeted therapies in tissue-based assays.

Materials and methods: We planned to compare the mutations in the DNA obtained from tumor tissues, healthy tissues and blood of 46 patients who were diagnosed bladder cancer histologically. To determine BRAF and KRAS proto-oncogene polymorphisms we used MassARRAY[®] (PLEX[®]) single nucleotid polymorphism genotyping technic based on the technique of polymerase chain reaction.

Results: We determined BRAF V600E mutation based on T1796A transversion in the tumor tissues of 45 (%97.8) patients. And we determined Gly12Serin mutation at the twelfth codon of KRAS gene based on GGT>AGT transition in only one patient. This patient hasn't got BRAF V600E mutation. There were no mutation in the healthy tissues and blood of 46 patients. The normal approximation may be inaccurate for small samples in statistical analyses. Fisher's exact test: P-Value = 1,000.

Conclusions: A variety of mutations that occur in RAS/RAF/MAP kinase pathway is reported in the literature to be associated with a wide variety of cancer types. In our study the incidence of BRAF V600E mutations in bladder cancer patients is %97.8. Kras mutation doesn't play a role in bladder cancer susceptibility in the Turkish population.

Mutations that occur in BRAF, is a RAS Effector protein, shows the uncontrolled growth, differentiation and resistance to apoptosis of the cells by affecting the activity of proteins and by causing abnormal operation of the pathway.

We studied related mutations in the same patient's tumor tissues, healthy tissues and blood tissues. While in the tumor tissues various mutations have been identified in different stages of the signaling pathway, there were no mutation in the healthy tissues and blood of 46 patients.

Though we think the deterioration of signaling pathways is of tumor-related, we found signaling pathways is not cause of tumor development.

Therefore to evaluate progression, invasion, metastasis and prognosis of the tumor, we need to add more cases to the study.

A variety of mutations that occur in cell signal pathway is reported in the literature to be associated with canceration of bladder. But we claim that deterioration of signaling pathways is of tumor-related and carcinogenesis is related to different pathways.

Key Words: onkogenes, bladder cancer

KAYNAKLAR

1. Horner MJ, Krapcho M, Neyman N et al. SEER cancer statistics review, 1975-2007, national cancer institute. (available at http://www.seer.cancer.gov/csr/1975-2007/results_merged/seut_27_urinarybladder.pdf. accessed january 7,2011.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, ferlay J, ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Ca Cancer J Clin.*2011 Mar-Apr; 61(2):69-90.Epub 2011 Feb 4. (available online at <http://cajournal.org> and <http://cacancerjournal.org>)
3. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancerstatistics 2010. *Ca Cancer Jclin.* 2010 sep- oct; 60(5):227-300.Epub 2010 jul7. (available online at <http://cajournal.org> and <http://cacancerjournal.org>)
4. Black PC, Agarwal PK, Dinney CP. Targeted therapies in bladder cancer–an update. *Urol Oncol* 2007;25:433– 8.
5. Grosman HB, Gomella L, Fradet Y, Morales A, Presti J. A phase 3, multicenter comparison of hexaminolevulinate fluorecanse cystoscopy and white light cystoscopy fort he detection of superficial lesions in patients with bladder cancer. *J Urol* 2007; 178: 62-67.
6. Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MNM, van Rhijn BWG, van der Kwast TH, et al. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA Mutations in Bladder Cancer and Their Potential as Biomarkers for Surveillance and Therapy. *PLoS ONE* 2010;5(11): e13821.
7. Stenzl A, Cowan NC, Santis M, Kuczyk M, Merseburger AS, Ribal MJ, Sherif A, Witjes JA. Guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *European Association of Urology Guidelines* 2010.
8. Özen H, Türkeri L. *Üroonkoloji kitabı*. Ankara: Ertem Basım Yayın, 2007: 151-257.
9. Brooks JD. *urinary tract anatomy*, kitap, Wals PC, Retik AB, Wein AJ, Vauhan ED. *Campbell's Urology*, Saunders, 2005;41-80.
10. Junquera L.C, Carneiro J, Kelley R.O: Basic Histology. Aytekin Y. (Çeviri editörü). *Temel histoloji*. 8. baskı. Bari kitapevi, 1998;375-377.
11. Eble JN, Epstein JI, Souter A, Sesterhenn I. Who classification of tumors: Pathology and genetics. Tumors of the urinary and male reproductive system. Lyon, France:IA RC Press 2004.
12. Lott S, Wang M. Zang S. FGFR3 and TP53 mutation analysis in inverted urothelial papilloma: incidence and etiological considerations. *Mod pathol* pub year 2009;22:627-32.
13. Jones D, Zhang S, Lopez-Beltran A. Urothelial carcinoma with an inverted growth pattern can be distinguished from inverted papilloma by fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry and morpholojic analysis. *Amj Surg Pathol.*2007;31:1861-7.
14. Hodges KB, Lopez- Beltran A, Maclennan GT, Montironi R, Cheng L. Urothelial lesions with inverted growth patterns, histogenesis,molecular genetic findings,

- differential diagnosis and clinical management . BJU international, 2011; 107:532-537.
15. Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010: How far have we come? CA Cancer J Clin 2010; 60:244-272.
 16. Montironi R, Lopez-Beltran A, The 2004 WHO classification of bladder tumors: A summary and commentary. INT J surg pathol,2005;13(2):143-153.
 17. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J, Rouprêt M. Guidelines on Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. European Association of Urology Guidelines 2010.
 18. Bedük Y. kasa invaze olmayan mesane kanserinde ne de i ti? *üroonkoloji bülteni*, sayı 2, haziran 2008.
 19. Bircan K, Gedik A. Mesane Kanserlerinde Semptomlar, Tanı ve Evreleme.Özen H, Türkeri L (editörler). *Üroonkoloji kitabı* 1. basım ertem yayıncılık, 2007; 191–200.
 20. Cordon-Cardo C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. Scand J Urol Nephrol Suppl. 2008; 154–65.
 21. Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder Tumorigenesis. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. 2010;28: 401–408.
 22. McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tren M, Majewski T. Molecular genetics of bladder cancer; emerging mechanisms of tumor initiation and progression. Urologic oncology:seminers and original investigations. 2010;28: 429-440.
 23. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: A marker for disease progression. J Natl Cancer Inst. 1993;85:53–9.
 24. Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Saez GT, et al. p53 mutations in human bladder cancer: Genotypic versus phenotypic patterns. Int J Cancer. 1994;56:347–53.
 25. George B, Datar RH, Wu L, et al. p53 gene and protein status: The role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer. J Clin Oncol. 2007;25:5352– 8.
 26. Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, et al. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. Cancer Res. 1997;57:1217–21.
 27. Schroeder GL, Lorenzo-Gomez MF, Hautmann SH, et al. A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection. J urol. 2004; 172:1123-6.
 28. Grossfeld GD, Wolf JS, Litwan MS, et all. Asymptomatic microscopic hematuria in adults: summary of the AUA best practice policy recommendations. Am Fam Physician. 2001;63:1145-1154.
 29. Johnson EK, Daignault S, Zhang Y, Lee CT. Pattern of hematuria referral to urologists:does a gender disparity exist? Urology. 2008;72:498-502.

30. Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *CUAJ*, June 2008 ; 2 (3): 212-21.
31. Mitra AP, Cote RJ. Molecular Pathogenesis and Diagnostics of Bladder Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2009;4:251–85.
32. Piyush K. Agarwal · Peter C. Black · Ashish M. Kamat. Considerations on the use of diagnostic markers in management of patients with bladder cancer. *World J Urol.* 2008;26:39–44.
33. Weider AM, Brausi M, Lamm D. et al. Management of stage T1 tumors of the bladder: international consensus panel. *Urology.* 2005;66:108-125.
34. Montie JE, Clark PE, Eisenberger MA, et al. Bladder cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009;7:8-39.
35. Malstrom PU, Sylvester RJ, Crawford DE, et al. An individual patient data randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus calmette-guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2009;56:247-256.
36. O'Donnell MA, Boehle A. Treatment options for BCG failures. *World J urol.* 2006;24:481-487.
37. Watzinger F, Lion T. RAS family Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 1999;<http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/Ras.html>.
38. Nanda MS, Sameer AS, Syeed N, Shah ZA, Murtaza I, Siddiqi MA, Ali A. Genetic Aberrations of the K-ras Proto-oncogene in Bladder Cancer in Kashmiri Population. *Urol J.* 2010;7:168-73.
39. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:295-308.
40. Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH, Goeddel DV. Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature.* 1983;302:33-7.
41. Levesque P, Ramchurren N, Saini K, Joyce A, Libertino J, Summerhayes IC. Screening of human bladder tumors and urine sediments for the presence of H-ras mutations. *Int J Cancer.* 1993;55:785-90.
42. Smit VT, Boot AJ, Smits AM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:7773-82.
43. Kim MJ, Woo SJ, Yoon CH, Lee JS, An S, Choi YH, Hwang SG, Yoon G, Lee SJ. Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *The journal of biological chemistry.* april 15,2011;286(15):12924-12932.
44. <http://www.ensembl.org/index.html>
45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
46. <http://www.sanger.ac.uk/>

47. <https://www.mysequenom.com/Home>
48. MassARRAY[®] Analyzer 4 Instrument User's Guide UG 161099 Rev1.0 CO 100123 June 3, 2010.
49. Sequenom application overview v1.2 January 2010.
50. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. PMID:19170031.
51. Mutational spectrum in the cardiac transcription factor gene NKX2.5 (CSX) associated with congenital heart disease. PMID:20456451.
52. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, Newling DW, Kurth K, Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European Urology*. 2006 Mar;49(3):466-5; discussion 475-7.
53. Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rivas M, Puente, Kogevinas M, Real FX: P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a metaanalysis and review. *Lancet Oncol* 2005; 6: 678–86
54. Garcia-Rojo D, Malats N, Abad C, Lloreta J, Kogevinas M, Tardon A, Prera A, Serra C, Carrato A, Garcia-Closas R, Prats J, Gelabert A, Real FX: P53 In Bladder Cancer Prognosis. Results From A Prospective Multicentric Study in Spain. *The Journal Of Urology* 2009 May 20: 179(4).
55. Nieder AM, Simon MA, Kim SS, et al. Radical cystectomy after bacillus Calmette-Guérin for high-risk Ta, T1, and carcinoma in situ: Defining the risk of initial bladder preservation. *Urology* 2006;67: 737–41.
56. Stein JP. Indications For Early Cystectomy. Editorial. *Urology* 62: 591–595, 2003
57. Jichlinski P, Guillou L, Karlsen SJ, et al. Hexyl aminolevulinic acid fluorescence cystoscopy: new diagnostic tool for photodiagnosis of superficial bladder cancer: a multicenter study. *J Urol* 2003;170:226–9.
58. Shahin O, Thalmann GN, Rentsch C, et al. A retrospective analysis of 153 patients treated with or without intravesical bacillus Calmette Guérin for primary stage T1 grade 3 bladder cancer: Recurrence, progression, and survival. *J Urol* 2003;169:96 – 100.
59. Ayan S, Gokce G, Kılıcarslan H, Ozdemir O, Yıldız E, Gultekin EY. K-Ras mutation in transitional cell carcinoma of urinary bladder. *International Urology and Nephrology* 2001;33: 363–367.
60. Przybojewska B, Jagiello A, and Jalmuzna P. H-RAS, K-RAS, and N-RAS Gene Activation in Human Bladder Cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;121:73–77.
61. Ming Shi, Yang Zheng, Avalon Garcia, Lizhong Xu 1, David A. Foster. Phospholipase D provides a survival signal in human cancer cells with activated H-Ras or K-Ras. *Cancer Letters* 258 (2007) 268–275.

62. Ahmad I, Patel R, Liu Y, Singh LB, Taketo MM, Wu X-R, Leung HY, Sansom OJ. Ras mutation cooperates with β -catenin activation to drive bladder tumorigenesis. *Cell death and diseases* (2011) 2, e124.
63. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988;53:549-54.
64. Niaux TS, Baccharini M. Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2010;31: 1165–1174.
65. White MA, Nicolette C, Minden A, Polverino A, Van Aelst L, et al. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* 1993 ;80: 533-541.
66. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, ve Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch repair status. *Nature* 2002;418: 934.
67. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417 (6892): 949-54.
68. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33(1):19-20.
69. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 2003;1653(1):25-40.
70. Kumar R, Angelini S, Czene K, Sauroja I, Hahka-Kemppinen M, Pyrhönen S, et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003;9(9):3362-8.
71. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B and Velculescu VE: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418: 934, 2002.
72. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, Tannergard P, Bollag RJ, Godwin AR, Ward DC, Nordenskj M, Fishel R, Kolodner R and Liskay LM: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368: 258-261, 1994.
73. Simpkins SB, Swisher EM, Mutch DG, Gersell DJ, Kovatich AJ, Palazzo JP, Fishel R and Goodfellow P: MLH1 promoter methylation and gene slicing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet* 8:661-666, 1999.
74. Oliveira C, Westra JL, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A, Velho S, Niessen R, Lagerstedt K, Alhopuro P, Laiho P, Veiga I, Teixeira MR, Ligtenberg M, Kleibeuker JH, Sijmons RH, Plukker JT, Imai K, Lage P, Hamelin R, Albuquerque C, Schwartz S Jr, Lindblom A, Peltomaki P, Yamamoto H, Aaltonen LA, Seruca R and

- Hofstra RM: Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum Mol Genet* 13: 2303-2311, 2004.
75. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, Ohki R, Choi YL, Wada T, Konishi F, Nagai H and Mano H: Mutation of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 108: 237-242, 2004.
76. Maldonado JI, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D and Bastian BC: Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 95: 1878-1880, 2003.
77. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guz Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW and Sidransky D: BRAF mutation in papillary thyroid. *J Natl Cancer Inst* 95: 625-627, 2003.
78. Singer G, Oldt R III, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ and Shih IeM: Mutation in BRAF and KRAS characterize the development of low grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95: 484-486, 2003.
79. Wellbrock C, Karasarides M and Marais R: The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 875-885, 2004.
80. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Tersiman JP, Allen BA, Truta B, Sleisenger MH and Kim YS: *BRAF* mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10: 191-195, 2004.
81. Feng YZ, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Kurai M, Suzuki A and Konishi I: BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. *Clin Cancer Res* 11: 6133-6138, 2005.
82. Salvesen HB, Kumar R, Stefansson I, Angelini S, MacDonald N, Smeds J, Jacobs IJ, Hemminki K, Das S and Akslen LA: Low frequency of BRAF and CDKN2A mutations in endometrial cancer. *Int J Cancer* 115: 930-934, 2005.