

**T.C
SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
ÜROLOJİ KLİNİĞİ
KLİNİK ŞEFİ: DOÇ. DR. ERDİNÇ ÜNLÜER**

**MESANE KANSERİ OLGULARINDA ENDOTELYAL
NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİNİN GENETİK
POLİMORFİZMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Aziz TOKER

**Üroloji
Uzmanlık Tezi
İSTANBUL 2011**

ÖNSÖZ

Asistanlık hayatım boyunca daima büyük bir hoşgörü ve özveri ile tüm tıbbi birikim ve sanatını öğretmeye çalışan, ancak daha da önemlisi bir hekim olmanın yanısıra iyi bir insan olmayı sabırla öğreten, asistanı olmaktan gurur duyduğum hocam ve klinik şefim Sayın Doç. Dr.Erdinç ÜNLÜER'e,

Eğitimime önemli katkıları olan, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen şef yardımcısı hocam; Sayın Op. Dr. M.Gökhan TOKTAŞ'a,

Bilgi ve deneyimlerini bize aktararak yetişmemizi sağlayan, kliniğimizin değerli uzmanları; Sayın Op. Dr. Vural SAÇAK, Sayın Op. Dr. Suat ÖZKAN, Sayın Op. Dr. Cemalettin MURAT, Sayın Op.Dr. Erkan ERKAN, Sayın Op.Dr. Cabbar SARI, Sayın Op.Dr. Ümit HARMANCI, Sayın Op.Dr. Uğur YÜCETAŞ, Sayın Op.Dr. Bülent MANSUROĞLU, Sayın Op.Dr. Akın Soner AMASYALI'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamın başlangıcından beri beni destekleyen ve çalışmanın devamında ve sonuçlandırılmasında büyük katkısı olan Biyokimya Kliniği Asistanı F.Sinem HOCAOĞLU EMRE'ye;

Yaşamımın en önemli ve heyecanlı dönemlerinden birini paylaştığım, her aşamada değerli desteklerini gördüğüm sevgili asistan arkadaşlarıma;

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım servisimizin ve ameliyathanemizin değerli hemşire ve personellerine;

Hayat boyu desteklerini hiç esirgemeyen sevgili aileme ve eşime sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Aziz TOKER

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iii
ŞEKİLLER	iii
TABLolar	iiii
ÖZET	iiii
GİRİŞ	
Mesane kanseri epidemiyolojisi.....	
Mesane kanseri etiyolojisi ve risk faktörleri.....	
Mesane kanseri histopatolojisi.....	
Mesane kanseri moleküler mekanizmaları ve doğal seyri.....	
Mesane kanseri semptomları, tanı ve evrelemesi.....	
Mesane kanserinde tedavi.....	
NİTRİK OKSİT	
MATERYAL METOD	
BULGULAR	
TARTIŞMA	
REFERANSLAR	

KISALTMALAR

- bFGF:** Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
BCG: Bacille-Calmette-Guerin
Cdk: Siklin Bağımlı Kinaz
cGMP: Siklik Guanozin Monofosfat
CIS: Karsinoma İn-Situ
COX-2: Siklooksijenaz 2
CYP1A2: Sitokrom P450 1A2
DMPPÜN: Düşük Malign Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplazm
EAU: European Association of Urology (Avrupa Üroloji Birliği)
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
eNOS: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
GC: Guanilat Siklaz
GSTM-1: Glutasyon S transferaz M1
GTP: Guanozin Trifosfat
HPV: İnsan Papilloma Virüs
iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
ISUP : Uluslararası Ürolojik Patologlar Darneği
KİDEM: Kanser izleme ve Denetim Merkezi
MMP: Matriks Metalloproteinaz
NAT 2: N Asetil Transferaz 2
nNOS: nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO: Nitrik Oksit
PGE 2: Prostoglandin E 2
SOD: Süperoksit Dismutaz
TGF-alfa: Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa
TİMP: Metalloproteinaz İnhibitörü
TSP 1: Trombospondin 1
uPA: Ürokinaz Tip Plazminojen Aktivatörü
VEGF: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER

Şekil 1: Mesanenin insitu ürotelyal karsinomu

Şekil 2: Mesane ürotelyal karsinomlar (Sol düşük dereceli ürotelyal karsinom , sağ yüksek dereceli ürotelyal karsinom)

Şekil 3: Mesane kanseri ultrason görüntüsü

Şekil 4: Mesane tümörünün BT görüntüsü

Şekil 5: NO sentezi

Şekil 6: eNOS geni 7. ekzon nükleotid dizisi

Şekil 7: eNOS geni 4. intron nükleotid dizisi

Şekil 8: eNOS geni 4. intron nükleotid dizisinin tandem tekrarları

Şekil 9: eNOS geni intron 4'ün polimorfizminin genotiplemesi.

Şekil 10: eNOS ekzon 7 Glu298Aşp polimorfizmi genotiplemesi

TABLolar

Tablo 1: 1993-2002 arası İzmir’de en sık görülen kanserler.

Tablo 2: Mesane Tümörlerinin Sınıflaması (WHO 2004).

Tablo 3: WHO/ISUP’a göre ürotelyal karsinomların sınıflanması.

Tablo 4: Ürotelyal karsinomlarda 1997 ve 2004 WHO sınıflamalarının karşılaştırılması.

Tablo 5: Mesane kanserinin 2002 TNM sınıflaması.

Tablo 6: Mesane kanseri risk grupları.

Tablo 7: NOS enzimlerinin özellikleri.

Tablo 8: eNOS İtron 4 ve Glu298Asp Primer Çiftlerinin Özellikleri.

Tablo 9: Enos Glu298Asp ve İtron 4 tandem repeat polimorfizmlerinin optimum amplifikasyonun gerçekleştirildiği PCR reaksiyonu karışımı.

Tablo 10: Glu298Asp Polimorfizmi için PCR Isıları ve Döngü Sayıları.

Tablo 11: İtron 4 Polimorfizmi için PCR Isıları ve Döngü Sayıları.

Tablo 12 : Düşük ve yüksek riskli hastaların cinsiyetlerine göre değerlendirilmesi.

Tablo 13: Düşük ve yüksek riskli hastaların sigara kullanımı açısından değerlendirilmesi.

Tablo 14: Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet oranları açısından karşılaştırılması.

Tablo 15: Hasta ve kontrol grubunun yaşlarının karşılaştırılması.

Tablo 16: Hasta ve kontrol gruplarının sigara içme oranlarının karşılaştırılması.

Tablo 17: Hasta ve kontrol gruplarının İtron 4 polimorfizmlerinin karşılaştırılması.

Tablo 18 : Hasta ve kontrol gruplarının Glu298Asp polimorfizmlerinin değerlendirilmesi.

Tablo 19: Hasta ve kontrol gruplarının İtron4/Glu298Asp polimorfizmlerinin değerlendirilmesi.

Tablo 20: Düşük ve yüksek riskli hastaların İtron4/Glu298Asp polimorfizmlerinin değerlendirilmesi.

ÖZET

Amaç: Nitrik oksit (NO) fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde rolü olan bir serbest radikaldir. Nitrik oksidin dokulardaki fizyolojik sentezinden sorumlu olan enzim nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesinin üyesi olan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimidir. eNOS enzimi tarafından üretilen NO'nin kanser gelişimi ve angiogenezinde ki rolleri birçok çalışmanın konusu olmuştur. Bu amaçla daha önce yapılan çalışmalarda tartışılan konulardan biri eNOS enzimin sentezinden sorumlu olan genin farklı polimorfizmlerinin çeşitli kanserlerle olan ilişkisidir. Bu nedenle bizde bu vaka kontrol çalışmamızda, literatürde daha önce değerlendirilmeyen, mesane transizyonel hücreli kanser olgularında endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) gen polimorfizmlerini değerlendirdik.

Metod: Çalışmamızda Kliniğimizde Ocak 2010 ile Ağustos 2010 tarihleri arasında mesane transizyonel hücreli kanser tanısı almış 64 olgu ile bu gruba benzer epidemiyolojik özelliklere sahip mesane transizyonel hücreli kanser bulgusu olmayan 80 olgu eNOS geninin iki polimorfizmi (intron 4 tandem tekrarı ve Glu298Asp) açısından karşılaştırıldı. Katılımcılardan aydınlatılmış onam formu imzalatılarak, 10'ar cc periferik kan örneği alındı. Periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak, PCR yöntemi ile eNOS geni çoğaltıldı. eNOS geninin iki polimorfizminin genotipik dağılımları restriksiyon işlemleri uygulanarak jel elektorforez yöntemi ile iki grup için belirlendi. İki grubun eNOS gen polimorfizmlerinin genotipik dağılımlarını değerlendirmek için Student's T testi uygulandı. Beklenen ve gözlemlenen değerlerin karşılaştırmalarında Pearson's ki-kare testi uygulandı.

Sonuçlar: eNOS geninin araştırılan iki polimorfizminin genotipik dağılımları daha önceden Türkiye popülasyonu için tespit edilen oranlarla uyumlu bulundu. eNOS geni intron 4 polimorfizmi değerlendirildiğinde "ab" genotipinin, Glu298Asp polimorfizminde ise "GT" heterozigot genotipinin hasta grubunda daha sık bulunduğu izlendi. Yüksek riskli hasta grubu (yüksek dereceli, pT1, pT2 ve karsinoma in-situ) iki polimorfizmin allel dağılımı açısından incelendiğinde bu hastaların %50'sinin "abGT" genotipine sahip olduğu saptandı. İstatistiksel değerlendirmede ise eNOS geninin incelenen iki polimorfizminin allel dağılımlarında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

Bu sonuçlarla mesane kanseri için eNOS geninin intron 4 polimorfizminde "ab" allele ve Glu298Asp polimorfizminde "GT" allele sahip olma risk faktörü olarak şüphe uyandırmakla birlikte, çalışmamız istatistiksel olarak bu veriyi doğrulayamamıştır. Bu veriyi doğrulamak ve mesane kanseri ile eNOS gen polimorfizmlerinin ilişkisini değerlendirmek için daha geniş gruplarla yapılacak vaka kontrol çalışmalarına gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Mesane kanseri, nitrik oksit, nitrik oksit sentaz, gen polimorfizmi

ABSTRACT

Introduction: Nitric Oxide (NO) is a free radical that plays role in physiological and pathophysiological processes. Endothelial Nitric oxide synthase (eNOS) as a member of NOS family, is the enzyme which's responsible from the physiological production of nitric oxide in tissue. The impact of NO on the process of neoplasia and angiogenesis has been evaluated in various studies. One of the issues about nitric oxide is the association of cancer and various polymorphisms of eNOS gene. In this case control study, we tried to evaluate polymorphisms of eNOS gene in transitional cell carcinoma (TCC) of bladder for the first time in the literature as far.

Patients and Methods: In this study, a total of 64 patients with bladder TCC, whom had been diagnosed between January and August 2010 and 80 controls with similar epidemiological characteristics of patients group, were evaluated and compared in terms of 2 types of eNOS gene polymorphisms (repeat of intron 4 ve Glu298Asp base exchange). A 10 cc of peripheral blood was taken from all participants after approval of informed consent. Following DNA isolation from the blood samples, eNOS gene was replicated via PCR. The genomic distribution of two types of eNOS polymorphism was determined by gel electrophoresis following process of restriction, for both groups. Student's T test were used to evaluate genotypical distribution of e NOS gene polymorphisms. Pearson's Chi-square test were used for comparison of observed values.

Results: The genotypic distributions of two polymorphisms of eNOS gene were in concordance with that of Turkish population from previous studies. The alleles most commonly observed in patient group were "ab" for intron 4 and "GT" for Glu298Asp polymorphisms. Evaluating the patients with high risk bladder TCC (high grade, pT1-2, carcinoma in situ) for distribution of two alleles, 50% of these patients were found to have "abGT" genotype. Overall, no statistically significant difference was observed between two groups in terms alleles' distributions of two polymorphisms of eNOS gene.

Conclusions: In our study, bladder cancer patients were likely to have "ab" allele for intron 4 and "GT" for Glu298Asp polymorphisms but these findings were not confirmed statistically. We think that it is mandatory to conduct trials with more patients to confirm these findings and to evaluate the association between bladder cancer and eNOS gene polymorphisms.

Keywords: Bladder cancer, nitric oxide, nitric oxide synthase, gene polymorphism

GİRİŞ

Mesane kanseri etiyolojisinde, diğer tüm kanserlerde olduğu gibi kimyasal karsinojenlere maruz kalma ve sonucunda gelişen DNA hasarının rol oynadığı klinik ve deneysel çalışmalarla gösterilmiş olmasına rağmen; birçok durumda karsinojenlerin bu süreçteki rolü tam olarak anlaşılamamıştır (1). Mesane kanserinin gelişimi de diğer tüm kanserlerde olduğu gibi hücre çoğalma ve farklılaşmasının bozulması ile ortaya çıkmaktadır. Hücre döngüsünün bozulmasında, çevresel etkilere bağlı olarak gelişen DNA hasarı ile onkogenlerin indüksiyonu ve tümör supresör genlerin inhibisyonu rol alır. Yapılan birçok çalışmada mesane kanserinin etiyolojisinde bu onkogenlerin ve tümör supresör genlerin fonksiyonları ortaya konulmuştur (1).

Farklı etnik popülasyonların benzer çevresel faktörlere maruz kalmalarına rağmen mesane kanseri insidansları arasında farklılıkları bulunmaktadır. Benzer çevresel kanserojenlere farklı cevapların gelişmesi, genetik farklılıkların da kanser gelişiminde katkısı olduğunu akla getirmektedir. Benzer şekilde aynı toplumda yaşayan bireyler de maruz kalınan aynı çevresel karsinojenlere farklı cevaplar göstermektedir. Bu, her bireyin kendine özgü genetik yapısındaki özgülük ve olası genetik varyasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu varyasyonların önemli bir sebebi olan genetik polimorfizmler çeşitli kanser türlerinin etiyolojisinde olası bir etken olarak popüler bir araştırma konusudur.

Bundan yola çıkarak çalışmadaki amacımız, daha önce birçok farklı kanser türünde anlamlı olarak genetik polimorfizmi gösterilmiş olan endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) gen kompleksine ait polimorfizmlerin; mesane transizyonel hücreli kanserindeki rolünü değerlendirmek ve mesane kanseri için risk faktörü olup olmadığını araştırmaktır.

MESANE KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ

İNSİDANS VE PREVELANS

Mesane kanseri üriner sistemi en sık etkileyen kanserdir. Mesane kanseri tüm kanserler içinde erkeklerde en sık dördüncü, kadınlarda en sık sekizinci kanser türüdür (2). Mesane kanserinde en yüksek insidans oranına batılı ve sanayileşmiş topluluklar sahiptir.

Benzer sosyoekonomik düzeye ve çevre koşullarına sahip topluluklarda mesane kanseri insidansı farklılık gösterebilmektedir. Bu da çevresel koşullarla birlikte genetik faktörlerinde mesane kanseri gelişiminde etkin olduğunu akla getirmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) benzer çevre koşullarına sahip bireylerde, ırksal kökene bağlı olarak farklı mesane kanseri insidansları ortaya konulmuştur (3).

Mesane kanseri her yaşta görülmekle birlikte, insidansı yaşlanmayla birlikte artmaktadır. Orta yaş ve ileri yaş erkeklerde, prostat kanserinden sonra, prevelansı en sık ikinci ürolojik malignitedir (4). Mesane kanseri ABD'de erkeklerde tüm kanserlerin % 6'sını, kadınlarda ise % 2'sini oluşturmaktadır (3). ABD'de ortanca tanı koyulma yaşı 72 bulunmuştur (5). Yeni tanı alan hastaların % 90'ı 60 yaş üzerindedir ve mesane tümörlerinin görülme sıklığı giderek artmaktadır. Son 50 yılda mesane kanserinin insidansı %50 civarında artmıştır. Mesane kanseri mortalite oranları ise bu süre içinde % 33 azalmıştır (5).

Ülkemizde Kanser İzleme ve Denetim Merkezi (KİDEM) tarafından İzmir bölgesinde yapılan kanser insidans ve epidemiyoloji çalışmasında mesane kanseri insidansı erkeklerde % 7,8 ile 2. sıklıktaki kanser olarak bulunmuş; yine aynı çalışmada mesane kanserinde erkek : kadın insidans oranları 8,6 : 1 bulunmuştur (6). (Tablo 1)

Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığınca 2000 yılından beri kanser hastalarının kayıtları illerde bulunan Kanser Kayıt Merkezleri aracılığı ile yapılmaktadır. Bu merkezlerin 2000-2003 yılları arasındaki verilerini değerlendiren bir çalışmada ürogenital kanserler içinde erkek hastalarda mesane kanseri ülkemizde tüm

kanserler içerisinde % 5,93 insidans oranı ile 4. sırada yer almaktadır. Her iki cinsteki görülen kanserler arasında ise % 3,42 insidans oranı ile 6. sırada yer almaktadır (7) .

Tablo 1: 1993-2002 arası İzmir’de en sık görülen kanserler

	Hasta sayısı	% n
Erkek		
1. Akciğer	10,116	35.6
2. Mesane	2,201	7.8
3. Kolon ve rektum	1,717	6.1
4. Larenks	1,630	5.7
5. Prostat	1,541	5.4
Kadın		
1. Meme	5,155	28.7
2. Kolon ve rektum	1,291	7.2
3. Korpus uteri	961	5.3
4. Serviks uteri	860	4.8
5. Akciğer	844	4.7

Mortalite

Bir kanserin mortalite oranı, o kansere bağlı olarak 100.000 kişide o yıl içinde gerçekleşen ölümlerin sayısıdır. ABD’de 2007 yılı verilerine göre erkeklerde mesane kanserine bağlı ölüm oranı tüm kanserle içinde % 3’dür. Kadınlarda ise mortalite oranı % 1,5 bulunmuştur (8). Erkeklerde tüm kanserler içinde mesane kanseri oranı %7, kadınlarda %2 oranında bulunmaktadır. Bu sonuçlarla kadınlarda mesane kanserine bağlı mortalite oranı yaklaşık %30 fazla bulunmaktadır.

Son 50 yılda mesane kanserinin erken tanısı için yeni teknikler geliştirilmemiş olmasına rağmen insidansı % 50 oranında artmıştır. Bu da mesane kanseri insidansında gerçek bir artış olduğunu göstermektedir.

Yaş

Mesane kanseri çocukluk dönemi dahil her yaşta görülebilmektedir. Ancak genel olarak orta ve ileri yaşların hastalığıdır. Mesane üretelyal kanserinin tanı yaşı erkeklerde ortalama 69, kadınlarda ise 71'dir. Ayrıca mesane kanseri insidansı yaşla birlikte artış gösterir. Amerikan verilerine göre 60-69 yaş arası erkeklerde ve kadınlarda sırası ile invaziv mesane kanseri görülme olasılığı % 0,96 ile % 0,26 iken; 70 yaş üzeri erkek ve kadınlarda oranlar sırası ile % 3,41 ile % 0,96 'dır (8).

Yaşlılardaki mortalite oranı da daha yüksektir. Örneğin; Amerika'da hastalığa bağlı ölüm oranı 65-69 yaşları arası erkeklerde %14, kadınlarda %18 iken, 80-85 yaşları arasındaki erkeklerde %30; kadınlarda %37'dir. Bu durumunun yaşlı insanlarda hastalığın çok daha agresif formlarının görülmesinden mi, teşhis anında evrenin ileri olmasından mı yoksa yaşlılığa bağlı sebeplerden mi geliştiği net değildir (9).

Adölesanlar ve 30-40 yaş arasındaki genç yetişkinlerde mesane kanseri histolojisi iyi diferansiyedir ve daha benign seyirlidir. Bu yaş gruplarında tanı konulan mesane tümörlerindeki genetik ve moleküler değişiklikler, orta ve ileri yaş insanlarda görülen mesane tümörlerinin klinik davranış ve histolojik dereceleri ile uygunluk göstermez (10). Bununla birlikte aynı histolojik dereceler karşılaştırıldığında hastalığın progresyon riskinin gençlerde yaşlılardaki ile aynı olduğu görülmüştür (11).

Otopsi Verileri

Neredeyse diğer tüm malignitelerden farklı olarak, mesane kanseri otopsi serilerinde hemen hemen hiç rapor edilmemiştir (12). Ayrıca ürologların farklı hastalıklar için yaptıkları sistoskopiler sırasında nadiren insidental mesane tümörü saptamaları (13), mesane kanserinin semptomatik hale gelene kadarki preklinik döneminin kısa olduğunu göstermektedir.

MESANE KANSERİ ETİYOLOJİSİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

Mesane kanserinin etiyojisine yönelik ilk tanımlama ve gözlemler 19. Yüzyılın sonlarında belirginleşen sanayileşme döneminde ortaya konulmuştur. Ağır çalışma şartlarının yanı sıra sanayileşme ile birlikte, bazı iş kollarında kimyasallara yoğun maruziyet olması ve takip eden dönemlerde vakaların artması endüstriyel kimyasallara olan ilginin artmasını sağlamıştır. Bundan yola çıkarak boya sanayinde kullanılan anilin mesane kanseri ile ilişkili tanımlanmış ilk etiyojik faktördür. Yirminci yüzyıla birlikte sigara kullanımının artması ve zamanla tütündeki toksik maddelerin ve bunların onkojenik etkilerinin daha açık bir şekilde tanımlanması günümüzde tütün ve tütün mamullerinin mesane kanseri etiyojisinde en önemli faktör olarak tanımlanmasını sağlamıştır.

Mesane kanserinin gelişimi ve progresyonunda çeşitli faktörler suçlanmaktadır;

- Mesleki risk faktörleri
- Sigara içimi
- Kahve ve çay tüketimi
- Analjezik kullanımı
- Yapay tatlandırıcılar
- Kronik sistit ve diğer enfeksiyonlar
- Pelvik ışınlama
- Siklofosfamid
- Triptofan metabolitleri
- Kalıtım
- Diğer risk faktörleri

Mesleki Risk Faktörleri

19. Yüzyılın sonlarında kullanılmaya başlanan anilin boyaları mesane kanseri etiyojisinde ilk ortaya konan kimyasallardır (14). Mesane kanseri için kanserojen olduğu gösterilen diğer kimyasallar 2- neftilamin, 4- aminobifenil, 4- nitrobifenil , 4-4- diaminobifenil, 2–amino1-neftol, alifatik hidrokarbonlar, akroleindir (15). Amerika'daki mesane kanserlerinin %20'sinin mesleki kimyasallara maruz kalmaya bağlı olduğu ve uzun bir latent periyodu takiben ortaya çıktığı gösterilmiştir (16). Bununla birlikte latent periyod maruz kalınan dozla ilişkilidir ve yüksek doz maruziyetlerde latent periyodun kısaldığı gösterilmiştir (17).

Mesane kanseri risk artışı olduğu bildirilen meslekler; oto sanayi işçileri, boya sanayi işçileri, boyacılar, kamyon şöförleri, deri işçileri, metal işçileri, tornacılar, kuru temizlemeciler, diş teknisyenleri, doktorlar, tekstil işçileri ve tesisatçılardır (18).

Sigara

Sigara içenlerde içmeyenlere göre mesane kanseri inidansı dört kat fazladır (19). Risk artışı içilen sigara sayısı, içilen süre, alınan dumanın inhalasyon miktarı ile koreledir. Sigara bırakıldıktan sonra risk aktif sigara içmeye devam edenlere göre azalmaktadır, ancak bu risk azalması 20 yılı bulur. Sigarayı bıraktıktan 25 yıl sonra bile risk hiç sigara içmeyenlere göre hala yüksektir (20). Sigaranın kanser yapıcı etkisi cinsiyetten bağımsızdır. Kadınlar sigara kaynaklı kanser riskine en az erkekler kadar duyarlıdır (21).

Sigaradaki mesane kanserine yol açan karsinojenik faktörler net olarak belirlenmemiştir. Polisiklik aromatik hidrokarbonların, aromatik aminlerin, N-nitrozo bileşiklerin, ansatüre aldehitlerin potansiyel karinojen olduğu düşünülmektedir (22). Mesane kanserinin tütünle ilişkisi sadece sigarayla sınırlı gözükmemektedir. Pipo ve puro kullanımının kanser riskini çok az değiştirdiği rapor edilmiştir (23).

Diyetle yüksek miktarda kerotenoidlerin ve vitamin c tüketiminin, sigara içenlerde 3 ve 4–aminobifenil-hemoglobin kompleksi düzeyini azalttığı ve mesane

kanseri riskinde azalma yaptığı gösterilmiştir (24).

Sigaradaki kimyasalların hangi mekanizma ile kansere yol açtıkları araştırılmış ve özellikle 4-aminobifenil üzerinde durulmuştur. Bu madde asetilasyon yolu N-asetiltransferaz 2 (NAT2) enzim sistemi ile detoksifiye edilmektedir. NAT 2'nin beyaz ırkta 6 alleli bulunmaktadır ve bu allellerden sadece bir tanesi hızlı asetilasyon yapmaktadır. Yapılan çalışmalarda sigara veya mesleki kanserojenlere maruz kalan ve mesane kanseri gelişen hasta gruplarında NAT 2'nin yavaş asetilleyen allelinin predominant olduğu gösterilmiştir (25).

Daha sonra yapılan diğer çalışmalarda da N-asetiltransferaz 1 enziminin farklı allellerinin mesane kanseri etiolojisinde önemli farklılıklar taşıdığı ortaya konmuştur (26). Üzerinde durulan enzimlerden biri de aromatik aminlerin demetilasyonunu ve böylece potansiyel karsinojenlerin aktivasyonunu yaptığı bilinen sitokrom p450 1A2 (CYP 1A2)'dir. NAT2'nin aksine CYP 1A2 hızlı indüklenebilir bir enzimdir ve kafein gibi bir kimyasal tarafından indüklenebilir (27).

Karsinojen detoksifikasyonunda önemli olduğu düşünülen bir enzim glutatyon transferaz (özellikle glutatyon S-transferaz M1) olup GSTM1 polimorfik geni tarafından kodlanır. Bu genin sigara içimi ile indüklenen mesane kanseri gelişiminde rol oynadığını destekleyen bulgular mevcuttur (28).

Yapılan araştırmalar sonucunda mesane kanserlerinde görülen p53 mutasyonlarının, kolon karsinomları ve lösemilerdeki gibi predominant spontan mutasyon şeklinde değil, akciğer kanseriyle benzer şekilde artmış oranda (%50) ekzojen olarak indüklenmiş mutasyonlar şeklinde olduğu görülmüştür (29). Sigara tiryakileri ile hayatında hiç sigara içmemiş kişiler, mesane kanserinde p53 mutasyonları açısından karşılaştırıldığında toplam mutasyon sayısı sigara tiryakilerinde yüksek çıkmış, fakat mutasyon türlerinde ve alanlarında farklılık saptanmamıştır (30). Bu durum sigara tiryakiliğinin ürotelyal hücrelerde toplam mutasyon oranını, mutasyon alanlarında ya da türlerinde değişiklik oluşturmadan artırabileceği şeklinde yorumlanmıştır (31). Bu enzimatik faktörler göz önüne alındığına mesane kanseri gelişiminde sigaranın riski artırdığı açıkça gözükmektedir. Ayrıca mesane kanseri tanısı konduktan sonra sigara kullanmaya devam etmek klinik seyrin kötüleşmesine ve progresyon oranlarının artmasına sebep olmaktadır (31,32).

Analjezik Kullanımı

Fenasetin içeren analjezik preparatların çok miktarda tüketilmesi renal pelvis ve mesane transizyonel hücreli karsinomu ile ilişkilendirilmiştir (33). Diğer analjeziklerle ilişkili şüpheli iddialar vardır (34).

Yapay Tatlandırıcılar

Kemirgenlerde yapılan deneysel çalışmalarda sakkarin ve siklamatlar gibi yapay tatlandırıcıların yüksek dozlarda mesane karsinojeni oldukları gösterilmiştir. Ancak bu araştırmaların bulguları çelişkilidir, çünkü verilen yüksek doz tatlandırıcılar yalnızca inutero ve neonatal dönemde kanserojen etki göstermiştir ve yüksek doz tatlandırıcılar üriner pH ve elektrolit dengesini değiştirmiş ve bu durum karsinogenez için yatkınlık oluşturmuş gözükmektedir (35,36). Buna karşın insanlarda yapılmış olgu-kontrol çalışmaları yapay tatlandırıcılar ile mesane kanseri riskinde artış arasında anlamlı bir ilişki gösterememiştir (37).

Kronik Sistit ve Diğer Enfeksiyonlar

Kalıcı katater ya da taş varlığında, kronik sistitin mesane skuamöz hücreli karsinomunda artışla ilgili olduğu gösterilmiştir (38,39). Uzun süreli kalıcı kataterle takip edilen hastalarda % 2–10 oranında mesane kanseri gelişmekte ve bunlarında % 80' ini de skuamöz hücreli kanserler oluşturmaktadır (40).

Benzer şekilde, schistosoma haematobium sistitininde de skuamöz hücreli mesane karsinomu ile ilişkisinin olduğu düşünülmektedir. Erkeklerde şistozomiazisin endemik olduğu Mısır'da mesane skuamöz hücreli karsinomu en sık görülen malignensidir. Ayrıca şistozomiazisli erkeklerde ürotelyal karsinom riski de artmıştır (41).

Human papilloma virus'un (HPV) mesane kanserindeki rolü pek çok çalışma grubunca incelenmiş ve çok çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bu virüsün sağlıklı insanlardan ziyade immün sistemi baskılanmış olgularda ürotelyal karsinom gelişiminde rol oynadığı görülmüştür (42).

Pelvik Işınlanma

Serviks veya over kanseri nedeni ile pelvik radyoterapi alan kadınlarda mesane kanseri gelişme oranının 2-4 kat arttığı gösterilmiştir (43). Radyoterapiye ek olarak tedavi protokolüne kemoterapi eklenmesi durumunda, takiplerde mesane kanseri insidansının daha fazla arttığı izlenmiştir. Tespit edilen mesane kanserlerinin de çoğu zaman yüksek dereceli ve lokal invaziv olduğu görülmüştür (44).

Siklofosamid

Siklofosamid tedavisi alan hastalarda mesane kanseri riski yaklaşık 9 kat artmasına karşın, olgu kontrollü epidemiyolojik çalışmalarda siklofosamidin bu durumla direkt ilişkisi gösterilememiştir (37). Bu tümörlerin çoğu tanı anında kas tabakasına infiltre olmuş yüksek dereceli tümörler olup, olgular sporadik transisyonel hücre karsinomlu hastalara göre daha genç bir yaş ortalamasına sahiptir ve her iki cinsiyet için de dağılımları eşittir (45). Yapılan çalışmalarda üroprotektan bir ajan olan mesna (2-merkaptotansulfanik asit) kullanımının mesane kanseri riskini azaltabileceği bildirilmiştir (46).

Triptofan Metabolitleri

Mesane kanseri olgularında üriner triptofan metabolitlerinin düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (47). Triptofan metabolitlerinin üriner düzeyi arttıkça tümör nüksünün arttığı rapor edilmiştir (47). Ancak daha sonraki çalışmalar endojen triptofan metabolitlerinin mesane kanseri gelişiminde anlamlı katkıya sahip olmadığı gösterilmiştir (48).

Kalıtım

Mesane kanseri olgularının çoğunda kalıtım için güçlü epidemiyolojik bulgular bulunmaktadır. Bu konuda yapılan geniş ölçekli bir çalışmada, mesane transisyonel

hücreli kanserin gelişme riskinin akrabalarda hafif derecede arttığı ortaya çıkmıştır (49). Ancak ilginç olarak bu çalışmada kanser riski ikinci ve üçüncü derece akrabalarda, birinci derece akrabalarından daha yüksek riskli bulunmuştur. Bu sonuçla mesane kanserinde genetik mekanizmanın sorumluluğu tartışılır hale gelmiştir. Dolayısıyla benzer bir ürolojik malinite olan prostat kanserindeki güçlü kalıtsal ilişki mesane kanserinde bariz bir şekilde ortaya konulamamıştır.

Ek risk faktörleri arasında böbrek transplantasyonu olanlar (50) ve kronik olarak düşük sıvı alanlar (51) sayılabilir. Uzamış immünsüpresyon nedeniyle böbrek transplantasyonu alıcıları birçok tümör gelişimi için artmış riske sahiptirler (52).

MESANE KANSERİ HİSTOPATOLOJİSİ

Mesane duvarı lümeden dışarıya doğru yüzeyel olarak epitelyum ve lamina propria, daha derinde muskularis propria, yağ dokusu ve seroza tabakalarından oluşur. Epitel tabakası transizyonel çok katlı değişken epitelyum ya da güncel olarak ürotelyum olarak adlandırılır. Lamina propria içerisinde düzensiz kas lifleri bulunabilir ki bu kas liflerini muskularis propria ile karıştırmamak gerekir. Muskularis propria ortada dairesel iç ve dış kısımlarında uzunlamasına kas liflerinden oluşur. Lüminal yüzeyde şemsiye hücreleri olarak adlandırılan geniş sitoplazmalı hücreler, bunların altında epitelin esas katlarını oluşturan ara hücreler ve en altta da kolumnar çekirdekli bazal hücreler bulunur. Mesane ürotelyumu 3 ila 7 katman hücre grubu içermektedir.

Mesane kanserlerinin %90–95'ini ürotelyal hücreli kanserler oluşturur. Geri kalan yaklaşık %10' luk kısmı ise mezenkimal ve komşuluk yolu veya uzak metastaz yolu ile gelen sekonder tümörler oluşturur (Tablo 2).

Tablo 2: Mesane Tümörlerinin Sınıflaması (WHO 2004)

Non-invazif ürotelyal tümörler
İnvazif ürotelyal tümörler
Skvamöz neoplaziler
Glandüler neoplaziler
Nöroendokrin tümörler
Mezenkimal tümörler
Hematopoetik-Lenfoid neoplaziler
Sekonder tümörler

Epitelyal tümörler içerisinde en sık görüleni ürotelyal tümörlerdir, bunun dışında bazı endemik bölgelerde sık görülen skuamöz hücreli kanser ve adenokarsinom bulunur.

Mesanenin daha nadir görülen epitelyal veya non-epitelyal tümörleri; küçük hücreli kanser, dev hücreli kanser, karsinoid tümör, feokromositoma, lenfoma, koryokarsinoma ve rabdomyosarkoma şeklinde sıralanabilir.

Skvamöz Hücreli Karsinom

Skvamöz hücreli kanser prevelansı endemik olduğu bölgeler dışında %1 – 7 arasında değişmektedir (52,53). Endemik olarak bulunduğu Mısır’da ise prevelansı %75’e kadar çıkmaktadır (54). Endemik bölgelerdeki skuamöz hücreli kanser S. Heomabitium enfeksiyonu ile ilişkilidir. S. Heomabitium enfeksiyonuna bağlı skuamöz hücreli kanser, ürotelyal kansere oranla 10-20 yaş daha genç popülasyonda görülmektedir. Enfeksiyona bağlı kanser genellikle iyi differansiyedir ve lenf nodu tutulumu, metastaz oranları daha düşüktür. S. Heamobitium enfeksiyonuna bağlı kanser en sık kemiklere metastaz yapmaktadır (55).

Enfeksiyona bağlı olmayan skuamöz hücreli kanser genellikle üriner taşların ya da üriner kataterizasyonun kronik irritasyonuna, kronik enfeksiyonlara ya da mesane divertiküllerine bağlı ortaya çıkmaktadır (56). Kronik enfeksiyonları veya daimi sondaları olan paraplejiklerde % 80’e varan oranlarda skuamöz metaplazi gelişmekte olup, bunların %5’inde de skuamöz hücreli kanser gelişmektedir (56). Tanı anında genellikle ileri evrededir ve prognozu kötüdür.

Adenokarsinom

Adenokarsinom primer mesane kanserlerinin % 2'sinden daha azını oluşturur (69). Başlıca üç gruba ayrılır; primer vezikal, urakal ve metastatik. Bunun dışınada ogumentasyonlarda, poşlarda, üreterosigmoidostomilerde gelişebilir (57,58).

Primer Vezikal Adenokarsinom

Mesane ekstrofilerinde en sık görülen kanser türüdür. Bu tümörler kronik enflamasyon veya irritasyona bağlı gelişirler (59,60). Çoğu musin üretir. Taşlı yüzük hücreli karsinomlar karakteristik olarak mesanede linitis plastika oluşturur (61,62). Adenokarsinomların çoğu kötü differansiye ve invazivdir. Karsinoma in situ'dan çok sistitis glandularis ile ilişkilidir.

Urakal Karsinom

Mesanenin dışından gelişen oldukça nadir rastlanan tümörler olup, genellikle adenokarsinom olarak ortaya çıkmakla birlikte diğer kanser türlerinden (ürotelyal, skuamöz, sarkoma vs.) de köken alabilirler. Urakal karsinomların komşuluğundaki normal mesane epiteli ile arasında keskin bir sınır ayrımı bulunmakla birlikte, tümör mesane duvarında, normal epitelin altında yer alır (63). Mesane lümenine invazyonlarda idrarda mukus görülebilir. Urakal tümörlerin pek çoğu radyografilerde nokta şeklinde kalsifikasyonlar olarak görülür (64,65). Urakal karsinomu olan hastalar primer mesane adenokarsinomu olan hastalara göre daha kötü prognoza sahiptir (63). Urakal karsinomlar iliak ve inguinal lenf nodlarına, omentuma, karaciğer, akciğer ve kemiğe metastaz yaparlar (62).

Metastatik Adenokarsinom

Mesane adenokarsinomlarının en sık rastlanılan türlerinden bir tanesi de metastatik adenokarsinomlardır (61). Mesaneye en sık invazyon rektum, mide, endometrium, meme, prostat ve over tümörlerinden olmaktadır (66).

Ürotelyal Karsinom

Mesane karsinomlarının %90'dan fazlası ürotelyal karsinomdur. 1998 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneğinin ortaklaşa gerçekleştirdikleri konferansta patologlar bu kanserleri ürotelyal kanserler olarak isimlendirmeye karar vermiştir (67). Ancak bu terim, skuamöz kanserler ve adenokanserler gibi diğer kanser tiplerinin de ürotelyumda bulunması nedeni ile patolog olmayanlarda kavram kargaşası yaratabilmektedir. Ürotelyal karsinomlar normal ürotelyumdan mukozada papiller katlantılara yol açan artmış sayıda epitelyal hücre tabakaları, hücre polaritesinin kaybı, tabandan yüzey tabakalara doğru anormal hücre matürasyonu, artmış çekirdek/sitoplazma oranı, çekirdekte belirgin kromatin kümeleşmesi ve artmış sayıda mitoz ile ayrılır. Ürotelyal karsinomlar ürotelyumun metaplaziye uğraması sonucunda iğ hücreli, skuamöz ya da adenokarsinomatöz elemanlar içerebilir. Mesane tümörlerinin yaklaşık % 70'i papiller, % 10'u nodüler ve % 20'si de mikst tiptedir (53).

Mesane kanseri için üzerinde uzlaşılmış tek bir derecelendirme sistemi bulunmamaktadır. En çok kullanılan sistemler tümör hücresindeki anaplazi derecesi göz önünde bulundurularak yapılmaktadır (53,63). 1973'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) adına yapılan sınıflamada ürotelyal karsinomlar derecelerine göre G1, G2 ve G3'e ayrılırken, benign bir lezyon olarak düşünülen papillomlar ayrı bir sınıfa konulmuştur (68). 1998 yılında Uluslararası Ürolojik Patologlar Derneği (ISUP) ve WHO patologlarının bulunduğu toplantıda, mesane kanserinin terminolojisi, neoplastik ve preneoplastik lezyonların ayrımında fikir birliğine varılmıştır. Yeni yapılan sınıflama 2004 yılında WHO klasifikasyonu olarak literatüre geçmiştir. Bu sisteme göre ürotelyal karsinomlar, normalden papiller neoplazmalara kadar giden bir spektrum içinde

sınıflandırılmıştır (69)(Tablo3).

Tablo 3: WHO/ISUP'a göre ürotelyal karsinomların sınıflanması

1	NORMAL ÜROTELYUM
NON-İNVAZİF ÜROTELYAL NEOPLAZİ	
A-FLAT(DÜZ) ÜROTELYAL LEZYONLAR	
1	Düz (flat) ürotelyal hiperplazi
2	Reaktif ürotelyal hiperplazi
3	Önemi kestirilemeyen ürotelyal atipi
4	Displazi
5	Karsinoma in situ (CIS)
B-PAPİLLER ÜROTELYAL LEZYONLAR	
1	Papiller hiperplazi
2	Ürotelyal papillom
3	Ürotelyal papillom (inverted type)
4	Düşük malign potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm (DMPPÜN)
5	Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom
6	Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom
İNVAZİF ÜROTELYAL NEOPLAZİ	
	Lamina propria invazyonu
	Muskularis propria invazyonu

2004 yılı WHO klasifikasyonunda evrelemede belirgin değişiklikler yapılmıştır. ISUP/WHO tarafından yapılan yeni sınıflandırma sitoloji ve histopatoloji arasında ortak bir terminoloji birlikteliği sağlaması amaçlanmıştır. Ancak bu sistemin 1973 sınıflaması ile bire bir karşılaştırılmasında bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır. "Papillom" kavramı her iki sistemde de aynıdır. Yeni sistemdeki yüksek dereceli karsinomlar eski sistemdeki G3 yerine geçmiştir. Ancak WHO(1973)' deki G1 ve G2'nin direkt bir karşılığı yoktur. Örneğin G1 lezyonlar yeni sistemde bazen düşük malign potansiyelli papiller ürotelyal neoplazma (DMPPÜN) bazen de düşük dereceli papiller ürotelyal karsinoma karşılık gelmektedir. Eski sistemdeki G2 lezyonlar da geniş bir spektruma yayılır. Bunlar yeni sistemde bazen düşük dereceli papiller karsinoma, bazen de yüksek dereceli papiller karsinoma denk düşmektedirler (69)(Tablo4).

Tablo 4: Ürotelyal karsinomlarda 1997 ve 2004 WHO sınıflamalarının karşılaştırılması

WHO 1997	WHO 2004
Papillom	Papillom
Derece 1	DMPPÜN
Derece 2	Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom
Derece 3	Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom

Düz Ürotelyal Hiperplazi

Epitelyal hiperplazi hücrede nükleer ya da yapısal anormalliler olmadan, hücre sayısında artış olduğunu ifade eder. Tek başına saptandığında premalign bir lezyon olarak kabul edilmemektedir.

Reaktif (İnflamatuvar) Ürotelyal Atipi

Reaktif atipi, akut ya da kronik olarak inflamasyona uğrayan ürotelyumda meydana gelen nükleer anormallikleri içerir. Reaktif atipide, nükleus genişlemiş ve vesiküler bir hal almıştır, ortasındaki nükleolus oldukça belirgindir. Mitotik figürlere sık rastlanır. Kromatin örneklerinde fark edilir nükleer hiperkromazi, pleomorfizm ve irregüler görünüm olmadıkça bu lezyonlar neoplastik olarak değerlendirilmemelidir (67).

Önemi Bilinmeyen Atipi

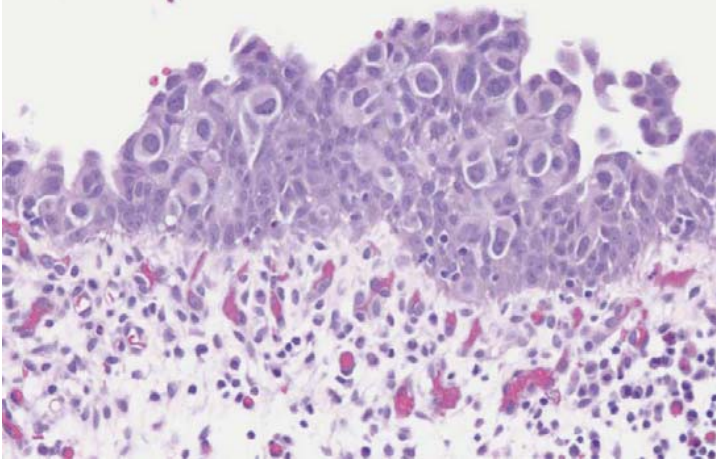
Bazı olgularda reaktif ve neoplastik atipiyi birbirinden ayırt etmek güçtür. İnflamasyon genişliği ile orantılı miktarda yüksek derecede pleomorfizm veya hiperkromazi görülür, öyle ki burada displazi kesinlikle dışlanamaz. Bu olgular “önemi bilinmeyen atipi” olarak adlandırılır. Bu hastalar çok yakından takip edilmeli ve inflamasyon yatıştıktan sonra yeniden değerlendirilmelidir (67)

Displazi

Displastik ürotelyumda preneoplastik olarak değerlendirilebilecek belirgin sitolojik ve yapısal değişiklikler mevcuttur. Displastik hücreler büyük, yuvarlak, çentikli, normal epitelyal polaritede saptanmayan bazal yerleşimli nükleuslara sahiptir. Displastik epitelyum artmış hücre katmanları ve mitotik figürler içermez (71). Bir çalışmada orta derecede displaziye sahip 26 hastadan 4'ünde (% 15) yüksek derece'li ürotelyal kanser tespit edilmiş, ve ortalama 3,5 yıllık takip süresi sonunda bunların üçünde kas invazyonu gelişmiştir (70). Displastik lezyonlar CIS'in erken dönem diagnostik sürece ait ön bulgusu olabilirler.

Karsinoma İn-Situ (CIS)

CIS ürotelyumun yüzeysel ve düz lezyonu olup, bazı olgularda invazif kanserin prekürsörü olarak bildirilmiştir. Lezyon ürotelyumun bütün tabakalarını ya da sadece bir parçasını tutan, büyük, irregüler, hiperkromatik nükleusa sahip kötü diferansiye hücrelerin varlığı ile karakterizedir. Mitotik aktivite özellikle orta tabakadan üst ürotelyuma doğru sıklıkla gözlenir. Daha önceden şiddetli displazi veya belirgin atipi tanımlanan lezyonlarda CIS gelişebilir (69). (Şekil 1)



Şekil 1: Mesanenin insitu ürotelyal karsinomu

Sistoskopide mukozada eritemli kadifemsi lezyonlar olarak görülebilmese de karşın çoğunlukla endoskopik olarak tespit edilemezler. CIS klinik olarak asemptomatik seyredebilir veya sık idrara çıkma, ani sıkışma hissi ve idrar yaparken yanma gibi alt

üriner sistem semptomları görülebilir (72,73).

CIS tanısı konulan hastaların %80-90'ında idrar sitolojisi pozitifdir. Yüksek dereceli yüzeysel tümörü olan hastaların % 25'inden fazlasına CIS'in eşlik ettiği (74), ve bunların % 40 ile % 83'ünün progresyona uğrayarak kasa invaze kansere dönüştüğü bildirilmiştir (75). Bir başka çalışmada yüksek dereceli kasa invaze kanserlerin % 20 ile % 75'inde CIS tespit edilmiştir (76). Yaygın CIS tanısıyla sistektomi yapılan hastaların % 20'sinde mikroskopik kas tutulumu saptanmıştır (77). CIS'nun kasa invazif kanserle direkt olarak bağlantılı olduğunu gösteren çalışmalar vardır. CIS'li hastalarda kromozom 17p'nin kaybı (78,79) bildirilmiş olup moleküler genetik (80) ve immünohistolojik (80-82) çalışmalar sonucunda; yüksek oranda CIS ve kas invazyonu görülen hastaların her ikisinde de p53 geninin delesyon ve/veya mutasyonu ile birlikte bu gene bağlı protein ürünlerinde de değişiklikler görülmektedir. Bu bulgular, CIS'nun invazif mesane kanserinin öncü lezyonu olduğu yönündeki iddiaları desteklerken, p53 anomalilerinin nadir görüldüğü düşük dereceli papiller tümörlerle bağlantısı olma olasılığını düşürmektedir (83,84).

Papiller Hiperplazi

Papiller hiperplazi ürotelyumda nükleer atipi olmaksızın görülen önemsiz çadırlaşma, dalgalanma veya yapısal düzeninde yükselme ile karakterizedir. Lezyonun sıklıkla tabanında bir ya da birkaç küçük, genişlemiş kapilleri vardır, fakat iyi gelişmiş bir merkezi fibrovasküler yapıdan yoksundur (69).

Ürotelyal Papillom

Ürotelyal papillom, merkezi bir fibrovasküler çekirdek etrafında, normal kalınlık ve sitolojideki ürotelyumun papiller büyümesi olarak tanımlanır. Burada hücre katmanlarını saymaya ihtiyaç yoktur (85,86). Bu lezyon ürotelyal tümörlerin %1'inden azını oluşturur ve endoskopik rezeksiyon sonrası hemen hemen hiç nüksetmez. Bununla birlikte, histolojik bir papillom aynı mesanede daha yüksek dereceli bir ürotelyal kanserle beraber bulunabilir.

Düşük Malign Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplazm (DMPPÜN)

DMPPÜN hücre katlarının sayısı hesaba katılmaksızın, minimal yapısal anormallikler ve minimal hücresel atipi içeren hücrelerin papillada sırayla dizilmesidir. DMPPÜN'deki ürotelyum papillomlardan daha kalın olup nükleus belirgin olarak büyümüş ve bir miktar hiperkromatiktir. Hücre olgunlaşmasında tabandan yüzeye doğru bakıldığında bir karmaşa izlenmez ve az miktarda mitotik figürlere rastlanır bunlar genellikle bazal tabakaya sınırlıdır (67). DMPPÜN tek başına saptandıklarında bile genellikle nüks ederler ve nüks eden tümörler daha yüksek histolojik derece ve evrede olabilir (86).

Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom

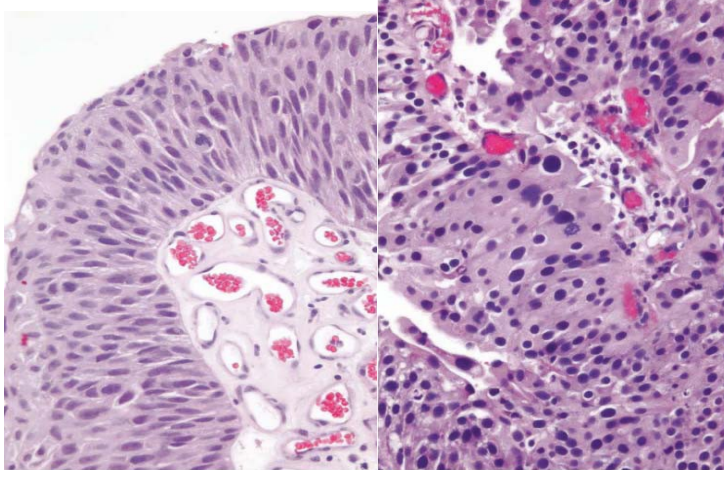
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom mikroskopik incelemede kolayca tanınabilen sırayla dizilmiş yapısal ve sitolojik değişikliklerle karakterizedir. Nükleus boyutu, şekli ve kromatin niteliğindeki değişiklikler minimaldir, fakat kesin sitolojik atipiyi içerir. Hücre polarite kaybı daha yüksek ve çekirdek/sitoplazma oranı daha fazla olmakla birlikte, daha fazla nükleer pleomorfizm görülür ve nükleolus daha belirgindir. (Şekil 2)

Mitotik figürler DMPPÜN'ye göre daha sık görülmesine rağmen seyrek ve genellikle ürotelyumun alt yarısında görülür, fakat herhangi bir seviyede de rastlanabilir (67).

Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom

Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlar mikroskopik incelemede düzensiz dizilimleriyle karakterizedir. Bu düzensizlik hem yapısal hem de sitolojik özelliklerinde izlenir. Yapısal olarak hücreler irregüler ve kümelenmiş olarak görülür ve epitelin organizasyonu bozulmuştur. Çekirdek/sitoplazma oranı oldukça artmış olup sitolojik olarak orta dereceden ileri dereceye kadar yayılan bir spektrumda pleomorfizm görülür.

Nükleer kromatin kümelenme eğiliminde olup nükleolus belirgindir. Atipik formları içeren mitotik figürler sıklıkla ürotelyumun her tabakasında izlenir (67). (Şekil 2)



Şekil 2: Mesane ürotelyal karsinomlar (Sol düşük dereceli ürotelyal karsinom , sağ yüksek dereceli ürotelyal karsinom)

Sarkomatoid Karsinom

Sarkomatoid karsinomlar çoğu zaman yüksek dereceli ve evreli olarak saptanırlar. Histolojik olarak indifferansiye epitelyum kısmı ve sarkomatoid kısımlar içerirler. Bifazik olgularda; epitelyal ve sarkomatoid komponentlerin birlikte bulunduğu durumlarda tanıda zorluk yaşanmaz. Ancak pür sarkomatoid komponent içeren tümörlerde lezyonu primer sarkomdan ayırmak güçleşir. Bu durumda immünohistokimyasal çalışmalara gerksinim duyulur. Epitelyal komponent sitokeratin ile, sarkomatoid komponent ise vimentin ile pozitif boyanma gösteriri ve ayırıcı tanıda yararlanılabilir. Prognozu kötü olan bu tümörde nodal ve uzak metastaz oranı siktir (87).

Nested Karsinom

Seyrek görülür ve daha çok erkeklerde saptanır. Histolojik olarak kümeleşme gösteren, belirgin atipi içermeyen tümöral hücre grupları bulunur. Yüzeyel hücre gruplarında atipi bulunmaması benign lezyonlarla karışmasına sebep olabilir, ancak derin tabakalarda belirginleşen hüresel atipi mevcuttur. Sitolojik olarak atipi belirgin

olmasada hastalığın prognozu kötüdür (88).

Mikropapiller Karsinom

Mikropapiller karsinom seyrek görülür ve daha çok erkeklerde saptanır. Histolojik olarak tipik özelliği tümör hücrelerinin kümeler oluşturarak, çevre dokuda boşluklar oluşturması ve bu boşluklarda mikropapiller yapılar oluşturmasıdır. Prognozu kötüdür (89).

Lenfoepitelyoma Benzeri Karsinom

Histolojik olarak tümör lenfoid hücrelerden zengin tabakalar içerir. Ayırıcı tanısında lenfoma, lenfoid hücrelerden zengin normal ürotelyum, inflamatuvar reaksiyonlar yer alır. İmmünohistokimyasal olarak epitelyal hücrelerde sitokeratin pozitifliği vardır. Tamamen lenfoepitelyal özellikteki tümörlerin sistemik kemoterapiye cevap oranı yüksektir (90).

Küçük Hücreli Karsinom

Mesanein küçük hücreli karsinomu diğer organların küçük hücreli karsinomu ile benzer özellikler göstermektedir. Bu nedenle metastaz ve komşu organlardan yayılım dışlandıktan sonra primer mesane küçük hücreli karsinomu tanısı konulabilir. İmmünohistokimyasal olarak kromogranin, sinaptofizin gibi nöroendokrin belirteçler genellikle pozitifdir. Prognozu kötü olan bu karsinomda 5 yıllık yaşam beklentisi % 20'nin altındadır (91,92).

İndifferansiye Dev Hücreli Karsinom

Yüksek dereceli bir ürotelyal karsinom bazen farklılaşma göstermeyen geniş eozinofilik sitoplazmalı, iri pleomorfik, çok çekirdekli dev hücreler içerir. Bu tümördeki dev hücreler neoplastiktir ve belirgin anaplazi gösterirler. Dev hücreli karsinomda prognoz kötüdür (93).

MESANE KANSERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI VE DOĞAL SEYRİ

Mesane tümörlerinin % 90'dan fazlası transizyonel hücreli karsinomdur. Tanı anında %60'dan fazlası düşük dereceli ve kasa invaze olmayan kanserlerdir. Ancak düşük dereceli, kasa invaze olmayan kanserlerin %10' u kasa invaze hale geçip, metastaz yapma yeteneği kazanacaktır (94). Mesane kanserlerinin %25'i tanı anında kasa invaze ve ilerleyici özelliktedir (95). Tüm bu bilgilerin ışığında mesane kanserinin doğal seyri karmaşıklığı ortaya çıkmaktadır.

Mesane kanseri tanısı alan hastalarda doğal seyri öngörebilmek için öncelikle hastalığın evresi ve histolojik tipi tanımlanmalıdır. Ancak hastalığın heterojen yapısı çoğu zaman evreleme ve histolojik tiplendirme ile yapılan öngörülerini sınırlı kılmaktadır.

Değişken doğal gidişi öngörebilmek için kanser hücrelerinin özelliklerinden yararlanılabilir. Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran temel özellikler; apoptotik mekanizmalardan kurtulma yeteneği, kanser hücrelerinin kendisine özgü çoğalma yeteneği, çoğalma önleyici sinyallere direnç göstermesi, angiogenezi artırıcı mekanizmalara sahip olması, doku invazyonu ve metastaz yapabilme yetenekleridir (96).

Normal hücre yapısında bulunan genler; mutasyonlar, translokasyonlar, allellerin yapı değişikliği sonucunda onkogen haline gelebilmektedirler. Genetik yapıdaki bu değişiklikler hücre siklusünde değişikliklere, bazı proteinlerin aşırı ekspresyonuna ve sonuçta fenotipik değişikliklere sebep olacaktır (96).

Hücre Döngüsünü Düzenleyen Yolaklar

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran en önemli özellik hücre döngüsünün sağlıklı işlememesidir. Tümör baskılayıcı genler ve bu genlerin kodladığı proteinler

hücre döngüsünün G0 ve G1 fazlarında etki etmektedir (97,98)

Genetik değişiklikler allellerdeki mutasyon, silinme veya metilasyon sonucu olmakla birlikte, sıklıkla her iki gen kopyasında oluşan değişiklikler sonrasında fenotipik ekspresyon ortaya çıkar. Çoğunlukla onkogenlerde görülmekle beraber, P53 geninde olduğu gibi tümör baskılayıcı bazı genlerde de sadece bir kopyanın değişmesi fenotipik değişikliklere yol açabilir.

Tümör Süpresör Genler ve Onkogenler

Retinoblastom (RB) Geni

Kromozom 13q14 yerleşiminde bulunan RB geni, hücre döngüsünün G1/S fazını engelleyen bir fosfoprotein kodlanmasından sorumludur (99,100). RB geninin kodladığı proteindeki değişiklikler, hücre çoğalmasında artışa neden olacaktır. RB inaktivasyonunun değişik kanserlerde karsinogenez ve prograsyonda önemli yeri olduğu bilinmektedir (101). RB değişimleri yüksek derece ve evredeki tümörlerde bulunur (102). RB kaybı olan hastalarda genel yaşam süresi evreden bağımsız olarak RB kaybı olmayanlara göre daha kötüdür (103). Özellikle kasa invaze tümörü olan hastalarda RB kayıpları, yaşam beklentisinin daha kısa olacağını göstermektedir (103).

P53 Geni

Kromozom 17p13 yerleşimli P53 geni, hücre döngüsünün durdurulmasında hayati öneme sahip bir proteini kodlamaktadır (104). DNA hasarı durumunda hücre döngüsünü durdurmak için hücre içi P53 protein düzeyleri artar. Böylece hatalı DNA'nın tamirine olanak tanınır ve hatalı DNA'ların yapılması önlenir (105). P53 gen mutasyonları insan kanserlerinde en sık saptanan genetik bozukluktur (106).

İnvaziv mesane kanseri nedeni ile radikal sistektomi uygulanan hastalarda P53 ekspresyonundaki değişimler hastalık nüksünü önemli oranda arttırmakta ve vahşi tip P53 ekspresyonu olan hastalarla karşılaştırıldığında yaşam sürelerinin azaldığı görülmektedir (107). Tümör derecesi, patolojik evre ve P53 varlığı çoklu değişken

analizde değerlendirildiğinde, çekirdekte P53 birikiminin hastalığın doğal seyrini etkileyen bağımsız bir belirleyici olduğu anlaşılmaktadır (107). Çekirdekte P53 birikimi kasa invaze tümörlerde ek bir prognostik faktör olmasının yanı sıra, intravezikal BCG tedavisi uygulanan yüzeysel mesane kanserli hastalarda nüksü öngörebilmektedir (108,109). BCG tedavisi sonrası progresyonu öngörmeye de P53 pozitifliğinin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (110). Lokal ileri veya metastatik mesane tümörü olup, P53 negatif hastaların kemoterapiye daha iyi yanıt verdiği bilinmektedir (111). Bunun yanında, sistektomi uygulanan P53 pozitif hastalarda adjuvan tedaviye daha iyi yanıt alınması (112) ve P53 pozitifliği ile sisplatin tabanlı kemoterapiye yanıt arasında ilişki kurulamaması (113), kemoterapi uygulanan ileri evre mesane kanserlerinde P53'ün hastalığın doğal seyrindeki rolünü yine tartışmalı kılmıştır.

P21 Geni

P21 gen değişimleri mesane kanserlerinde nadir görülmektedir (114). Hücre döngüsündeki P53 düzenlemesi P21 ekspresyonu aracılığı ile olmaktadır (104). Ancak yapılan çalışmalar P21' in P53'den bağımsız olarak hücre döngüsünü etkileme gücü olduğunu göstermektedir (114). Hücre döngüsünde P53 ve P21' in birlikte veya ayrı olarak çalışması mesane kanserinin doğal seyrini öngörmeye P21'den yararlanılabileceğini düşündürmüştür (114,115). Radikal sistektomili hastalarda P21 tümör nüksünü ve yaşam süresini bağımsız olarak öngörebilmektedir (114). Yüzeysel mesane kanserlerinde P21 negatifliği P53 değişimlerinin yıkıcı etkisini arttırmaktadır (116).

P27 Geni

Meme, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde P27 ekspresyonundaki azalmanın, hastalığın doğal seyrine etkisi bilinmektedir (117-119). Ürotelyal karsinomlarda tümör derecesi, evresi ve ölüm oranı arttığında P27 ekspresyonu azalmaktadır (120). Bu bilgi düşük dereceli, kasa invaze olmayan karsinomlarda P27 ekspresyonunun artması ile de desteklenmektedir (121). Yüzeysel mesane kanserlerinde P27'nin azalmış ekspresyonu erken nüksün bir göstergesidir

(122). Kasa invaze karsinomları olan hastaların verileri ile gerçekleştirilen çoklu değişken analizlerde P27 bulguları genel yaşam süresini öngörmeye en güçlü gösterge bulunmuştur (121).

Ki – 67 Geni

Ki – 67 hücre döngüsünde proliferasyon yapan hücrenin çekirdeğinde bulunur ve G1 fazından mitozaya gidiş sırasında düzeyi artar (123). Ki – 67 ekspresyonunun mesane tümörlerinin doğal seyrini öngörmeye etkili olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (124,125). Çoklu değişken analizlerde, P53 ve Ki -67 ekspresyonları hastalığı özgü yaşam süreleri bakımından bağımsız birer faktör olarak bulunmuştur (124).

Siklin D1 ve Siklin E

Hücre döngüsünün düzenlenmesinde G1 fazından S fazına geçişte ana düzenleme siklin/siklin bağımlı kinaz (Cdk)/retinoblastom proteini yoluyla yapılır. G1 fazının düzenlenmesinde siklin D ve siklin E sorumludur (126). Mesane tümörlerinde siklin D1 ve E ekspresyonlarının etkileri konusunda kesinleşmiş sonuçlar bulunmamaktadır (126).

Kasa invazyon olmayan mesane kanserlerinde, azalmış P27 ekspresyonu, artmış Ki-67 ekspresyonu, düşük siklin D1 ekspresyonu, çok hızlı tümör nüksünün belirteçidir (127). Mesane kanseri olgularında siklin E1 ekspresyonundaki azalma, ileri evre hastalık, lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur. Çoklu analizlerde siklin E1 ekspresyonundaki azalma kansere özgü sağkalımı olumsuz etkilemekle birlikte, hastalığın nüksüne etkisi gösterilememiştir (128).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), epidermal büyüme faktörü (EGF) ile aktive olan ve aktivasyonu ile hücre içi tirozin kinazın fosforillenmesi ile hücrede proliferasyon, transformasyon ve bölünmeyi gerçekleştiren bir reseptördür. Normalde

bu reseptör ürotelyumun bazalinde yerleşmektedir ancak transizyonel hücreli karsinomda epitelin tüm katmanlarında bu reseptöre rastlanır (129). EGFR ekspresyonu ile yüksek dereceli ve evreli mesane tümörleri arasında bağlantı olup, EGFR ileri evre hastalıkta hastalığın doğal seyrini etkileyebilecek bir faktördür (1130). Yeni tanı konulan mesane tümörlerinde EGFR ekspresyonunun yaşam ve evre progresyonu öngörüsünde bağımsız belirleyici olduğu bilinmektedir (131). İnvaziv mesane kanseri nedeni ile sistektomi uygulanmış hastalarda %86 oranında EGFR ekspresyonu belirlenmesine karşın, prognostik önemi ortaya konmamıştır (132).

HER- 2

EGFR gibi bir transmembran glikoproteini olan HER-2 ligand-bağımsız bir tirozin kinaz aktivitesi oluşturarak hücre çoğalmasını sağlar (133). Mesane kanseri olgularında HER-2 ekspresyon düzeyinin yükseldiği ve ekspresyon ile ileri tümör evresi, tümör progresyonu, metastatik hastalık gelişimi, yaşam süresinde azalma ile ilişki saptanmıştır (134-136). Buna karşın diğer bazı çalışmalarda HER 2 ekspresyonunun prognozu tayin etmede tümör derecesi ve evresi gibi diğer prognoz belirleyicilere ek katkı sağlamadığı gösterilmiştir (137).

H-RAS

H-Ras genindeki mutasyonlar, mesane kanseri gelişimi ve progresyonu ile ilişkili bulunmuştur. Ras onkogenindeki değişiklikler mesane kanserli hastaların %20 kadarında görülmektedir (138). H-Ras genindeki aşırı ekspresyonun, kasa invaze olmayan mesane tümörü hastalarında erken nüksle sonuçlanacağını öne süren çalışmalar olduğu gibi, bunun tersini savunan çalışmalarda bulunmaktadır (139).

C- MYC

C- myc onkogeninin aşırı ekspresyonu, mesane kanseri dışında birçok tümörde gösterilmiştir (140). Myc gen ailesi, hücre çoğalmasının düzenlenmesinde önemli

görevler üstlenmektedir. Kromozom translokasyonu ve gen amplifikasyonu myc gen ailesinin düzenini bozmakta ve hücre çoğalmasında artışa sebep olmaktadır.

Mesane kanserlerinde tümörün derecesi ve c-myc ekspresyonu arasında ilişki olduğunu saptayan çalışmalar olmasına karşın (141), tümör nüksü, progresyon veya yaşam süresiyle ilişkisini göstermeyen çalışmalarda bulunmaktadır (142).

BCL- 2

Artmış bcl-2 ekspresyonu, hücre döngüsünü etkileyerek apoptozise gidişi engellemektedir. Yapılan çalışmalarda mesane tümörü nedeni ile endoskopik rezeksiyon ile tedavi edilen hastalarda, tümör nüksü ve progresyonu hakkında bilinen faktörlere ek katkı sağlamadığı gösterilmiştir (143). Ancak mesane tümörüne yönelik radyoterapi alan hastalarda progresyona etkili olduğu görülmektedir (144).

Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının yanı sıra angiogenez ve apoptotik sürecin düzenlenmesinde de görevlidirler. Bu faktörlerin tümör oluşumu ve progresyonu ile ilişkileri de bilinmektedir.

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Epiderman büyüme faktörü ailesi, hücre çoğalması ve farklılaşmasında görev alır ve çoğu epitelyal kanserde aktivitelerinin arttığı bilinmektedir. İnvaziv mesane tümörü nedeni ile sistektomi yapılan olguların %45'inde EGF ekspresyonu belirlenmiş, ancak yaşam süresi ile ilişkisi gösterilememiştir (132).

Transforming Büyüme Faktörü – Alfa (TGF-alfa)

Mesanedeki kanserli dokuda TGF-alfa düzeyi artmaktadır. Bir çalışmada mesane tümörlü olguların %60'ında TGF-alfa düzeyinin arttığı ve TGF- alfa düzeyi ile sağkalım arasında ilişki olduğu bulunmuştur (132). Ayrıca, TGF- alfa ve EGFR ekspresyonu ile

kasa invaze olmayan ürotelyal tümörlerin nüksü arasında ilişki bulunmaktadır (145,146).

Angiyogenez İle İlgili Belirteçler

Malign dönüşüm görülen dokularda tümör dokusunun büyümesi ve metastatik özellik kazanabilmesi için angiogenez gereklidir. Fizyolojik koşullarda angiogenez nadiren gerçekleşir. Tümör hücrelerinden salgılanan angiogenez uyarıcı faktörler ve çevre dokudan salgılanan angiogenez baskılayıcı faktörler tümör invazyonu ve metastaz yeteneği açısından çok önemlidir.

Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (b-FGF)

Temel fibroblast büyüme faktörü birçok hücre için mitojenik özellik taşımaktadır. Mesane tümürlü olgularda b-FGF düzeyinin sağlıklı bireylerden yüksek olduğu bilinmektedir (147). Kasa invaze mesane tümürlü hastalarda idrar b-FGF düzeyi tümör evresi ile paralellik göstermektedir. İleri evre mesane kanserli hastalar değerlendirildiğinde b-FGF ekspresyonu ile lokal nüks ilişkili bulunmuştur, ancak hastaların yaşam süreleri ile ilişki saptanamamıştır (148,149).

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) tümör angiogenezinin majör düzenleyicisidir. Geniş serilerde VEGF düzeyinin mesane kanserli olgularda arttığı ve pozitifliğin tümör derecesi ve nüksü ile ilişkili olduğu bulunmuştur (150). Yüksek dereceli veya kasa invaze mesane kanserli olgularda, sistektomi öncesi VEGF düzeyinin yüksek olması, düşük üç yıllık sağ kalım oranı ile ilişkili bulunmuştur (150).

Siklooksijenaz -2 (COX-2)

Pro-anjiyogenik bir molekül olan siklooksijenaz-2 (COX-2) özgün inhibitörlerinin bulunması nedeniyle malign hastalıkların tedavisinde sıkça gündeme gelmektedir. Radikal sistektomi ile tedavi edilen ve COX-2 ekspresyonu saptanan

mesane tümörlü hastaların %31'inde lokal invazyon ve nüks ile COX-2 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (151). Ancak bu bulgu yaşam süresini öngörmemektedir. T1G3 hastalık nedeni ile transüretal tümör rezeksiyonu uygulanan ve 6 haftalık BCG tedavisi alan hastalarda nüks ve progresyonu öngörmede COX-2 ekspresyonu önemli bir gösterge olarak bulunmuştur (152).

Anjiyogenez İnhibitörleri

Trombospondin -1 (TSP-1)

Anjiyogenez inhibitörü olarak birçok madde tanımlanmıştır. Trombospondin-1 (TSP-1) bu maddeler içinde mesane kanserli olgularda en fazla araştırılmıştır.

Normal ürotelyal dokuda yüksek düzeyde bulunan TSP-1, VEGF ve b-FGF tarafından başlatılan anjiyogenezi inhibe etmektedir (153). İnvaziv mesane kanserli hastalarda düşük TSP-1 oranları yüksek nüks oranları ve daha kısa yaşam süreleri ile ilişkili bulunmuştur (154). Düşük TSP-1 ekspresyonu olan hastalarda mikrovasküler yoğunluk artmaktadır (155).

Ekstrasellüler Matriks Proteinleri ve Bazal Membrana Etki

Eden Faktörler

Laminin -P1

Temel bir bazal membran proteini olan lamininin proteolitik fragmanına laminin-P1 ismi verilmektedir. Mesane ürotelyal karsinomu olan hastalarda serum laminin-P1 düzeyi tümör sayısı ve boyutu ile ilişkili bulunurken, tümör derecesi ile ilişkisi bulunmamıştır (156).

Katepsin -D

Tümör invazyonu ve metastaz gelişimi katepsin-D gibi proteazların ekstrasellüler matriksi parçalaması ile gelişir. Mesane kanserinde katepsin-D

ekspresyonuna EGF ekspresyonunun eşlik ettiği bilinmektedir. Kanserli dokuda katepsin-D boyamasının negatif olması kötü klinik gidişi göstermekle beraber, bilinen diğer belirteçlerle birlikte değerlendirildiğinde üstün olmadığı gösterilmiştir (157).

Ürokinaz Tip Plazminojen Aktivatör

Ürokinaz tip plazminojen aktivatör (u-PA) ekstrasellüler matriksi parçalayan ve diğer proteazları aktive eden plazmini aktive bir proteazdır. Yüzeysel mesane kanseri nedeni ile transüretal rezeksiyon yapılan olgularda u-PA pozitifliği, invazyon ve metastaz açısından, evre, tümör derecesi, tümör sayısı, boyutu karşılaştırıldığında en önemli risk faktörü olarak ortaya çıkmıştır (158). Mesane tümörü nedeni ile sistektomi yapılan hastalarda, cerrahi öncesi plazma u-PA düzeyinin yüksek olması bölgesel lenf nodu tutulumu, lenfovasküler invazyon, hastalığın prognozu ve hastalığa özgü yaşam süresi ile ilgili bulunmuştur (159).

Matriks Metaloproteinazlar

Matriks metaloproteinazlar (MMP) bazal membran ve ekstrasellüler matriksi parçalayan enzim ailesidir. Hücrelerin migrasyon ve invazyonuna etki ederek tümörün ilerlemesi ve metastazında önemli rol oynar. Doku örneklerinde ve idrarda MMP düzeylerini belirlemek mümkündür. MMP'nin işlevleri doku metaloproteinaz inhibitörleri (TIMPs) ve aktive edici membran tip matriks metaloproteinaz (MT-MMPs) tarafından düzenlenmektedir. Mesane kanserli hastaların mesane yıkama örnekleri değerlendirildiğinde pro-MMP'nin aşırı ekspresyonunun yüksek dereceli tümör ve evre ile ilişkili olduğu saptanmıştır (160). Bir başka çalışmada ise serum MMP 2/TIMP 2 oranının ileri evre ürotelyal kanser ile ilişkili olduğu bulunmuştur (161).

CD 44

Transmembran bir glikoprotein olan CD 44 hücre yüzeyinde yoğun olarak bulunur ve adezyon molekülü olarak hücreler arası ve hücre-matriks arası etkileşimi sağlar. CD 44 alt tipi CD44v6 yüzeysel mesane kanserlerinde, kanser evresindeki artış ile

ters orantılı bulunmuştur (162). Mesane kanserinin doğal seyrini öngörmeye CD44 ekspresyonunun önemli olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (162).

MESANE KANSERİNDE SEMPTOMLAR, TANI VE EVRELEME

SEMPTOMLAR

Mesane kanserinde en sık görülen bulgu ağrısız hematüridir ve hastaların yaklaşık % 85'inde görülür. Hematüri hemen her zaman aralıklı olarak görülür. Mesane irritabilitesi, sık idrara çıkma, acil işeme hissi ve dizüriden oluşan semptomlar kompleksi ikinci en sık görülen geliş şeklidir ve yüzeysel mesane kanserinden ziyade genellikle yaygın CIS ya da kasa invaze mesane kanserini düşündürür. Mesane kanserinin diğer bulgu ve belirtileri arasında üreteral obstrüksiyona bağlı bel ağrısı, alt ekstremitte ödemi ve pelvik kitle sayılabilir. Çok nadir olarak da hastalar başvuru anında ilerlemiş hastalık belirtileri olan kilo kaybı, abdominal ağrı ya da kemik ağrısı ile başvurabilirler.

TANI YÖNTEMLERİ

Ultrasonografi

Transabdominal ultrasonografi renal kitlelerin değerlendirilmesinde, hidronefrozun saptanmasında ve mesane içi dolun defektlerinin tespitinde oldukça yararlı bilgiler vermektedir. Direkt üriner sistem grafisi ile birlikte kullanıldığında intravenöz ürografiye eşdeğer bilgi sağlamaktadır.

Şekil 3: Mesane kanseri ultrason görüntüsü



İntravenöz Ürografi

İntravenöz ürografi ile böbrek kaliksleri, renal pelvis, ureterler veya mesanedeki büyük kitlelere bağlı dolum defektleri görülebilir. Üreter tümörlerinde görülebilecek olan sekonder hidronefrozun saptanmasında yardımcıdır. Ancak mesane tümörü saptanan bir hastada üst üriner sistemin değerlendirilmesinde anlamlı bulgu verme insidansı düşük olduğu için rutin yapılacak tetkikler arasında değildir (163,164).

İdrar Sitolojisi

İdrar sedimenti ya da mesane yıkamasının mikroskopik incelemesi ile malign ürotelyal hücreler görülebilir. Sitolojik inceleme yüksek dereceli tümörlü ve karsinoma in situ olan hastalarda daha duyarlı bir yöntemdir. Bununla birlikte yüksek dereceli tümörü olan hastalarda bile idrar sitolojisi % 20 oranında yanlış negatif sonuç verebilmektedir. Ürotelyal atipi, inflamasyon, pelvik radyoterapi ya da kemoterapiye bağlı değişiklikler sitolojide doğru tanıya varmayı engelleyecek yanlış pozitifliğe neden olabilir (165). Mesane kanserinin tanısında yıkama ile alınan örnekler, normal miksiyona göre daha fazla yüzeysel hücre örneği toplandığı için daha değerlidir.

Flow Sitometri

Flow sitometri DNA'ya bağlanan floresan bir boya ile nükleusları boyanmış olan hücrelerdeki DNA miktarını ölçer. Böylece bir tümördeki anöploid hücre popülasyonunu ve proliferatif aktiviteyi hesaplayabilir. DNA'sı diploid tümörler daha düşük derece ve evrede olmaya meyillidir ve bu hastaların prognozu daha iyidir. Triploid ya da tetraploid kromozom sayısına sahip olan tümörler kötü patolojik özellikler taşırlar ve hastaların prognozu kötüdür (166). Flow sitometri ile birden fazla parametrenin aynı anda ölçülebilmesi (hücrelerin DNA ve sitokeratin için boyanabilmeleri gibi) yoluyla, tümör hücreleri ile aynı karakterleri gösterebilen beyaz kan hücreleri gibi malign olmayan hücrelerin devre dışı bırakılabilmesi bu testin prognostik değerini artırmaktadır. Flow sitometri diploidi olan düşük dereceli yüzeysel

tümörlerde yanlış negatif sonuçlar vermektedir. Bununla birlikte anöploidi görülen CIS ya da yüksek dereceli malignitesi olan hastalarda daha doğru sonuçlar (%80-90) alınabilmektedir. Ancak mesane kanserli hastaların takibinde flow sitometri idrar sitolojisinin yerini alamamıştır (167).

Kantitatif Florans Görüntü Analizi

Bu teknik ile hücrelerin her birindeki DNA miktarı kantitatif olarak ölçülebilir ve bu yönüyle flow sitometriye üstünlüğü bulunmaktadır. Çünkü burada hücreler tek tek incelenirken flow sitometride hücre popülasyonları genel olarak değerlendirilmektedir. Bu özelliği nedeniyle özgüllük kaybına neden olmadan düşük dereceli mesane tümörlerinin tanısında, hem standart sitolojiden, hem de flow sitometriden daha hassastır (168).

Evreleme

Hastanın yüzeysel ya da kasa invazif tümörünün olması tedavi kararını etkiler. Yüzeysel tümörlerde metastaz riski çok düşük olduğu için detaylı evreleme teknikleri yapmaya gerek yoktur. Ancak kasa invaze mesane kanserinde kemik sintigrafisi, bilgisayarlı tomografi (BT) ve diğer yöntemler gibi detaylı inceleme gerekir. Mesane tümörünün transüretal rezeksiyonu penetrasyon derinliğine karar vermedeki en önemli testtir.

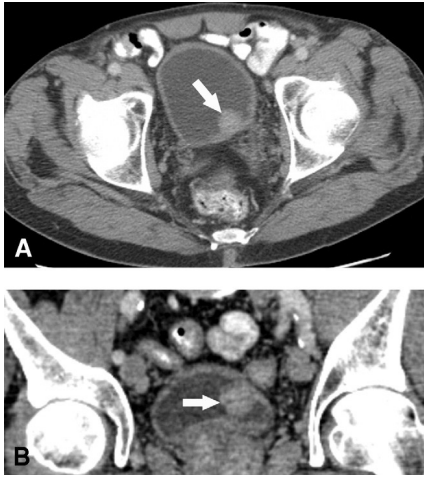
Transüretal rezeksiyon yapılarak invazyon derinliği 4 mm'den daha fazla saptanan tümörlerde, daha az invaze olmuş tümörlere göre ekstrevezikal yayılım anlamlı olarak fazladır. Diğer yandan ekstrevezikal yayılımı olan hastaların %40'ından fazlasında invazyon derinliği 4 mm'nin altında olarak bulunmuştur. Bununla birlikte invazyonun derinliği yüzeysel kas tutulumunu derin kas tutulumundan ayırmada yardımcı değildir (169). Evrelemeye dayanarak tedavide verilecek ikinci karar agresif ama potansiyel olarak küratif tedavilerden fayda görebilecek invazif tümörlü hastaları tespit etmektir. Bu amaçla USG, BT ve magnetik rezonans görüntüleme (MRI) kullanılarak, mesane tümörünün lokal yayılımı değerlendirilir. Mikroskopik adale tutulumu ve

minimal ekstrevezikal tümör yayılımını değerlendirmede transüretal USG dışındaki (170) diğer tüm yöntemlerin hatalı sonuç verebileceği bildirilmiştir (171).

Evreleme Testleri

Bilgisayarlı tomografi (BT) primer tümörün yaygınlığını tayin etmenin yanı sıra pelvik ve paraaortik lenfadenopati ve organ metastazları hakkında da bilgi verir. BT nodal metastazların % 40-70'ini taramakta yetersiz kalmaktadır. Akciğer metastazlarını tanımada en duyarlı metod akciğer BT'dir, ancak bu tetkikte saptanan 1cm'den küçük non-kalsifiye lezyonların çoğu granülozdur. 1 cm ya da daha büyük çaptaki nonkalsifiye lezyonların çoğu metastaz ya da primer akciğer neoplazmıdır.

Şekil 4: Mesane tümörünün BT görüntüsü



Manyetik rezonans (MR) görüntüleme, BT'den daha fazla yardımcı değildir. Cerrahi evrelemeye giden invazif mesane tümürlü hastalarda, yapılan üç boyutlu MR tetkikinin nodal metastazları tanımada % 75 duyarlık ve % 96 özgüllük sağladığı bildirilmiştir (172). Kemik metastazlarının varlığına karar vermede MR, BT'den ve radyonüklid kemik sintigrafisinden daha duyarlı olduğu için, klinik yaklaşımda bu açıdan kullanılır olmuştur.

Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) kitleleri, primer tümörleri ve metastazları değerlendirmede yararlı bir yöntemdir. PET lokalize tümör değerlendirilmesinde

kullanışlı bir yöntem iken, sistektomi sonrası eski tümör yatağında gelişen metastatik lezyonların tanısındaki yeri kısıtlıdır.

Karaciğer fonksiyon testleri ve özellikle de alkalen fosfataz düzeyi normal olan hastaların kemik sintigrafilerinde nadiren metastatik hastalığa rastlanır.

Bölgesel lenf nodu tutulumunu göstermenin en kesin yolu pelvik lenfadenektomidir. Mesanenin primer lenfatik drenaj alanları perivezikal, hipogastrik, obturator, eksternal iliak ve presakral lenf bezleridir. Lenf nodu tutulum insidansı, tümörün evre ve derecesi ile orantılıdır. Mesane kanserinde standart evreleme için lenfadenektomi, iliak bifurkasyondan femoral kanala ve genitofemoral sinirlerden mesane pediküllerine kadar olan lenf bezlerinin çıkarılmasını içerir.

Evreleme Sistemleri

Mesane kanserinde temel evreleme sistemi olan “Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sınıflaması, International Union Contre le Cancer (UICC) tarafından geliştirilmiş ve 2002 yılında en son hali kabul edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5: Mesane kanserinin 2002 TNM sınıflaması

T – PRİMER TÜMÖR	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait kanıt yok
Ta	Noninvaziv papiller karsinom
Tis	Karsinoma in situ-flat tümör
T1	Tümör epitel altı dokuyu tutmuş
T2	Tümör kas dokusunu tutmuş
	T2a: Tümör yüzeysel kas dokusunu tutmuş (iç yarı)
	T2b: Tümör derin kas dokusunu tutmuş (dış yarı)
T3	Tümör perivezikal dokuyu tutmuş
	T3a: Mikroskopik olarak
	T3b: Makroskopik olarak (ekstravezikal kitle)
T4	Tümör; prostat, uterus, vajen, pelvik duvar, abdominal duvar gibi yapıları tutmuş
	T4a: Tümör prostat, uterus veya vajeni tutmuş
	T4b: Tümör pelvik duvar veya abdominal duvarı tutmuş

N – LENF NODLARI	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tek bir lenf nodunda 2 cm veya daha küçük metastazlar
N2	Tek bir lenf nodunda 2 cm'den büyük, 5 cm'den küçük metastazlar, ya da çoğul lenf nodlarında 5 cm'den büyük olmayan metastazlar
N3	Bir lenf nodunda 5 cm'den büyük metastazlar
	M – UZAK METASTAZLAR
MX	Uzak metastazlar değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Kasa invaze olmayan mesane kanserleri arasında TNM sınıflamasına göre evre Ta (mukozaya sınırlı papiller tümörler), evre T1 (lamina propria invazyonu olan papiller tümörler) ve CIS (düz, mukozaya sınırlı yüksek dereceli tümörler) yer alır. Ancak moleküler biyolojik tetkikler ve klinik veriler CIS ve T1 lezyonlarının yüksek derecede malignite ve invazyon potansiyeli olduğunu göstermiştir.

MESANE KANSERİNDE TEDAVİ

YÜZEYEL MESANE KANSERLERİNİN TEDAVİSİ

Endoskopik Tedavi

Yüzeyel mesane tümörlerinde transüretal endoskopik rezeksiyonun başlıca iki amacı vardır. Birincisi, histopatolojik değerlendirme için yeterli örneğin alınmasıdır. Rezeksiyonda önemli olan doğru bir evreleme yapılabilmesi için rezeksiyonun mesanenin kas tabakasına kadar yapılmasıdır. Bu şekilde düşük evreleme oranı aşağıya çekilebilmektedir. Transüretal rezeksiyonun ikinci amacı ise tümör kitlesinin tamamen ortadan kaldırılarak, birincil tedavinin etkin yapılmasını sağlamaktır. Ancak eldeki bulgularla tümörün ileri evrede olduğunun düşünüldüğü durumlarda rezeksiyon tanı amacı ile kas tabakasına kadar yapıp, kalan tümör dokusu rezeke edilmeyebilir.

Transüretal rezeksiyonun en sık görülen komplikasyonu kanamadır. Bu komplikasyonu azaltmak için operasyon sonunda uygun koterizasyon ile mesane içi kanama kontrolünün yapılması gerekmektedir. Transüretal rezeksiyon sırasında ekstrapéritoneal veya intrapéritoneal mesane perforasyonları gelişebilmektedir. Ekstrapéritoneal perforasyonlarda mesane kataterizasyonunun 5-7 gün arası devam ettirilmesi ve uygun antibiyotik profilaksisi genellikle perforasyonun kapanması için yeterlidir. İntrapéritoneal küçük perforasyonlar da aynı şekilde tedavi edilebilirken, daha büyük perforasyonlarda genellikle açık mesane onarımı ve intrapéritoneal sıvının drenajı gerekmektedir. Uzun süren transüretal rezeksiyonlarda, kullanılan hipotonik solüsyona bağlı gelişen TUR sendromu mesane tümörü operasyonlarında, prostat operasyonlarına oranla daha az gözükmeyle birlikte, olası komplikasyonlardandır.

Günümüzde endoskopik girişimlerinin ulaşılabilirliğinin artmasından dolayı, yüzeyel mesane kanserlerinin tedavisinde açık operasyonun yeri çok azalmıştır. Ancak hastanın hayatını tehdit eden kanama durumlarında veya geniş intrapéritoneal perforasyon durumlarında açık operasyon uygulanabilmektedir.

Yüzeyel Mesane Kanserlerinde Yinelenen Transüretal Rezeksiyon (Re-TUR M)

Yapılan çalışmalarda ilk endoskopik mesane tümörü operasyonunu takiben yapılan ikinci endoskopik girişimde (Re-TUR M), %9-49 arasında değişen oranlarda düşük evreleme olduğunun saptanması , % 4-78 arasında değişen oranlarda rezidiv tümör bulunması, Re-TUR M kavramının ortaya çıkmasına sebep olmuştur (173,174).

Bu çalışmalarda rezeksiyon materyalinde mesane kas dokusu bulunmadığı durumlarda yanlış evreleme oranının arttığı saptanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalar mesanedeki tümör sayısının ve tümörün invazyon derecesinin arttığı durumlarda ilk TUR’ da rezidiv tümör kalma olasılığının arttığını göstermiştir (175).

Yinelenen TUR’un, ilk TUR’ dan 2-6 hafta sonra yapılması konusunda görüş birliği vardır. Avrupa Üroloji Derneğinin (EAU) kılavuzlarında belirttiği gibi; grade 3 Ta ve T1 tümörlerde, rezeksiyon materyalinde kas dokusunun olmadığı durumlarda, çoğul tümörü bulunan hastalarda ve ilk rezeksiyonun çeşitli nedenlerle tam yapılamadığı durumlarda yinelenen TUR (Re-TUR M) mutlaka yapılmalıdır.

Yüzeyel Mesane Kanserlerinde İntrakaviter Kemoterapi

Yüzeyel, kasa invaze olmayan, mesane kanserleri birbirinden çok farklı klinik özellikler ve prognostik değişikliklere sahip heterojen bir hastalık grubudur. Yüzeyel mesane kanserinin bu farklılıkları hastaların tedavi ve takiplerinde belli bir standardizasyonu zorlaştırmakta ve gereksiz veya eksik tedavilere sebep olabilmektedir. Bu sebeple günümüze dek bu hasta grubunun tedavi ve takip protokollerini oluşturmak için bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda 2002 yılında Avrupa Üroloji Derneği (EAU) yüzeyel mesane kanserlerini histopatolojik özellikleri ve prognostik özelliklerine göre üç gruba ayırmıştır (Tablo 6).

Tablo 6: Mesane kanseri risk grupları

Düşük risk grubu	Orta risk grubu	Yüksek risk grubu
Grade 1, evre Ta Grade 1, evre T1, < 3cm tek tümör	Grade 1 evre 2, multipl tümör Grade 2 evre Ta tümör Grade 2 evre 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 tümör

Bu risk grupları için rekkürrens, prograsyon ve mortalite oranları belirlenmiştir. Sırası ile düşük risk grubunda bu oranlar % 37,%0, %0 , orta risk grubunda % 45, % 1.8, % 0,73 iken yüksek risk grubunda %54, %15 ve %9.5 bulunmuştur (176).

Bu yüksek rekürrens ve progresyon oranlarından dolayı, yüzeysel mesane kanserlerinin tedavi ve takibinde sadece transüretal mesane rezeksiyonunun yeterli olmadığı ortaya çıkmaktadır. Yüzeysel mesane kanserlerinin tedavisinde kullanılan intrakaviter ajanların amacı, bu tümörlerin rekkürensini ve prograsyonunu azaltmaktır.

İntrakaviter tedavide ilk denenen ajan gümüş nitrattır. 1960' larda ise lipofilik alkilleyici bir ajan olan Tiotepa bu amaçla kullanılmaya başlanmıştır. Ardından birçok ajan; Mitomicin C, doksurobisin, epirubicin, gemitabin gibi, bu amaçla araştırılmış ve kullanıma girmiştir. Ve günümüzde transüretal mesane tümörü rezeksiyonu sonrası tümör nüks ve progresyonunu azaltmada intrakaviter kemoterapi uygulanması üroloji kılavuzlarına girmiş durumdadır.

İntrakaviter kemoterapinin en sık komplikasyonu %20-30 oranında izlenen kimyasal sistit tablosudur. Bunun dışında daha seyrek olarak, miyelosüpresyon (Tiotepa), ellerde, perine bölgesinde, yüzde ekzama benzeri düküntü (Mitomicin C), gastrointestinal yan etkiler, ateş, hipersensitivite reaksiyonları (Doksurobicin) gibi yan etkiler görülebilmektedir.

Yüzeysel Mesane Kanserlerinde İntrakaviter İmmünoterapi

Yüzeysel mesane karsinomlarının yaklaşık %70'i nüks eder ve %20-30 kadarı da progrese olarak invaziv hale geçer. Özellikle yüksek risk grubunda bulunan yüksek dereceli T1 tümörler ve karsinoma in-situ tümörler progresyon açısından yüksek riskli hastalığı oluşturmaktadırlar. Bu nedenle düşük risk grubu hastalara endoskopik tedavi tek başına veya rezeksiyon sonrası uygulanan tek doz intrakaviter kemoterapi ile uygun tedavi seçeneği gibi gözükmekte iken orta ve yüksek risk grubu hastalarda nüksü ve prograsyonunu önlemek için idame intrakaviter kemoterapi veya imminoterapinin uygulanması akıllıcadır.

İntrakaviter imminoterapi Bacille Calmette-Guerin (BCG) ile uygulanmaktadır. İntrakaviter BCG ilk kez Morales tarafından uygulanmış ve nüks oranlarında anlamlı azalma saptamıştır (177).

BCG mesane içine uygulandığında lokal Tip 1 hücrel immün yanıt oluşturarak tümör hücrelerinin kontrolünü sağlamaktadır. BCG tedavisi başlıca; karsinoma in situ tedavisi, artık tümörlerin tedavisi, nüksün ve progresyonun önlenmesi için kullanılmaktadır.

Karsinoma in situ tedavi edilmemesi durumunda %50 oranında kasa invaze tümöre dönüşmektedir ve mesane içinde çok odaklı olması nedeni ile TUR'u yeterli değildir. Bu grup hastada BCG tedavisine tam yanıt oranı %75 düzeyindedir (178). Artık tümörler için BCG kullanıldığında, ilk uygulamada yanıt oranı %15-70 arasında iken, birden fazla uygulamada tam yanıt oranı %60' a çıkmaktadır (179). BCG uygulanan hastalarda nüks oranlarını inceleyen bir metaanalizde BCG tedavisinin nüksü anlamlı oranda azalttığı belirlenmiştir (180). BCG' nin progresyon üzerine etkisini inceleyen bir metaanalizde ise kontrol grubuna göre BCG' nin progresyonu istatistiksel anlamlı olarak azalttığı ortaya konmuştur (181).

BCG tedavisine bağlı ortaya çıkan en sık yan etkiler abakteriyel sistit (%80), hematüri (%30) ve subfebril ateştir(%30). Granümatöz prostatit %1 olguda semptomatik olarak izlenmektedir. Tedavinin en şiddetli yan etkisi sistemik BCG reaksiyonudur ve bu durumda tedavi hemen kesilerek sistemik antitüberküloz tedaviye geçilmelidir.

BCG tedavisi immün yetmezliği olan, gebe, emziren anneler ve HIV pozitif hastalarda kontrendikedir. Düşkün ve ileri yaşlılık ile daha önce tüberküloz geçirme rölatif kontrendikasyonları oluşturur.

Kasa İnvaze Mesane Tümörlerinde Tedavi

Kas invazyonu olan hastalarda altın standart tedavi yöntemi radikal sistektomidir. Zaman alıcı ve morbiditesi yüksek bir cerrahi olmakla beraber son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte hem mortalite hem de sistektomi ve diversiyona ait komplikasyonlar azalmıştır. Yayınlanan geniş serilerde 10 yıllık hastalıksız sağkalım oranları %50 ile %66 arasında değişmektedir (182,183).Radikal sistektomi erkekte; mesane, prostat ve seminal veziküllerin çevre yağ dokuları ile birlikte çıkartılmasıdır.

Prostatik üretra tutulumu varsa ürektomide yapılmalıdır. Kadında bu amaçla anterior pelvik eksentrasyon yapılır. Mesane, üretra, uterus, serviks, overler ve vajen ön duvarı çıkarılır. Radikal sistektomi endikasyonları, tümörün transüretal rezeksiyonu esnasındaki izlenime ve rezeke edilen materyalin patolojik incelemesine bağlı olarak muskularis propriaya veya prostatik stromaya tümör invazyonu, yüksek dereceli ve Tis ile birlikte invaziv tümörler, intravezikal tedaviye dirençli Tis, tekrarlayan TUR'a (intravezikal tedavi ile birlikte veya değil) dirençli rekürren multifokal yüzeysel tümörler, konservatif yöntemlerle baş edilemeyecek kadar büyük yüzeysel tümörlerdir. İlave olarak ürotelyal karsinoma dışı tümörlerde (kemoterapi ve radyoterapiye daha az yanıt verirler) de sistektomi endikedir. Sistektomide bilateral lenfadenektomi ameliyatın vazgeçilmez bir parçasıdır ve pelvik lenf nodu diseksiyonu sonrası sağkalımı belirgin olarak etkilemektedir. Radikal sistektomi uygulanan hastalarda en çok obturator ve eksternal iliak lenf nodlarının tutulduğu gözlemlenmiş, ana iliak ve presakral nodların daha az sıklıkla tutulduğu saptanmıştır. Kalan üreterler için çeşitli diversiyon yöntemleri vardır. İleal loop, mesane replasmanı (substitüsyon), sigmo-rektal poş, üreterosigmoidostomi ve üreterokutanostomi bunlardan bazılarıdır. Radikal sistektomi sonrası cerrahi sınırdaki tümör bulunması, lenf nodu metastazı veya perivezikal tutulum durumunda adjuvan kemoterapi uygulanmalıdır. Sistemik kemoterapi radikal sistektomi öncesi neoadjuvan olarak da verilebilir. Bu amaçla özellikle cisplatine dayalı rejimler kullanılmaktadır. En etkilileri gemcitabin-cisplatin (GC) ve metotroksate-vinblastin-doksorubisin-cisplatin (MVAC) rejimleridir.

Metastatik Mesane Tümörlerinde Tedavi

İnvaziv mesane kanserinin standart tedavisi radikal sistektomi ve bilateral lenfadenektomidir. Ancak hastaların %50'sinde 2 yıl içinde metastaz gelişmekte ve hastalığın ilerlemesine bağlı olarak söz konusu hastalar kaybedilmektedir. Bunun en önemli sebebi ise invaziv mesane kanserinde hastaların yarısında ilk tanı anında mikrometastazların bulunmasıdır. Buna bağlı olarak lokal ileri ve metastatik hastalarda

sistemik tedavi yani kemoterapi gereksinimi olmaktadır. Genel olarak lokal ileri evre mesane kanserinde kemoterapi neoadjuvan veya adjuvan olarak uygulanabilmektedir.

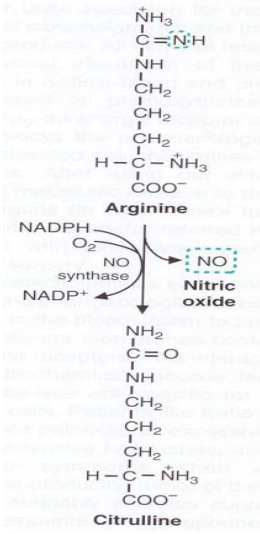
Neoadjuvan kemoterapinin amaçları; belirlenemeyen mikrometastazların tedavi edilmesi, primer tümörün evresini küçültmek ve kitleyi rezeke edilebilir hale getirmektir. Neoadjuvan kemoterapinin avantajları; tespit edilemeyen metastazların erken kontrolünü sağlaması, tümör boyutlarını küçülterek cerrahi sırasında pozitif sınır riskini azaltması ve mesane koruyucu protokollere hasta seçimini sağlamasıdır. Dezavantajları ise; düşük riskli hastalara gereksiz kemoterapi verilmesi, sağkalım üzerine etkisinin net olmamasıdır. Bunun yanında, patolojik evreye göre klinik evredeki %30'lara varan değişiklikler, özellikle kemoterapiye cevap vermeyen olgularda primer tedavinin gecikmesi neoadjuvan kemoterapinin olası olumsuzluklarıdır. Radikal sistektominin invaziv mesane kanserinde altın standart olduğu günümüzde neoadjuvan kemoterapi tartışmalı bir konu olarak kalmaktadır.

Neoadjuvan kemoterapide cisplatin bazlı kombine kemoterapi protokolleri kullanılmaktadır. Tek basına cisplatin ile uygulanan kemoterapinin faydalı olmadığı, hatta kontrol grubuna göre zararlı olabileceği gösterilmiştir. Kombine kemoterapi olarak en sık MVAC, CMV yada GC uygulanmaktadır. Birinin diğerine üstünlüğü gösterilmemiştir. Genelde tercih edilen en az 3 kür uygulanmasıdır.

Adjuvan kemoterapi genellikle ekstrevezikal yayılım ve bölgesel lenf nodu tutulumu olan hastalarda düşünülür. Bu rejimde sistektomi materyali ile patolojik evreleme yapılacağından kemoterapi verilecek olgular daha doğru seçilebilir. Ayrıca cerrahi gecikmeyeceğinden dolayı kür seansında azalmaya neden olmaz. Ancak sistektomi sonrası kemoterapi toleransının azalması ve postoperatif komplikasyonlar adjuvan kemoterapinin tamamlanmasını zorlaştırır. Yapılan tüm çalışmalarda ortak bir görüş elde edilememiş olsa da ve radikal sistektomi sonrası yüksek riskli hastalarda rutin kemoterapi uygulaması hakkında şüpheler devam etse de sonuçlar adjuvan kemoterapi uygulamasının radikal sistektomi sonrası progresyon süresini geciktirdiğini ve hastalısız sağkalım oranlarını arttırdığını göstermektedir.

NİTRİK OKSİT

Nitrik oksit (NO); nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesinin katalizör olduğu, L-arjinin ve oksijenin substrat olarak kullanıldığı bir reaksiyon ile sentezlenir. Enzim kofaktör olarak NADPH'yı kullanır (Şekil 3).



Şekil 5: NO sentezi

NO, hem hücre içi hem de hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük reaktif bir serbest radikal moleküldür. Birçok hücrel işlem; endotel, trombosit, vasküler düz kas hücreleri, nöronlar ve diğer NO üreten hücrelerden salınan NO tarafından düzenlenmektedir. Nitrik oksidin yarı ömrü 2-5 saniye arasındadır ve hızla kararlı ve inaktif olan nitrit ve nitrat son ürünlerine okside edilir. Hemoglobin NO'ı inaktive eder.

NOS enzim ailesi, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimlerini içerir. iNOS uyarılmış birçok hücre tipinden salınabilen izoenzimdir. nNOS başlıca nöronal dokuda, eNOS ise damar endotel hücrelerinde bulunur. Bu izoenzimlerin aminoasit dizilimi ve biyokimyasal özellikleri benzerlik gösterir ancak farklı kromozomlar üzerindeki ayrı genler tarafından kodlanır ve başlıca buldukları yerler ile aktivatörleri de birbirlerinden farklıdır. eNOS ve nNOS; asetil kolin ve bradikinin gibi hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artıran ajanlarca aktiflenir. Makrofajlar ve immün hücrelerde bulunan iNOS ise sitokinlerce uyarılır.

Tablo 7: NOS enzimlerinin özellikleri

Tanım	eNOS	nNOS	iNOS
Kromozom	7	12	17
Yapı	Homodimer	Homodimer	Homodimer
Moleküler ağırlığı	135 kDa	155 kDa	130 kDa

cDNAbüyükülüğü	4,4 kb	10,0 kb	4,1 kb
Düzenleme	Ca/Kalmodulin	Ca/Kalmodulin	Gen transkripsiyonu
Kofaktörler	NADPH, FAD, FMN BH4, Hem	NADPH, FAD, FMN, BH4, Hem	NADPH, FAD, FMN, BH4, Hem
Uyaran	ACh, bradikinin, ATP, ADM, proliferasyon, stres	Nöro-uyarıcı aminoasitler, östrojen	IL-1, TNF- α , NF- κ B, IFN, endotoksin, doku hasarı
NO Üretimi	Düşük (pM)	Düşük (pM)	Yüksek (μ M)
Hücre Tipleri	Endotel hücreleri, düz kas hücreleri	Nöronlar, iskelet kas hücreleri, kalp kası	Endotel hücreleri, makrofajlar, birçok hücre tipi

NOS izoenzimlerinin hepsinin ortak ürünü NO'dur. Fakat buldukları yerler ve üstlendikleri roller farklıdır. Dolaşımdaki NO'nun asıl kaynağı ise eNOS izoenzimidir (184). eNOS yüksek oranlarda damar endotelinde bulunmakla birlikte, düşük oranlarda diğer dokularda da bulunmaktadır ve sentezlediği NO ile damar tonusunu ayarlar. nNOS, düşük miktarlarda üretilip sinaptik şekillenme ve sinirsel iletimi düzenler. iNOS, uyarılma sonrasında yüksek miktarlarda üretilerek enflamatuvar olaylarda rol alır ve hücre aracılı immün cevapta etkilidir (185). iNOS enfeksiyon, enflamasyon veya vasküler travma durumlarında diğer iki NOS formunun ürettiğinin 100-1000 katı kadar NO üretimi sağlar. Buna bağlı olarak, iNOS'un ürettiği NO seviyesi, fizyolojik sınırların üstündedir ve hücrel süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) varlığında bu oldukça toksik olan peroksinitrit molekülünün oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda da hücrede lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, plazma antioksidanlarının azalması, protein hasarı ve endotelial düz kas gevşemesinin engellenmesi gibi yollarla hücrel hasar yaratabilir. Peroksinitrit oluşumu; süperoksit ile süperoksit dismutaz (SOD) üretimi ve NO üretimi ve harcanması arasındaki dengeye bağlıdır. Sonuç olarak düşük konsantrasyondaki NO, hücrel fonksiyonları pozitif olarak düzenlerken, yüksek konsantrasyon hücre üzerinde toksik etkiler yaratabilir.

Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS)

Endotelyal NOS 134 kD'luk iki benzer monomerden oluşan bir dimerdir ve tam olarak fonksiyonel olabilmesi için dimerik formda olması gerekir. Monomerleri kodlayan gen 7q35-36 kromozomu üzerinde bulunur ve 21 kb'lik 26 ekson taşır. eNOS enzimi hücre zarının kıvrılması ile oluşan çukurlarda (kaveol) ve Golgi cisminde bulunan intrastoplazmik bir enzimdir. Enzimin kaveole yönlendirilmesi ve yerleşmesinde oksijenaz bölgesine takılmış olan miristikasit ve palmitik asit önemlidir. Bunun eksikliğinde eNOS sitoplazmaya geçer ve aktivitesi azalır

eNOS enziminin esas görevi NO üretimi ile endotelyal düz kas hücrelerinde relaksasyon sağlaması ve damar tonusunu azaltmasıdır. eNOS' un başlıca uyarıcıları asetilkolin, bradikinin, serotonin ve trombindir. eNOS hücre içi Ca²⁺ artışı ile aktive olur, enzimi serin 1177'nin fosforillenmesi aktive eder. Bu aktivasyon işlemi protoonkogen olan proteinkinaz B ve bir şaperon olan ısı şok protein 90'a ihtiyaç duyar. Treonin 495'in fosforilasyonu ise eNOS'u inaktive eder (186). Ayrıca L-arjininin eNOS'a bağlanması endojen yarışmalı antagonisti olan asimetrik dimetil arjinin tarafından inhibe edilebilir. Tetrahidrobiopterin (BH4) NO sentezi için kofaktör olarak gereklidir ve eksikliğinde eNOS'da ayrışma meydana gelir. Sonuç olarak da eNOS tarafından NO'nun yerine süperoksit (O²⁻) üretilir.

Aktivatörlerin uyarısı ile eNOS tarafından üretilen NO endotelyal düz kas hücrelerine geçer ve guanilat siklaz (GC) enzimini aktifler ve guanozin trifosfat (GTP) guanozin monofosfata (GMP) dönüşür. Artan hücre içi siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyi düz kas hücrelerinde gevşemeye yol açar.

eNOS ve Kanser İlişkisi

NO' in kanser patogeneziindeki rolü tartışmalıdır. Yapılan deneysel çalışmalar NO' in kanser gelişiminde inhibitör ve aktivatör işlevleri olduğunu ortaya koymuştur (187). eNOS enziminin ise kanser hücre proliferasyonunda, apoptozisinde ve angiogeneziinde indirekt etkilerini gösteren bulgular mevcuttur.

eNOS hücre pozitifliği daha önce kolorektal, meme, beyin, pankreas kanserlerinde gösterilmiştir. Ayrıca hücre kültür çalışmalarında NO donörlerinin kullanımı ile hücre

DNA sentezinin, proliferasyonunun ve migrasyonunun arttığı gösterilmiştir. Benzer şekilde eNOS yolağının inhibisyonunun da hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bunun dışında eNOS' un tümör hücrelerini apoptozisten koruduğuna dair bulgular mevcuttur. Prostat kanser hücrelerinde vahşi tip eNOS'un tümör hücrelerini, tümör nekroz faktör ilişkili apoptozisten koruduğu gösterilmiştir (188).

Ancak eNOS'un üzerinde en çok durulan özelliği kanser angiogenezindeki işlevidir. Birçok farklı kanser dokusunun immünohistokimyasal değerlendirilmesinde, eNOS kanserli dokularda normal dokulara nazaran artmış oranlarda bulunmuştur. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve prostoglandin E2 (PGE2) gibi pro-angiogenik faktörler, kalsiyum-kalmodulin bağımlı mekanizmalar ile eNOS'u fosforilleyerek aktive etmektedirler. eNOS fonksiyonlarının inhibisyonunun angiogenezisi durdurduğu tesbit edilmiştir. eNOS bulunmayan kobaylarda iskemik doku hasarı sonrası angiogenezisin olmadığı gösterilmiştir (189).

eNOS Geni ve Polimorfizmleri

eNOS geni, 7. kromozomun uzun kolunun 35. ve 36. loküsünde yerleşmiştir. 26 ekzon içerir ve 4052 nükleotidlik bir haberci ribonükleik asit (mRNA) tarafından kodlanır. eNOS enzimini kodlayan gende şimdiye kadar yapılan araştırmalarda dizideki tek bir bazın değişmesinden kaynaklanan tek nükleotid polimorfizmleri başta olmak üzere, bazı dizilerin tekrarlanmasından kaynaklanan tekrar polimorfizmleri bulunmuştur. Bir tanesi intron 18'deki Ala27Cys, diğeri ise intron 23'teki Gly10Thr olmak üzere iki tek nükleotid polimorfizmidir. İntron 4, 13, 23'te de bazı tekrar değişiklikleri tanımlanmıştır. Promoter bölgede Thr786Cys, Ala922Gly, Thr1468Ala olarak adlandırılan üç tek nükleotid değişimi tanımlanmıştır. Ekzon bölgesinde ise Glu298Asp polimorfizmi tanımlanmıştır.

Promoter bölge, genin dışında bulunan ve kopyalanmanın başladığı kısa DNA dizisidir. Genelde promoter bölgedeki polimorfizmler mRNA kopyalanmasını etkileme, dolayısıyla enzimin düzeyini değiştirme potansiyeline sahiptir. Ekzon bölgeleri kodlanan kısımlardır. Buradaki polimorfizmler protein yapıyı etkileyerek enzim aktivitesini değiştirebilir.

Daha önce yapılan birçok epidemiyolojik çalışmada, eNOS enziminin genetik polimorfizmleri kanser hastaları ve kontrol gruplarındaki farklılıklar açısından araştırılmıştır. Bu açıdan eNOS geni için, kanserli hastalarda en çok incelenen polimorfizmler, genin intron 4 bölgesindeki tandem tekrarları (intron 4b/a) ve ekzon bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmi G894T (Glu298Asp) olarak gözükmektedir (190-192).

eNOS geninin bu polimorfizmlerinin kanserli hasta gruplarında, kontrol grubuna göre farklı dağılımı olduğu akciğer kanseri (190), prostat kanseri (191), meme kanseri (192) için yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Mesanenin transizyonel hücreli kanseri için ise literatürde henüz eNOS polimorfizmlerini değerlendiren bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmadaki amacımız mesane transizyonel hücreli kanser olgularında eNOS geninin iki polimorfizminin, intron 4 tandem tekrarı (intron4b/a) ve G894T tek nükleotid transversiyonunun değerlendirilmesidir.

MATERYAL METOD

Çalışmaya Kliniğimizde Ocak 2010 ile Ağustos 2010 tarihleri arasında mesane transizyonel hücreli kanser tanısı alan toplam 64 vaka, hasta grubu olarak alındı.

Çalışmaya hasta kabul şartları olarak; patolojik olarak kanıtlanmış mesane transizyonel hücreli kanseri bulunma, kanıtlanmış başka herhangi bir kanser öyküsü olmama, birinci derece akrabalarında kanser öyküsü olmama, herhangi bir nedenle kemoterapi veya radyoterapi tedavisi almamış olma kriterleri uygulandı.

Kontrol grubu olarak ise aynı dönemde Kliniğimize başvuran ve onkolojik ön tanıları olmayıp, benign hastalıklar nedeni ile sistoskopi uygulanan, mesane kanseri saptanmayan toplam 80 olgu alındı. Kontrol grubuna kabul şartları olarak; kanıtlanmış mesane transizyonel hücreli kanser tanısı olmama, kanıtlanmış herhangi bir başka kanser öyküsü olmama, birinci derecede akrabalarında kanser öyküsü olmama, herhangi bir nedenle kemoterapi veya radyoterapi almamış olma kriterleri uygulandı.

Hasta ve kontrol grubundaki vakalardan çalışma ile ilgili bilgi verildikten sonra bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak 10'ar ml periferik venöz kan örneği alındı. Alınan örnekler +4 C 'lik soğuk odada muhafaza edilerek toplandı ve genetik çalışmalar bütün örnekler toplandıktan sonra yapıldı.

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Laboratuvarı kullanıldı.

Genetik analizde aşağıda sırası ile anlatıldığı şekilde, öncelikle vakaların periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Ardından eNOS genleri PCR işlemi ile çoğaltılarak, DNA ürünleri elektroforez yöntemi ile değerlendirildi. Uygun bulunan eNOS gen ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek yine elektroforez yöntemi kullanılarak genin incelenen polimorfizmlerinin her vaka için genotiplenmesi yapıldı. Olguların her iki polimorfizm için genotiplenmesi yapıldıktan sonra hasta ve kontrol grupları polimorfizmlerin allel dağılımlarına göre karşılaştırıldı.

İstatistiksel analizde iki gruptaki polimorfik alleller Student's T testi ile değerlendirildi. Beklenen ve gözlemlenen değerlerin karşılaştırmaları Pearson's ki kare testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ (çift yönlü) düzeyinde değerlendirildi.

Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

- 1 Termal Döngü Cihazı
- 2 Santrifüj
- 3 Mikrosantrifüj

- 4 Yatay elektroforez sistemi
- 5 Elektroforez güç kaynağı
- 6 Elektronik Hassas Terazî
- 7 Hız ayarlı Vorteks
- 8 Otomatik pipetler
- 9 pH metre
- 10 UV transilluminator
- 11 UV görüntü analiz sistemi
- 12 Steril 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml eppendorf santrifüj tüpleri
- 13 Isıtıcı manyetik karıştırıcı
- 14 İnkübasyon cihazı

Genetik Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- 1
- 2 Agaroza (Sigma)
- 3 Tris-Base (Sigma)
- 4 EDTA, sodyum tuzu (Sigma)
- 5 Borik Asit (Sigma)
- 6 Etidyum bromür (Sigma)
- 7 Proteinaz K (Sigma)
- 8 Taq DNA polimeraz enzimi (Promega)
- 9 Mbo I Restriksiyon enzimi (Fermentas)
- 10 10 X Dream Taq PCR buffer (Promega)
- 1 Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTPs, Promega)
- 2 DNA size marker (100 bp DNA ladder, Puc 19 DNA/Msp1 Marker) (Promega)

Çalışmada Kullanılan Stok Solüsyonların Hazırlanması

- 1 **0.5 M EDTA pH 8.0**
- 1 – 18.61 g disodyum EDTA
- 2 – 80 ml bidistile H₂O içinde çözülür
- 3 – Solüsyona 2 g NaOH tableti atılarak eritilir
- 4 – pH 8'e ulaştığında bidistile H₂O ile 100 ml tamamlanır

5 - Otoklavda sterilize edilir

1 1 M Tris Tamponu (Stok)

- 1 - 121.1 g Tris base tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 mikrolitre HCl ile yaklaşık 800 ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldürüldü. Daha sonra balon jöjeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

1 10 X TBE (Stok Solüsyonu)

- 1 - 108 g Tris-base (0.9M)
- 2 - 55 g Borik asit (0.9M)
- 3 - 40 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 (20mM)
- 4 - Tris-base ve borik asit 700 ml bidistile H₂O içinde çözülür
- 1 - EDTA eklenir
- 2 - Bidistile H₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır
- 3 - Oda sıcaklığında saklanır

1 1 X TBE (Çalışma Solüsyonu)

- 1 - 100 ml 10 X TBE stoktan
- 2 - 900 ml bidistile H₂O eklenir

1 Etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml)

- 1 - 1 g Etidyum bromür
- 2 - 10 ml bidistile H₂O içinde çözülür
- 3 - Işık almayan bir şişe içinde +4 °C'de saklanır
- 4 - Stok solüsyondan, çalışma solüsyonu 0.5 mg/ml olacak şekilde hazırlanır.

DNA İZOLASYONU

Çalışma ve kontrol gruplarındaki bireylerden alınan 5 ml kan, 1 ml EDTA (%2) içeren 5 ml'lik tüplere konuldu. Daha sonra yalıtım aşamasına kadar +4°C'de saklandı.

DNA izolasyonu için **High Pure PCR Template Preperation Kit (Cat.No. 11796828001, Roche Diagnostics, Almanya)** kullanıldı. Kitin kullanım klavuzunda belirtildiği gibi işlemler aşağıdaki sırayla yapıldı:

1- 200µl EDTA'lı tam kan 2 ml'lik polipropilen tüpe alındı. 200 µl bağlayıcı tampon ve 40 µl proteinaz K eklenerek karıştırıldı. 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

2- 100µl isopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Bu karışım High Pure Filter tüpe alındı. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Altaki toplama tüpü atıldı ve üstteki High Pure Filter tüpü temiz bir toplama tüpü üzerine alındı.

3- High Pure Filter tüpü üzerine 500 µl inhibitör temizleyici solüsyon eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Altaki toplama tüpü atıldı ve üstteki High Pure Filter tüpü temiz bir toplama tüpü üzerine alındı.

4- High Pure Filter tüpü üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi ve tekrar 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Altaki toplama tüpü atıldı ve üstteki High Pure Filter tüpü temiz bir toplama tüpü üzerine alındı. Bu işlem bir kere daha tekrarlandı.

5- High Pure Filter tüpü 13 000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Altaki toplama tüpü atıldı ve üstteki High Pure Filter tüpü DNA'nın saklanacağı temiz bir tüp üzerine alındı. Pürifiye edilmiş genomik DNA 200 µl 70 °C inkübe edilmiş çözündürme solüsyonu ile çözdürüldü.

Bu aşamadan sonra çözünmüş DNA'lar -20 °C'de polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilinceye kadar saklandı.

eNOS Genlerinin PCR ile Çoğaltılması

PCR tepkimesinde, ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNAaz ve RNAaz enzimlerinden arındırılmış steril 0.2 ml'lik PCR tüpleri kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılacak primerlerin sekansı, uzunluğu, erime derecesi ve içerdikleri Guanin-Sitozin yüzdesi aşağıda gösterilmektedir. (Tablo 8).

Tablo 8.eNOS İtron 4 ve Glu298Asp Primer Çiftlerinin Özellikleri

PRİMER	Uzunluk (bp)	TM	GC%	DNA dizisi
Ekzon 7 Forward	21	60,4	% 61,9	catgaggetcagccccagaac
Ekzon 7 Reverse	21	56,6	% 47,6	agtcaateccctttgggtgetca
İntron 4 Forward	21	58,3	% 52,3	aggccctatggtagtgcttt
İntron 4 Reverse	20	54,1	% 50	tctcttagtgetgtgggtcac

Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılacak gen bölgesi ve reaksiyon sırasında primerlerin bağlandığı yerler, Şekil 4 ve 5'te gösterilmektedir.

CATGAGGCTCAGCCCCAGAACCCTCTGGCCCACTCCCCACAGCTCTGCA
TTCAGCACGGCTGGACCCAGGAAACGGTCGCTTCGACGTGCTGCCCC
TGCTGCTGCAGGCCCCAGATGATCCCCAGAACTCTTCCTTCTGCCCC
CGAGCTGGTCCTTGAGGTGCCCTGGAGCACCCACGTGAGCACCAAAG
GGATTGACT

Şekil 6: eNOS geni 7. ekzon nükleotid dizisi

Pembe renkle gösterilen oligonükleotid dizisi, çalışmada kullanılan primerlerin yerlerini; yeşil renkli kısım ise, 7. ekzonun nükleotid dizisini göstermektedir. Kırmızı renkli nükleotid ise, polimorfik nükleotidin gen dizilimi üzerindeki yerini tanımlamaktadır.

AGGCCCTATGGTAGTGCCTTGCTGGAGGAGGGGAAAGAAGTCTAGACCTG
CTGCAGGGGTGAGGAAGTCTAGACCTGCTGCAGGGGTGAGGAAGTCTAGAC
CTGCTGCAGGGGTGAGGAAGTCTAGACCTGCTGCGGGGGTGAGGAAGTCTA
GACCTGCTGCGGGGGTGAGGACAGCTGAGCGGAGCTTCCCTGGGCGGTGCT
GTCAGTAGCAGGAGCAGCCTCCTGGAAAAGCCCTGGCTGCTGCTTCTCCCC
AAGAGAGAAGGCTTCTCCCGCCAGGCCAGTCCAGTGCAGCCCCTCACCCAC
ACCCACTGCTACCCAGTTCCCTGCTTCGGCCCGCACCCCTCCCTCACACCC
CAGCCCACAGACTCGGGGCTGGCCTTAGTTACTGGAACGCCTGTGACCACA
GCACTAAGAGA

Şekil 7: eNOS geni 4. intron nükleotid dizisi

Pembe renkle gösterilen oligonükleotid dizisi, çalışmada kullanılan primerlerin yerlerini göstermektedir.

Genomik DNA, 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldı ve üzerine PCR için hazırlanan karışım eklendi (Tablo 9). Bu şekilde elde edilen tepkime karışımı otomatik ısı döngü cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi. Tüm PCR'larda negatif kontrol olarak DNA içermeyen PCR karışımı kullanıldı.

Tablo 9: Enos Glu298Asp ve Intron 4 tandem repeat polimorfizmlerinin optimum amplifikasyonun gerçekleştirildiği PCR reaksiyonu karışımı

Reaksiyon karışımı	Miktar (µl)
10X PCR tamponu* * 20 Mm MgCl ₂ içermektedir.	2,5
Forward primer (100 pmol)	0,1
Reverse primer (100 pmol)	0,1
dNTP Karışımı (2Mm)	2,5
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0,1
DNA	1
Steril bidistile su	18,7

PCR işlemini gerçekleştirmek için, otomatik ısı döngü cihazı, aşağıda belirtilen sıcaklık ve süreler göre ayarlandı. Reaksiyon, Thermal Cycler cihazı (Techne Progene, Cambridge, UK) içerisinde Glu298Asp polimorfizmi için Tablo 10'da, Intron 4 polimorfizmi için ise, Tablo 11'de tanımlanan sıcaklık koşullarında, belirtilen sürelerde gerçekleştirildi.

Tablo 10: Glu298Asp Polimorfizmi için PCR Isıları ve Döngü Sayıları

Reaksiyon Asaması	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	5	1
Denatürasyon	95	1	38
Annealing (primer bağlanması)	62	1,5	
Extension (Zincir uzaması)	72	2	
Final extension	72	5	1

Tablo 11. Intron 4 Polimorfizmi için PCR Isıları ve Döngü Sayıları

Reaksiyon Asaması	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	5	1
Denatürasyon	95	1	38
Annealing (primer bağlanması)	60	1,5	

Extension (Zincir uzaması)	72	2	
Final extension	72	5	1

Çoğaltılmış DNA'ların Elektroforezde Değerlendirilmesi

PCR sonucu oluşan DNA'ları yürütmek için %2'lik agaroz jel hazırlandı. 6 µl PCR ürünü, kuyucuklara yüklendi. Jel 100 voltta 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Ultraviyole ışık altında PCR'da kullanılan primer çiftlerine göre oluşan DNA bantları incelendi. eNOS geninin Glu298Asp polimorfizmini içine alan 206 bp'lik hedef bölgesi agaroz jel üzerinde görüldükten sonra restriksiyon işlemi için örnekler -20 °C'de restriksiyon işlemine kadar en fazla bir hafta süreyle saklandı.

Aynı genin intron 4'e ait 420 bp'lik hedef bölgesi çoğaltılmış DNA dizisi ise nükleotid tekrarlarının daha iyi gözlenebilmesi için %3'lük agaroz jelde 80 voltta 50 dakika elektroforeze tabi tutuldu.

eNOS enzimini kodlayan genin 4. intronunda iki allel belirlenmiştir. Daha fazla sayıda nükleotid içeren (420 bç) "b" alleli 5 adet 27 bp'lik tandem tekrar içermekte ve daha az sayıda nükleotid içeren (393 bç) "a" alleli ise 4 tandem tekrarından oluşmaktadır. "b" allelinde 27 bp'lik tekrarın 19. sırasında ilk üç tekrarda A bazı, son iki tekrarda G nükleotidi bulunmaktadır. "a" allelinde ise tekrarın 19. Sırasındaki nükleotid ilk iki tekrarda A; son iki tekrar G'dir (Şekil 6).

AGGCCCTATGGTAGTGCCTTG GCTGGAGGAGGGGAAAGAAGTCTAGACCT
GCTGCAGGGGTGAG GAAGTCTAGACCTGCTGCA GGGGTGAG GAAGTCTA
GACCTGCTGCA GGGGTGAG GAAGTCTAGACCTGCTGCG GGGGTGAG GAA
GTCTAGACCTGCTGCG GGGGTGAG GACAGCTGAGCGGAGCTTCCCTGG

GCGGTGCTGTCAGTAGCAGGAGCAGCCTCCTGGAAAAGCCCTGGCTGCTG
CTTCTCCCCAAGAGAGAAGGCTTCTCCCGCCAGGCCAGTCCAGTGCAGC
CCCTCACCCACACCCACTGCTACCCCAGTTCCTGCTTCGGCCCCGCACCC
TCCCTCACACCCAGCCCACAGACTCGGGGCTGGCCTTAGTTACTGGAAC
GCCTGTGACCACAGCACTAAGAGA

Şekil 8: eNOS geni 4. intron nükleotid dizisinin tandem tekrarları

Pembe renkle gösterilen oligonükleotid dizisi, çalışmada kullanılan primerlerin yerlerini göstermektedir. Farklı renklerle üzeri renklendirilmiş kısım ise İtron 4 üzerindeki 27 bç'lik tandem tekrar dizileridir.

PCR sonrasında elde edilen ürünler, elektroforezde 100 bç'lik marker ile birlikte yürütüldüğünde, jelde 420 ile 393 bç büyüklüğündeki bantlar gözlemlendi. Bu bantlardan 420 bp büyüklüğündeki bantlar eNOS geni 4. intronu VNTR (4a/b) polimorfizmi için "bb" homozigot olarak değerlendirilirken, 420 ve 393 bp büyüklüğündeki bantlar aynı bireyde görüldüğünde eNOS geni 4. intron için "ab" heterozigot ve 393 bp büyüklüğündeki bant tek başına görüldüğünde ise eNOS geni 4. intron için "aa" homozigot olarak değerlendirildi.(Şekil 7)

I	II	III	IV	V
a/a	b/b	a/b	a/b	b/b

Şekil 9: eNOS geni intron 4'ün polimorfizminin genotiplemeesi.

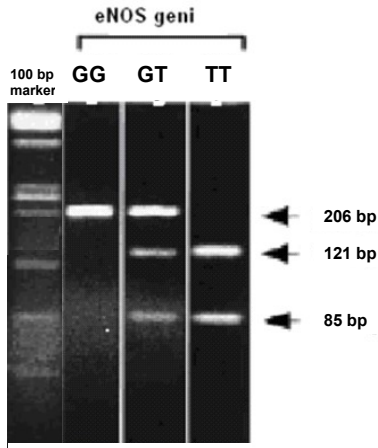
Glu298Asp Polimorfizminin Restriksiyon Enzimi ile Kesim Sonrası Değerlendirilmesi

Birinci aşamada 5'er mikrolitresi kullanılan PCR üründen 5 µl, restriksiyon enzim kesimi için kullanıldı. *MboI* enzimi ile kesim bölgesi (GATC) içeren PCR ürünü, aşağıdaki karışım kullanılarak kesildi. Bunun için;

- 9 µl steril dH₂O
- 1 µl Restriksiyon Enzim Buffer
- 0,5 µl Restriksiyon Enzimi (*Mbo I*) (Fermantas, UK) içeren karışım hazırlandı. Bu karışımlar 5 µl'lik PCR ürününün içerisine eklendi ve inkübatörde 37°C'de 1,5 saat bekletildi. İşlem sonrasında tekrar %3'lük agaroz jel hazırlandı. Elde edilen enzim

kesimi ürünleri ve 100 bp'lik DNA ladder jelle yüklendikten sonra 45 dakika 90 voltluk elektrik akımı uygulandı. UV illüminatör kullanılarak jel değerlendirilmesi yapıldı ve fotoğrafları çekildi.

eNOS geni 7. ekzonundaki Glu298Asp değişimini (genotip dağılımını) saptamak amacıyla yapılan çalışmanın bu bölümünde elde edilen jel örneklerinde 206, 121 ve 85 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi. Sadece 243 bp büyüklüğünde bant görüldüğünde *eNOS* geni 7. ekzon için "GG" homozigot, 206, 121 ve 85 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte aynı bireyin örneğinde görüldüğünde *eNOS* geni 7. ekzon için "GT" heterozigot, 121 ve 85 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde *eNOS* geni 7. ekzon için "TT" homozigot şeklinde değerlendirilerek genotipleme yapıldı (Şekil 8).



Şekil 10: *eNOS* ekzon 7 RFLP polimorfizmi.

BULGULAR

Çalışmaya 64'ü hasta, 80'i kontrol grubunda olmak üzere toplam 144 vaka dahil edildi. Hasta grubundaki vakalar patolojik evre ve derecelerine göre yüksek riskli ve düşük riskli olarak gruplandırıldı. Patolojik değerlendirmede insitu ürotelyal kanser bulunan, evresi T1 ve üzerinde olan hastalar ile yüksek dereceli kanseri olan vakalar yüksek riskli gruba alınırken, patolojik evresi Ta olan ve düşük dereceli kanseri olan vakalar düşük riskli gruba dahil edildi. Bunun sonucunda 24 vaka yüksek riskli kanser grubunda ve 40 vaka ise düşük riskli kanser grubunda yer aldı.

İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenler ortalama \pm SD olarak gösterildi. İkili grup karşılaştırmalarında Student's T testi kullanıldı. Beklenen ve gözlemlenen değerlerin karşılaştırmaları Pearson's ki kare testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ (çift yönlü) düzeyinde değerlendirildi.

Düşük ve yüksek riskli hastalar cinsiyetleri açısından değerlendirildiğinde iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 12).

Tablo 12 : Düşük ve yüksek riskli hastaların cinsiyetlerine göre değerlendirilmesi.

Cinsiyet	Düşük risk		Yüksek risk		p
	n	%	n	%	
erkek	33	82,5	21	87,5	0,731
kadın	7	17,5	3	12,5	

Düşük ve yüksek riskli hasta grupları sigara kullanım öyküsü açısından değerlendirildiğinde yine anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 13).

Tablo 13: Düşük ve yüksek riskli hastaların sigara kullanımı açısından değerlendirilmesi.

Sigara Öyküsü	Düşük risk		Yüksek risk		p
	n	%	n	%	
erkek	30	75	20	83,3	0,435
kadın	10	25	4	16,7	

Hasta ve kontrol grupları cinsiyet oranları arasındaki analizde anlamlı bir fark izlenmedi (Tablo 14).

Tablo 14: Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet oranları açısından karşılaştırılması.

Cinsiyet	Kontrol grubu		Hasta grubu		p
	n	%	n	%	
erkek	73	86,3	54	84,4	0,751
kadın	11	13,8	10	15,6	

Hasta ve kontrol grubu yaşları açısından değerlendirildiğinde, kontrol grubunun yaş ortalamasının daha az olduğu izlendi (Tablo 15).

Tablo 15: Hasta ve kontrol grubunun yaşlarının karşılaştırılması.SS:standart sapma

	Kontrol grubu		Hasta grubu	
	ortalama	SS	ortalama	SS
Yaş	56,76	10,63	64,48	11,52

Sigara kullanım öyküleri incelendiğinde hasta grubunda sigara kullanım oranının daha fazla olduğu izlenmesine rağmen, istatistiksel değerlendirmede sigara kullanım oranları açısından iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 16).

Tablo 16: Hasta ve kontrol gruplarının sigara içme oranlarının karşılaştırılması

SigaraÖyküsü	Kontrol grubu		Hasta grubu		p
	n	%	n	%	
içiyor	53	66,3	50	78,1	0,117
içmiyor	27	33,8	14	21,9	

Çalışmanın bundan sonraki kısmında hasta ve kontrol grubundaki olgular eNOS enziminin iki polimorfizmi; Glu298Asp, İntron 4 tandem tekrarı, açısından değerlendirildi.

eNOS enzimini kodlayan genin 4. intronunda iki adet allel belirlendi. 27 bp'in 5 kez tekrarı sonucunda uzun olan "b" alleli, 27 bp'in 4 kez tekrarı ile "a" alleli oluşmaktaydı. Hasta ve kontrol grupları bu allellerin homozigot ve heterozigot olmalarına göre karşılaştırıldı. Hasta grubunda intron 4'ün "aa" alleli hiç bulunmazken, kontrol grubunda 3 olguda "aa" alleli saptandı. Yine hasta grubunda intron 4'ün "ab" allelinin oranı kontrol grubuna göre fazla olmakla beraber, istatistiksel değerlendirmede iki grup arasında allellerin dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 17).

Tablo 17: Hasta ve kontrol gruplarının İtron 4 polimorfizmlerinin karşılaştırılması.

İtron 4	Kontrol grubu		Hasta grubu		p
	n	%	n	%	
aa	3	3,8			0,147
ab	9	11,3	12	18,8	
bb	68	85,0	52	81,2	

Ardından eNOS enzimini kodlayan genin 7. ekzonunun 894'üncü nükleotidindeki G/T polimorfizmi (G894T/Glu298Asp) hasta ve kontrol gruplarında değerlendirildi. Kontrol grubunda "GG" ve "TT" homozigot allellerin, hasta grubuna oranla daha fazla olduğu izlendi. Hasta grubunda ise "GT" heterozigot allellerin oranının daha fazla olduğu izlendi. Ancak istatistiki analizde iki grup arasında Glu298Asp polimorfizmleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 18).

Tablo 18 : Hasta ve kontrol gruplarının Glu298Asp polimorfizmlerinin değerlendirilmesi.

Glu298Asp	Kontrol grubu		Hasta grubu		p
	n	%	n	%	
gg	46	57,5	30	46,9	0,335
gt	29	36,3	31	48,4	
tt	5	6,3	3	4,7	

Çalışmanın bundan sonraki bölümünde eNOS enzimini kodlayan genin incelenen iki polimorfizmi allellerin dağılımı yapılarak hasta ve kontrol grupları açısından beraber değerlendirildi. Hasta grubunda "abgt" ve "bbgt" allellerinin oranları kontrol grubuna oranla daha fazla oranda bulunmaktaydı. Diğer tüm allel çiftleri ise kontrol grubunda, hasta grubuna oranla daha fazla bulundu. Yapılan istatistiki değerlendirmede ise allel çiftleri arasında iki grupta anlamlı fark saptanmadı (Tablo 19).

Tablo 19: Hasta ve kontrol gruplarının İtron4/Glu298Asp polimorfizmlerinin değerlendirilmesi.

İtron4/Glu298Asp	Kontrol grubu		Hasta grubu		p
	n	%	n	%	
aagg	3	3,8			0,147
abgt	9	11,3	12	18,8	
bbgt	68	85,0	52	81,2	

abgg	5	6,3	4	6,3	0,350
abgt	4	5,0	8	12,5	
bbgg	38	47,5	26	40,6	
bbgt	25	31,3	23	35,9	
bbtt	5	6,3	3	4,7	

Düşük ve yüksek riskli hastalar iki polimorfizm için değerlendirildi. İntron 4 tandem tekrarı polimorfizmlerinde hasta grubu içinde ‘aa’ alleleline rastlanmadı. Yüksek riskli hastalarda ‘’ bb’’ alleli oranı daha fazla olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Glu298Asp polimorfizmi değerlendirildiğinde ‘’tt’’ allelinin sadece 3 hastada saptandığı izlendi. Yüksek riskli hastalarda ‘’gg’’ alleli sık görülürken, düşük riskli hastalarda ‘’gt’’ alleli daha sık saptandı. Ancak Glu298Asp’’ polimorfizmleri iki grup arasında anlamlı fark oluşturmadı. İntron 4 ve Glu298Asp polimorfizmleri beraber değerlendirildiğinde yüksek riskli grubun %50 sinde ‘’abgt’’ allellerinin bulunduğu saptandı. Düşük riskli grupta ise % 35 oranında ‘’ abgt’’ ve %37.5 oranında ‘’bbgg’’ allellerinin bulunduğu saptandı. İstatistiki değerlendirmede iki grup arasında allel dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 20).

Tablo 20: Düşük ve yüksek riskli hastaların İntron4/Glu298Asp polimorfizmlerinin değerlendirilmesi.

	Düşük riskli hastalar		Yüksek riskli hastalar		p
	n	%	n	%	
İntron 4					
ab	9	22,5	3	12,5	0,510
bb	31	77,5	21	87,5	
Glu298Asp					
gg	18	45,0	12	50,0	0,925
gt	20	50,0	11	45,8	
tt	2	5,0	1	4,2	
İntron4/Glu298Asp					
aagg	4	10,0			
abgg	5	12,5	3	12,5	
abgt	14	35,0	12	50,0	
bbgg	15	37,5	8	33,3	

bbgt	2	5,0	1	4,2	0,505
------	---	-----	---	-----	-------

TARTIŞMA

Mesane kanseri tüm kanserler içinde erkeklerde en sık dördüncü, kadınlarda en sık sekizinci kanser türüdür (1). Tüm kanserlerde olduğu gibi mesane ürotelyal kanserinin etiyolojisi ve patofizyolojisinde de, kişiye özgü genetik faktörlerin ve kişinin maruz kaldığı çevresel faktörlerin birlikte etkin olduğu bilinmektedir. Ayrıca kanserin doğal seyri ve progresyonu açısından da genetik ve çevresel faktörlerin etkileri bulunmaktadır (96).

İnsan genomu 46 kromozomdan oluşmaktadır. Kromozomlar üzerinde bulunan genler çiftler halinde bulunmakta olup, aynı genin alternatif formuna ‘‘allel’’ adı verilmektedir. Bir özelliği belirleyen alleler homolog kromozomlar üzerinde ‘‘lokus’’

olarak tanımlanan karşılıklı bölgelerde bulunurlar. İnsanın kalıtsal bilgisini kodlayan bu gen yapısı “genotip” olarak adlandırılmakta, bu genotipin çevresel faktörler ile etkileşime girerek organizmada ortaya çıkan fizyolojik veya patofizyolojik süreçler ise organizmanın fenotipik özelliklerini ortaya çıkarmaktadır.

Popülasyondaki her bireyin genotipi kendine özgüdür ve bunun sonucunda her birey kendine özgü fenotipe sahip olur. Aynı işlevi olan allel genler her bireyde farklı nükleotid dizilişine sahiptir ve bunun sonucunda o genin kodladığı proteinin yapısında veya işlevinde farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde aynı tür içinde farklı fenotipik özellikler ortaya çıkaran, incelenen popülasyonda en az %1 oranından görülen allel gen farklılıkları genetik polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. Mutasyonlar ise bir gen için çok daha nadir görülen farklılıkları tanımlamaktadır.

Birçok kanser türü gibi mesane kanseri için de bir çok genetik risk faktörü ortaya konmuştur. Bu genetik risk faktörlerinden üzerinde en fazla durulanlar hücre döngüsünü düzenleyen genlerdeki değişikliklerdir. Normal hücre döngüsünü sağlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar veya polimorfizmler ile oluşan allel gen değişiklikleri sonucunda bu genlerin kodladığı proteinler ve enzimlerde fenotipik değişiklikler oluşarak genler onkogen haline gelebilmektedir (96).

Birçok kanser türünde tanımlanmış olan p53 tümör süpresör geni, mesane kanserli olgularda da araştırılmış ve tümör nüksünü gösteren ve kanserin doğal gidişi ile ilişkili bağımsız bir risk faktörü olarak bulunmuştur (107).

Bunların dışında mesane kanseri için RB, P21, P27, Ki-67, :Her 2, H-Ras, Cmyc, MDM-2, Blc-2 gibi birçok onkogen ve tümör süpresör genin karsinogenezdeki ve progresyondaki rolü araştırılmıştır.

Halen mesane transizyonel hücreli kanser için birçok farklı gen ve bu genlere ait mutasyonlar ve polimorfizmler incelenmektedir. Son dönemde N-asetiltransferaz 2 (NAT2), glutatyon S-transferaz (GST), sitokrom P450 (CYP) 2A6, CYP 2A13, matriks mettalloproteinaz 1(MMT1), caspase-8 (CASP8), androjen reseptör geni (AR), survivin geni, mesane transizyonel hücreli kanserde mutasyonları ve polimorfizmleri değerlendirilen genlerden bazılarıdır (193-197).

Bu genlerden ve ürünlerinden kanser gelişimindeki rolü sık olarak araştırılan bir tanesi de nitrik oksit sentaz (NOS) gen ailesi ve bu gen ailesinin ürünü olan nitrik oksitdir (NO).

Nitrik oksit (NO) birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte rol alan, karsinogenezdeki rolü tartışılan bir serbest radikaldir. Suprafizyolojik düzeylerdeki NO sentezinin DNA'da hasara ve DNA onarımının baskılanmasına yol açtığı, tümör angiogenezini ve progresyonunu indüklediği iddia edilmiştir (198,199). Buna karşın, NO'in p53 upregülasyonu yaparak hücreleri DNA hasarından koruduğu, tümör hücrelerinin endotelyuma adezyonunu azalttığı, kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği yönünde; NO'nun karsinogenezdeki koruyucu rolünü destekleyen çalışmalar da mevcuttur (200-202).

Mesane transizyonel hücreli kanserde nitrik oksidin ve sentezinden sorumlu olan NOS enzim ailesinin etkilerini değerlendiren çalışmalar yapılmıştır. NOS enziminin iki izoformunun (eNOS ve iNOS) mesane transizyonel hücreli kanser bulunan ve benign mesane dokusu bulunan örneklerdeki immunhistokimyasal değerlendirilmesi yapılmış ve bu iki enzimin de tümöral dokularda anlamlı olarak daha fazla oranda bulunduğu saptanmıştır (203). Yine aynı şekilde iNOS enzim oranları ile mesane transizyonel hücreli kanser dokularındaki mikrovasküler dansite oranları ilişkili bulunmuştur. Bu nedenlerle iNOS ve eNOS enzimlerinin tümör angiogenezine katkısı olduğu düşünülmüştür (206). Mesane transizyonel hücreli kanserli dokularda iNOS enziminin uyarılmamış hücrelerde proliferasyonu arttırdığı ortaya konmuştur (204). Mesane kanseri nüksü ile iNOS ilişkisi değerlendirildiğinde, iNOS pozitif hastalarda 2 yıllık takipte %80 oranında nüks görülürken, iNOS negatif hastalarda %27 oranında nüks görülmüş ve iNOS enziminin kanser nüksü ile bağlantılı olabileceği düşünülmüştür (205).

Özellikle son 20 yılda NO ve genetik konularındaki eş zamanlı gelişme ve keşifler, NOS enzim ailesinde saptanmış olan genetik polimorfizmler ve bu polimorfizmler sonucunda ortaya çıkan fonksiyonel farklılıkların, neoplastik süreçler ile ilişkisi popüler bir araştırma konusu haline gelmiştir.

iNOS geninin polimorfizmlerinden promotör bölgedeki (CCTTT) nükleotid tekrarı mesane transizyonel hücreli kanserde değerlendirilmiş ve 12 tekrarlı allelin mesane transizyonel hücreli kanser için yüksek risk ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (203). Ancak iNOS polimorfizmlerinin oluşturdukları fonksiyonel ve fenotipik değişiklikler ile transizyonel hücreli kanser ilişkisi net değildir. iNOS enzimi inflamatuvar süreçlerde NO'in suprafizyolojik seviyelerde sentezinden sorumludur.

Ancak mesane transizyonel hücreli kanserde NO'in düşük seviyelerde bulunduğu ve bu düşük seviyedeki NO düzeyinin pro-kanserojen etkisinin olduğu gösterilmiştir (203). Bu nedenlerle iNOS up-regülasyonunun karsinogenezde bir neden mi yoksa sonuç mu olduğu tartışmalıdır.

İnflamatuar sürece cevap olarak arttığı bilinen iNOS'tan farklı olarak eNOS fizyolojik NO idamesinden sorumludur. Bu nedenle eNOS'un olası bir NOS-neoplastik değişim sürecinde sonuçtan çok sebep, başka bir deyişle başlangıç aşamasında yer alması daha olası görünmektedir. Bu bağlamda normal fizyolojik koşullar altında neoplastik gelişim görülmesi daha dikkat çekici bir durumdur. Bundan yola çıkarak, çalışmamızda dokularda esas NO sentezinden sorumlu olan ve polimorfizmleri ile dokularda anormal NO sentezine sebep olabilecek bir unsur olarak eNOS enziminin genetik polimorfizmlerini araştırmayı amaçladık.

Farklı kanser türlerinde üzerinde en çok çalışılan eNOS polimorfizmleri, genin transkripsiyonunu etkileyen intron 4 tandem tekrarı ve 7. ekzondaki Glu298Asp polimorfizmleridir (207-213). Bu polimorfizmler, gende çeşitli varyasyonlara yol açarak, NOS proteininin yapısında konformasyonel değişikliklere neden olmakta, böylelikle de enzimin aktivitesi değişmektedir. Birçok vaka kontrol çalışması eNOS polimorfizmini farklı kanserlerde değerlendirmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkarak bizde çalışmamızda literatürde daha önce incelenmeyen mesane kanseri, eNOS gen polimorfizmi ilişkisini inceledik.

Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarını eNOS intron 4 polimorfizmleri açısından karşılaştırdığımızda, iki grupta da "bb" genotipini daha fazla oranda saptadık. İki grupta "bb" polimorfizm oranları kontrol grubunda % 85, çalışma grubunda %81.3 saptandı. Bu sonuçlar daha önce literatürde Türkiye popülasyonu için saptanmış eNOS İtron 4 polimorfizmleri ile uyumlu bulundu (214). Hasta grubunun, kontrol grubuna oranla "ab" polimorfizmine sahip olma oranı fazlaydı, ancak istatistiksel analizde iki grup arasında İtron 4 polimorfizmi açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

Glu298Asp polimorfizmini hasta ve kontrol gruplarında değerlendirdiğimizde, kontrol grubunda "gg" ve "tt" homozigot allellerin, sırası ile %57,5 ve %6,3 oranlar ile hasta grubuna oranla daha sık bulunduğu izlendi. Hasta grubunda ise "gt" heterozigot alleli %48,4 oranı ile kontrol grubuna göre daha sık izlendi. eNOS Glu298Asp polimorfizmi için de sonuçlarımız Türkiye popülasyonu için saptanmış

Glu298Asp polimorfizm oranları ile uyumluydu (214). İstatistiksel analizde ise iki grup arasında Glu298Asp polimorfizmleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı. eNOS geninin incelenen iki polimorfizmi allel çiftleri açısından değerlendirildiğinde hasta grubunda ‘‘abgt’’ ve ‘‘bbgt’’ allellerinin kontrol grubuna oranla daha fazla saptandığı ancak allel çiftleri açısından da hasta ve kontrol grubun arasında anlamlı fark olmadığı ortaya konuldu.

Mesane transizyonel hücreli kanser grubundaki olgular patolojilerine göre düşük ve yüksek riskli hastalar olarak değerlendirildi, yüksek riskli hasta grubunun %50’sinde ‘‘abgt’’ allel çiftinin bulunduğu izlenmesine rağmen istatistiki değerlendirmede iki grup arasında allel çiftleri açısından anlamlı fark saptanmadı.

Çalışmamızın sonucunda mesane transizyonel hücreli kanser gelişimi için, eNOS geninin İntron 4 tandem tekrar polimorfizminde ‘‘ab’’ allellerine, Glu298Asp polimorfizminde ‘‘gt’’ allellerine sahip olma mesane kanseri için risk faktörü olarak şüphe uyandırmakla birlikte, bu istatistiksel veriler ile onaylanmamıştır. Ek olarak çalışmada yüksek riskli hastaların %50’sinde saptanan ‘‘abgt’’ allel çifti, bu genetik varyantın yüksek dereceli hastalık ile ilişkili olabileceğini akla getirmektedir. Ancak bu gözlem de istatistiksel çalışmayla kesinleştirilememiştir. Literatürde eNOS gen polimorfizmleri birçok farklı kanser türünde araştırılmıştır.

Bu çalışmalardan birinde sporadik kolorektal kanser değerlendirilmiş ve eNOS intron 4b/a polimorfizmi 60 yaş altı hastalarda kolorektal kanser riski ile anlamlı ilişki içinde saptanmıştır (207). Meme kanseri eNOS polimorfizmlerini değerlendiren çalışmalarda Glu298Asp polimorfizmi kanserle ilişkili bulunmazken (208), T786C polimorfizminde -786TT ve -786C genotip varyantlarına sahip olma meme kanseri gelişimi riski ile ilişkili olduğu görülmüştür (209). Prostat kanseri eNOS polimorfizmlerini değerlendirildiğinde intron 4a alleleline sahip olma yüksek prostat kanseri riski, yüksek dereceli hastalık, yüksek progresyon oranları ile ilişkili saptanmıştır (210). Başka bir prostat kanseri çalışmasında, eNOS Glu298Asp polimorfizmi değerlendirilmiş ve GG, GT allellerine sahip olma kanser predispozisyonu ile ilişkili bulunmuştur (211). Yine prostat kanseri ile ilgili ülkemizde yapılan bir çalışmada, eNOS intron 4 polimorfizmlerinde ‘‘bb’’ allellerine sahip olmanın lokalize hastalık ve düşük kemik metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (212). Over kanserlerini değerlendirildiğinde, eNOS intron 4 ve Glu298Asp polimorfizmlerinin

genotipleri ve allel varyasyonları açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (213).

Biz ise çalışmamızda mesane kanserli hastalarda eNOS gen polimorfizmleri için hasta ve kontrol grupları arasında bu tür bir bağlantı saptamadık. Ancak gruplarımızın örneklem sayılarının sınırlı olması daha kesin bir sonuca ulaşmamızı engellemiş olabilir.

Bu çalışmalar sonucunda eNOS geninin ve bu genin polimorfizmlerinden kaynaklanan fenotipik değişikliklerin kanser etiyolojisinde önemli rolleri olabileceği ortaya konmuştur. Ancak tüm bu çalışmalarda genin polimorfizminden kaynaklanan fenotipik değişiklikler ve bunların karsinogeneze etkileri net olarak açıklanamamıştır.

Farklı fizyolojik işlevlere sahip nitrik oksit sentaz enzimlerini kodlayan farklı genler bulunmaktadır. Bu genler için de tanımlanmış birçok farklı polimorfizm ve buna bağlı olarak bu enzimlerin farklı fizyolojik aktivite düzeylerine sahip olması beklenmektedir. Mevcut çalışmada, bu enzimlerden eNOS'un sık görülen iki çeşit polimorfizmi değerlendirilmiştir ve mesane transizyonel hücreli kanserde incelenen bu polimorfizmler için anlamlı bir fark saptanmamıştır. Mesane kanseri ile nitrik oksit ve NOS genleri arasındaki ilişkinin tam olarak anlaşılması için; polimorfizm ile eş zamanlı olarak moleküler seviyede NO ve NOS sentezinin de belirlenmesi bu polimorfizmlerin fenotipik fizyolojiye olan yansımalarını ortaya koyacağından daha gerçekçi ve değerli bilgiler verecektir. Bunun yanısıra aynı çevresel risk faktörlerine sahip kontrollü denek gruplarının ele alınması izole genetik faktörlerin belirlenmesi açısından hedefe yönelik daha iyi sonuçlar verebilir.

SONUÇLAR

1. Bu çalışmamız mesane kanserli hastalarda eNOS gen polimorfizmini değerlendiren literatürdeki ilk çalışma olma özelliğindedir.

2. Çalışmamız sonucunda eNOS geninin incelenen iki polimorfizminde, intron 4 tandem tekrar polimorfizmi için ‘‘ab’’ alleli, Glu298Asp polimorfizmi için ise ‘‘gt’’ alleli hasta grubunda yüksek oranda bulunmuş ve bu allel genlere sahip olma mesane kanseri için risk faktörü olarak şüphe uyandırmıştır. Ancak istatistiksel değerlendirme sonucunda bu bilgi doğrulanamamıştır.
3. eNOS geninin iki polimorfik allel geni yüksek ve düşük riskli mesane kanserli hastalarda değerlendirildiğinde, yüksek riskli hastaların %50’sinde ‘‘abgt’’ genotipi bulunmuş ve bu genotipin yüksek riskli hastalık için risk faktörü olabileceği akla gelmiştir. Ancak bu bilgi de istatistiksel veriler ile doğrulanamamıştır.
4. Gözlenen polimorfizm oranlarındaki istatistiksel anlam yokluğunun olası nedeni denek sayısının yetersizliğine bağlanılabilir. Bu sayının artması ile anlamlı istatistiksel farklılık çıkacağı düşüncesindeyiz.
5. Kontrol grubununu da içeren daha geniş örneklem sayısı ile yapılacak araştırmaların artırılması ile gen polimorfizmlerinin mesane kanseri ile ilişkisini her açıdan değerlendirmek mümkün olacaktır. Bu çalışmanın da bu fikre öncü olduğu kanısındayız.

REFERANSLAR

1. Cancer Res. 2009 Sep 1;69(17):6857-64. Epub 2009 Aug 25. Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and bladder cancer risk: findings from the international consortium of bladder cancer. Stern MC, Lin J, Figueroa JD, Kelsey KT, Kiltie AE, Yuan JM, Matullo G, Fletcher T, Benhamou S, Taylor JA, Placidi D, Zhang ZF, Steineck G, Rothman N, Kogevinas M, Silverman D, Malats N, Chanock S, Wu X, Karagas MR, Andrew AS, Nelson HH, Bishop DT, Sak SC, Choudhury A, Barrett JH, Elliot F, Corral R, Joshi AD, Gago-Dominguez M, Cortessis VK, Xiang YB, Gao YT, Vineis P, Sacerdote C, Guarrera S, Polidoro S, Allione A, Gurzau E, Koppova K, Kumar R, Rudnai P, Porru S, Carta A, Campagna M, Arici C, Park SS, Garcia-Closas M; International Consortium of Bladder Cancer.

2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006 Mar-Apr;56(2):106-30.
3. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, Ries LA, Rosenberg HM, Feigal EG, Edwards BK. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Jun 6;93(11):824-42
4. The prevalence of cancer. Estimates based on the Connecticut Tumor Registry. Feldman AR, Kessler L, Myers MH, Naughton MD. *N Engl J Med*. 1986 Nov 27;315(22):1394-7.
5. Gloeckler LA, Reichman ME, Lewis DR, et al. Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *The Onkologist* 2003;8:541-552
6. Asian Pac J Cancer Prev. 2009 Jul-Sep;10(3):491-6. Incidence and epidemiological features of cancers of the genitourinary tract in Izmir between 1993-2002. Eser S, Zorlu F, Divtik RT, Cal C, Ozkan M, Kirkali Z.
7. Aydın S: Türkiye’de Üriner Sistem Kanserlerin Görülme Sıklığı, *Türk Üroloji Dergisi* 2007; 33 (4): 392-
8. *CA Cancer J Clin*. 2007 Jan-Feb;57(1):43-66. Cancer statistics, 2007. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer Occurrence, Department of Epidemiology and Surveillance Research, American Cancer Society, Atlanta, GA, USA.
9. Statistics, Epidemiology, and End Results Program [SEER], 1973-1997
10. *J Urol*. 1998 May;159(5):1493-6. The molecular characteristics of bladder cancer in young patients. Linn JF, Sesterhenn I, Mostofi FK, Schoenberg M.
11. Wan J, Grosman HB: Bladder carcinoma in patients age 40 years or younger. *Cancer* 1989; 64:178.
12. Marshall VF: Symposium on bladder tumors: Current clinical problems regarding bladder tumors. *Cancer* 1956; 9:543.
13. *J Urol*. 1994 Aug;152(2 Pt 1):397-400. Unsuspected bladder carcinoma in patients undergoing radical prostatectomy. Kim ED, Ignatoff JM.
14. Rehn I: Über blasentumoran bei fuchsinarbaitern. *Arch Kind Chir*. 1895 ;50:588
15. Morrison AS, Cole P: Epidemiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am* 1976; 3:13.
16. Cole P, Hoover R, Friedell GH: Occupation and cancer of the lower urinary tract. *Cancer* 1972; 29:1250.
17. Case RAM, Hosker ME, McDonald DB, Pearson JT: Tumors of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. *Br J Ind Med* 1954; 11:75.
18. Silverman DT, Levin LI, Hoover RN, et al: Occupational risks of bladder cancer in the United States: I. White men. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:1472.
19. Burch JD, Rohan TE, Howe GR, et al: Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: A case-control study. *Int J Cancer* 1989; 44:622.
20. [Int J Cancer](#). 2000 Apr 15;86(2):289-94. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jöckel KH, Donato F, Serra C,

[Wahrendorf J](#), [Hours M](#), [T'Mannetje A](#), [Kogevinas M](#), [Boffetta P](#).

21. *Prev Med.* 2002 Aug;35(2):114-20. Smoking and other risk factors for bladder cancer in women. Pelucchi C, La Vecchia C, Negri E, Dal Maso L, Franceschi S.

22. Hoffman D, Masuda Y, Wynder EL: Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke. *Nature* 1969; 221:254.

23. *Cancer Causes Control.* 2001 Aug;12(6):551-6. Cigar, pipe, and cigarette smoking and bladder cancer risk in European men. Pitard A, Brennan P, Clavel J, Greiser E, Lopez-Abente G, Chang-Claude J, Wahrendorf J, Serra C, Kogevinas M, Boffetta P.

24. *Int J Cancer.* 2004 Jun 20;110(3):417-23. Carotenoids/vitamin C and smoking-related bladder cancer. Castela JE, Yuan JM, Gago-Dominguez M, Skipper PL, Tannenbaum SR, Chan KK, Watson MA, Bell DA, Coetzee GA, Ross RK, Yu MC.

25. Risch A, Wallace DMA, Sim E: Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum Mol Genet* 1995; 4:231.

26. *Cancer Res.* 1998 Aug 15;58(16):3603-10. The role of N-acetylation polymorphisms in smoking associated bladder cancer: evidence of a gene-gene-exposure three-way interaction. Taylor JA, Umbach DM, Stephens E, Castranio T, Paulson D, Robertson C, Mohler JL, Bell DA.

27. Horn EP, Tucker MA, Lambert G, et al: A study of gender-based cytochrome P450 1A2 variability: A possible mechanism for the male excess of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4:529.

28. Bell D, Taylor JA, Paulson DF, et al: Genetic risk and carcinogen exposure: A common inherited defect on the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GST M1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1159.

29. Jones PA, Buckley JD, Henderson BE, et al: From gene to carcinogen: A rapidly evolving field in molecular epidemiology. *Cancer Res* 1991; 51:3617.

30. Spruck CH, Rideout WM, Olumi AF, et al: Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: Relationship to tobacco usage. *Cancer Res* 1993; 53:1162.

31. Thompson RA, Campbell Jr EW, Kramer HC, et al: Late invasive recurrence despite long-term surveillance for superficial bladder cancer. *J Urol* 1993; 149:1010.

32. Fleshner N, Garland J, Moadel A, et al: Influence of smoking status on the disease-related outcomes of patients with tobacco associated transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1999; 86:2337

33. Piper JM, Tonascia J, Metanoski GM: Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N Engl J Med* 1985; 313:292.

34. *Br J Urol.* 1983 Apr;55(2):220-4. Phenacetin-containing analgesics and cancer of the bladder or renal pelvis in women. McCredie M, Stewart JH, Ford JM, MacLennan RA.

35. Fukushima S, Uwagawa S, Shirai T, et al: Synergism by sodium l-ascorbic acid for sodium saccharin promotion of rat two-stage bladder carcinogenesis. *Cancer Res* 1990; 50:4195.

36. Cohen SM, Ellwein LB, Okamura T, et al: Comparative bladder tumor promoting activity of sodium saccharin, sodium ascorbate, related acids, and calcium salts in rats. *Cancer Res* 1991; 51:1766.

37. Morrison AS: Advances in the etiology of urothelial cancer. *Urol Clin North Am* 1984; 11:557.

38. Kunter AF, Hartge P, Hoover RN, et al: Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol* 1984; 119:510.

39. Locke JL, Hill DE, Walzer Y: Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. *J Urol* 1985; 133:1034.

40. Bahnson RR: Editorial: Squamous cell carcinoma of bladder. *J Urol* 1997; 157:2115.

41. Tricker AR, Mostafa MH, Spiegelhalter B, et al: Urinary excretion of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in schistosomiasis and bilharzial bladder cancer patients. *Carcinogenesis* 1989;

10:547.

42. Griffiths TRI, Mellon JK: Human papillomavirus and urological tumours: II. Role in bladder, prostate, renal and testicular cancer. *Br J Urol Int* 2000; 85:211.

43. Duncan RE, Bennett DW, Evans AT, et al: Radiation-induced bladder tumors. *J Urol* 1977; 118:43.

44. Quilty PM, Kerr GR: Bladder cancer following low- or high-dose pelvic irradiation. *Clin Radiol* 1987; 38:583.

45. Vlaovic R, Jewett AS: Cyclophosphamide induced bladder cancer. *Can J Urol* 1999; 6:745.

46. Habs MR, Schmahl D: Prevention of urinary bladder tumors in cyclophosphamide-treated rats by additional medication with uroprotectors sodium 2-mercaptoethane sulfonate (Mesna) and disodium 2,2'-dithio-bis-ethane sulfonate (Demesne). *Cancer* 1983; 51:606.

47. *J Natl Cancer Inst.* 1969 Jul;43(1):295-301. Tryptophan metabolism in patients with bladder cancer: geographical differences. Brown RR, Price JM, Friedell GH, Burney SW.

48. Microbial amino acid metabolites and bladder cancer: no evidence of promoting activity in man. Renwick AG, Thakrar A, Lawrie CA, George CF. *Hum Toxicol.* 1988 May;7(3):267-72.

49. Klemeney LA, Moret NC, Witjes JA, et al: Familial transitional cell carcinoma among the population of Iceland. *J Urol* 1997; 157:1649.

50. Buzzeo BD, Heisey DM, Messing EM: Bladder cancer and renal transplant recipients. *Urology* 1997; 50:525.

51. Michaud DS, Spiegelman D, Clinton SK, et al: Fluid intake and the risk of bladder cancer in men. *N Engl J Med* 1999; 346:1390.

52. Penn I: Secondary neoplasms as a consequence of transplantation and cancer therapy. *Cancer Detect Prevent* 1998; 12:39.

53. Costello AJ, Tiptaft RC, England HR, et al: Squamous cell carcinoma of the bladder. *Urology* 1984; 23:234.

54. Koss LG: Tumors of the urinary bladder. *Atlas of Tumor Pathology, second series, Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1975:1.*

55. El-Bolkainy MN, Mokhtar NM, Ghoneim MA, et al: The impact of schistosomiasis on the pathology of bladder carcinoma. *Cancer* 1981; 48:2643.

56. Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, et al: Epidemiological characteristics of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1988; 48:3853.

57. Bahnson RR: Editorial: Squamous cell carcinoma of bladder. *J Urol* 1997; 157:2115.

58. Manunta A, Vincendeau S, Kiriakou G, et al: Non-transitional cell bladder carcinomas. *BJU Int* 2005; 95:497.

59. Husmann DA, Spence HM: Current status of tumor of the bowel following ureterosigmoidoscopy: A review. *J Urol* 1990; 144:607.

60. Nielsen K, Nielsen KK: Adenocarcinoma in exstrophy of the bladder—the last case in Scandinavia? A case report and review of the literature. *J Urol* 1983; 130:1180.

61. Bennett JK, Wheatley JK, Walton KN: 10-year experience with adenocarcinoma of the

bladder. J Urol 1984; 131:262.

62. Choi H, Lamb S, Pinter K, et al: Primary signet-ring cell carcinoma of the urinary bladder. Cancer 1984; 53:1985.

63. Sheldon CA, Clayman RV, Gonzalez R, et al: Malignant urachal lesions. J Urol 1984; 131:1.

64. Mostofi FK: Potentialities of bladder epithelium. J Urol 1954; 71:715.

65. Brick SH, Friedman AC, Pollack HM, et al: Urachal carcinoma: CT findings. Radiology 1988; 169:377.

66. Narumi Y, Sato T, Kuriyama K, et al: Vesical dome tumors: Significance of extravesical extension on CT. Radiology 1988; 169:83.

67. Klinger ME: Secondary tumors of the genitourinary tract. J Urol 1951; 65:144.

68. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK: The Bladder Consensus Conference Committee. The World Health Organization/International Society of Urologic Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Am J Surg Pathol 1998; 22:1435.

69. Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H: Histological typing of urinary bladder tumors (International Histologic Classification of Tumors, No. 10), Geneva, World Health Organization, 1973.

70. Mazzucchelli R, Montironi R, Beltran A.L, Bono A.V. The 2004 WHO classification of non-invasive papillary neoplasms of the urinary bladder Urologia / Vol. 72 no. 2, 2005 / pp. 224-228

71. Cheng L, Darson M, Cheville JC: Urothelial papilloma of the bladder. Cancer 1999; 86:208.

72. Murphy WM, Soloway MS: Urothelial dysplasia. J Urol 1982; 127:849.

73. Utz DC, Hanash KA, Farrow GM: The plight of the patient with carcinoma in situ of the bladder. J Urol 1970; 103:160.

74. Utz DC, Schmitz SE, Fugelso PD, et al: A clinicopathologic evaluation of partial cystectomy for carcinoma of the urinary bladder. Cancer 1973; 32:1075.

75. Koss LG, Esperanza MT, Robbins MA: Mapping cancerous and precancerous bladder changes: A study of the urothelium in ten surgically removed bladders. JAMA 1974; 227:281.

76. Althausen AF, Prout Jr GR, Daly JJ: Noninvasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. J Urol 1976; 116:575.

77. Prout GR, Barton BA, Griffin PP, Friedell G: Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. J Urol 1992; 148:1413.

78. Farrow GM, Utz DC, Rife CC: Morphological and clinical observations of patients with early bladder cancer treated with total cystectomy. Cancer Res 1976; 36:2495-2501.

79. Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW, et al: Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low-grade transitional cell carcinomas of the bladder. Cancer Res 1990; 50:7081-7083.

80. Knowles MA, Elder PA, Williamson M, et al: Allelotype of human bladder cancer. Cancer Res 1994; 54:531.

81. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell carcinoma: A marker for disease progression. J Natl Cancer Inst 1993; 85:53.

82. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al: Association of p53 nuclear overexpression

and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1994; 152:388.

83. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al: Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994; 331:1259.

84. Habuchi T, Ogawa O, Kakehi Y, et al: Allelic loss of chromosome 17p in urothelial cancer: Strong association with invasive phenotype. *J Urol* 1992; 148:1595.

85. Spruck CH, Ohneseit PF, Gonzales-Zulueta M, et al: Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994; 54:784.

86. Friedell GH, Bell JR, Burney SW, et al: Histopathology and classification of urinary bladder carcinoma. *Urol Clin North Am* 1976; 3:53.

87. Cheng L, Neumann RM, Bostwick DG: Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential: Clinical and biologic implications. *Cancer* 1999; 86:2102.

88. *Hum Pathol.* 2000 Mar;31(3):332-40. Sarcomatoid carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 14 patients. Ikegami H, Iwasaki H, Ohjimi Y, Takeuchi T, Ariyoshi A, Kikuchi M.

89. *Mod Pathol.* 1992 May;5(3):240-3. The nested variant of transitional cell carcinoma: a neoplasm resembling proliferation of Brunns' nests. Murphy WM, Deana DG.

90. *J Urol.* 2000 Mar;163(3):748-51. Clinical and pathological characteristics of micropapillary transitional cell carcinoma: a highly aggressive variant. Maranchie JK, Bouyounes BT, Zhang PL, O'Donnell MA, Summerhayes IC, DeWolf WC.

91. *Virchows Arch.* 2001 Jun;438(6):552-7. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic study of 13 cases. Lopez-Beltrán A, Luque RJ, Vicioso L, Anglada F, Requena MJ, Quintero A, Montironi R

92. *Eur Urol.* 2001 Jan;39(1):85-90. Small cell carcinoma of the urinary bladder. Presentation of 23 cases and review of 134 published cases. Trias I, Algaba F, Condom E, Español I, Seguí J, Orsola I, Villavicencio H, García Del Muro X.

93. *Urology.* 2006 Mar;67(3 Suppl 1):11-7; discussion 17-8. The pathology of bladder cancer. Reuter VE

94. World Health Organization. World cancer report, 2003. Lyon, France: IARC Press; 2003, p. 229.

95. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005;66:4–34.

96. [Cell.](#) 2000 Jan 7;100(1):57-70. The hallmarks of cancer. [Hanahan D](#), [Weinberg RA](#).

97. [Biochim Biophys Acta.](#) 1998 Oct 14;1378(2):F115-77. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. [Ruas M](#), [Peters G](#).

98. [Mol Cell Biol.](#) 1995 May;15(5):2672-81. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. [Hirai H](#), [Roussel MF](#), [Kato JY](#), [Ashmun RA](#), [Sherr CJ](#)

99. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 1988 Apr;85(7):2210-4. Human retinoblastoma susceptibility gene: genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. [Bookstein R](#), [Lee EY](#), [To H](#), [Young LJ](#), [Sery TW](#), [Hayes RC](#), [Friedmann T](#), [Lee WH](#).
100. [Science](#). 1989 Dec 8;246(4935):1300-3. Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. [Mihara K](#), [Cao XR](#), [Yen A](#), [Chandler S](#), [Driscoll B](#), [Murphree AL](#), [T'Ang A](#), [Fung YK](#).
101. [Cell](#). 1991 Jun 14;65(6):1063-72. The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. [Bagchi S](#), [Weinmann R](#), [Raychaudhuri P](#).
102. [Cancer Res](#). 1991 Oct 15;51(20):5736-43. Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. [Ishikawa J](#), [Xu HJ](#), [Hu SX](#), [Yandell DW](#), [Maeda S](#), [Kamidono S](#), [Benedict WF](#), [Takahashi R](#).
103. [J Natl Cancer Inst](#). 1992 Aug 19;84(16):1256-61. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. [Logothetis CJ](#), [Xu HJ](#), [Ro JY](#), [Hu SX](#), [Sahin A](#), [Ordonez N](#), [Benedict WF](#).
104. [J Biol Chem](#). 1998 Jan 2;273(1):1-4. The p53 network. [Agarwal ML](#), [Taylor WR](#), [Chernov MV](#), [Chernova OB](#), [Stark GR](#).
105. [Nature](#). 1992 Jul 2;358(6381):15-6. Cancer. p53, guardian of the genome. [Lane DP](#).
106. [Science](#). 1991 Jul 5;253(5015):49-53. p53 mutations in human cancers. [Hollstein M](#), [Sidransky D](#), [Vogelstein B](#), [Harris CC](#).
107. [N Engl J Med](#). 1994 Nov 10;331(19):1259-64. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. [Esrig D](#), [Elmajian D](#), [Groshen S](#), [Freeman JA](#), [Stein JP](#), [Chen SC](#), [Nichols PW](#), [Skinner DG](#), [Jones PA](#), [Cote RJ](#).
108. [Int J Cancer](#). 1993 Feb 1;53(3):365-70. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. [Lipponen PK](#).
109. [J Clin Oncol](#). 1996 Oct;14(10):2646-52. Overexpression of p53 protein in a high-risk population of patients with superficial bladder cancer before and after bacillus Calmette-Guérin therapy: correlation to clinical outcome. [Lacombe L](#), [Dalbagni G](#), [Zhang ZF](#), [Cordon-Cardo C](#), [Fair WR](#), [Herr HW](#), [Reuter VE](#).

110. [Eur Urol](#). 2000 Dec;38(6):691-9;discussion 700.p53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer. Playground for urology scientists?[Schmitz-Dräger BJ](#), [Goebell PJ](#), [Ebert T](#), [Fradet Y](#).

111. [Urol Int](#). 2002;69(3):174-80.p21 and p53 Immunostaining and survival following systemic chemotherapy for urothelial cancer.[Jankevicius F](#), [Goebell P](#), [Kushima M](#), [Schulz WA](#), [Ackermann R](#), [Schmitz-Dräger BJ](#).

112. [Nature](#). 1997 Jan 9;385(6612):123-5.p53 and treatment of bladder cancer.[Cote RJ](#), [Esrig D](#), [Groshen S](#), [Jones PA](#), [Skinner DG](#).

113. [J Cancer Res Clin Oncol](#). 1997;123(10):565-70.p53 nuclear immunoreactivity as a predictor of response and outcome following chemotherapy for metastatic bladder cancer.[Sengeløv L](#), [Horn T](#), [Steven K](#).

114. [J Natl Cancer Inst](#). 1998 Jul 15;90(14):1072-9.Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer.[Stein JP](#), [Ginsberg DA](#), [Grossfeld GD](#), [Chatterjee SJ](#), [Esrig D](#), [Dickinson MG](#), [Groshen S](#), [Taylor CR](#), [Jones PA](#), [Skinner DG](#), [Cote RJ](#).

115. [Eur Urol](#). 1998 Sep;34(3):237-43.Expression of p21(waf1/cip1) protein in transitional cell bladder tumours and its prognostic value.[Lipponen P](#), [Aaltomaa S](#), [Eskelinen M](#), [Ala-Opas M](#), [Kosma VM](#).

116. [Clin Cancer Res](#). 2000 Aug;6(8):3131-8.Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers.[Migaldi M](#), [Sgambato A](#), [Garagnani L](#), [Ardito R](#), [Ferrari P](#), [De Gaetani C](#), [Cittadini A](#), [Trentini GP](#).

117. [Nat Med](#). 1997 Feb;3(2):222-5.Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients.[Porter PL](#), [Malone KE](#), [Heagerty PJ](#), [Alexander GM](#), [Gatti LA](#), [Firpo EJ](#), [Daling JR](#), [Roberts JM](#).

118. [Cancer Res](#). 1998 Feb 1;58(3):542-8.Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma.[Tsihlias J](#), [Kapusta LR](#), [DeBoer G](#), [Morava-Protzner I](#), [Zbieranowski I](#), [Bhattacharya N](#), [Catzavelos GC](#), [Klotz LH](#), [Slingerland JM](#).

119. [Cancer Res](#). 1997 Aug 15;57(16):3381-5.Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer.[Esposito V](#), [Baldi A](#), [De Luca A](#), [Groger AM](#), [Loda M](#), [Giordano GG](#), [Caputi M](#), [Baldi F](#), [Pagano M](#), [Giordano A](#).

120. Am J Pathol. 1999 Oct;155(4):1129-36. Loss of cell cycle regulators p27(Kip1) and cyclin E in transitional cell carcinoma of the bladder correlates with tumor grade and patient survival. Del Pizzo JJ, Borkowski A, Jacobs SC, Kyprianou N.

121. Hum Pathol. 2000 Jun;31(6):751-60. Cell cycle regulators in bladder cancer: a multivariate survival study with emphasis on p27Kip1. Korkolopoulou P, Christodoulou P, Konstantinidou AE, Thomas-Tsagli E, Kapralos P, Davaris P.

122. Br J Cancer. 2001 May 4;84(9):1242-51. Decreasing of p27(Kip1) and cyclin E protein levels is associated with progression from superficial into invasive bladder cancer. Kamai T, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H, Yoshida KI.

123. Cancer Res. 1998 Mar 15;58(6):1090-4. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, Hu SX, Xu HJ, Groshen S, Taylor CR, Skinner DG, Benedict WF.

124. Cancer. 1997 Oct 15;80(8):1472-81. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. Popov Z, Hoznek A, Colombel M, Bastuji-Garin S, Lefrere-Belda MA, Bellot J, Abboh CC, Mazerolles C, Chopin DK.

125. J Urol. 2000 Mar;163(3):758-60. The role of bcl-2, p53, and ki-67 index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. Wu TT, Chen JH, Lee YH, Huang JK.

126. Hum Pathol. 2006 Dec;37(12):1568-76. Epub 2006 Aug 10. Correlation of cyclin D1 and E1 expression with bladder cancer presence, invasion, progression, and metastasis. Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y.

127. Int J Cancer. 2002 Feb 10;97(5):671-8. Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, De Aloysio G, Ferrari P, Ardito R, De Gaetani C, Capelli G, Cittadini A, Trentini GP.

128. Urology. 2000 Nov 1;56(5):735-40. Prognostic value of P53 nuclear accumulation and histopathologic features in T1 transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Shariat SF, Weizer AZ, Green A, Laucirica R, Frolov A, Wheeler TM, Lerner SP.

129. Int J Cancer. 1994 May 15;57(4):508-14. Epidermal-growth-factor-receptor expression is associated with rapid tumor proliferation in bladder cancer. Sauter G, Haley J, Chew K, Kerschmann R, Moore D, Carroll P, Moch H, Gudat F, Mihatsch MJ, Waldman F.
130. Am J Clin Pathol. 1994 Feb;101(2):166-76. Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A multivariate survival analysis. Nguyen PL, Swanson PE, Jaszcz W, Aeppli DM, Zhang G, Singleton TP, Ward S, Dykoski D, Harvey J, Niehans GA.
131. J Urol. 1995 Mar;153(3 Pt 2):919-25. Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. Mellon K, Wright C, Kelly P, Horne CH, Neal DE.
132. Urol Res. 1997;25(1):9-17. Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. Ravery V, Grignon D, Angulo J, Pontes E, Montie J, Crissman J, Chopin D.
133. EMBO J. 1989 Jan;8(1):167-73. HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor. Lee J, Dull TJ, Lax I, Schlessinger J, Ullrich A.
134. Eur Urol. 1996;29(4):470-6. Evaluation of c-ras oncogene product (p21) in superficial bladder cancer. Fontana D, Bellina M, Scoffone C, Cagnazzi E, Cappia S, Cavallo F, Russo R, Leonardo E.
135. Cancer Res. 1995 Jun 1;55(11):2422-30. C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? Underwood M, Bartlett J, Reeves J, Gardiner DS, Scott R, Cooke T.
136. Br J Cancer. 1994 Jun;69(6):1120-5. Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. Lipponen P, Eskelinen M.
137. J Urol. 1996 Jan;155(1):321-6. C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P, Neal DE.
138. Jpn J Cancer Res. 1990 Jan;81(1):22-7. Point mutations of c-ras genes in human bladder cancer and kidney cancer. Nagata Y, Abe M, Kobayashi K, Saiki S, Kotake T, Yoshikawa K, Ueda R, Nakayama E, Shiku H.

139. J Urol. 1996 Mar;155(3):1083-8. A genotype study of the c-Ha-ras-1 locus in human bladder tumors. Bittard H, Descotes F, Billerey C, Lamy B, Adessi GR.
140. Cancer Res. 1992 Mar 1;52(5):1107-13. c-myc amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. Berns EM, Klijn JG, van Putten WL, van Staveren IL, Portengen H, Foekens JA.
141. Jpn J Cancer Res. 1990 Dec;81(12):1198-201. Detection of the c-myc gene product in urinary bladder cancer. Kotake T, Saiki S, Kinouchi T, Shiku H, Nakayama E.
142. J Natl Cancer Inst. 1994 Sep 7;86(17):1325-30. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. Lianes P, Orlow I, Zhang ZF, Oliva MR, Sarkis AS, Reuter VE, Cordon-Cardo C.
143. Anticancer Res. 2002 Nov-Dec;22(6B):3759-64. Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer. Stavropoulos NE, Filiadis I, Ioachim E, Hastazeris K, Tsimaris I, Kalogeras D, Stefanaki S, Agnantis NJ.
144. Abnormal bcl-2 and pRb expression are independent correlates of radiation response in muscle-invasive bladder cancer. Pollack A, Wu CS, Czerniak B, Zagars GK, Benedict WF, McDonnell TJ. Clin Cancer Res. 1997 Oct;3(10):1823-9.
145. Urology. 1998 Apr;51(4):645-9. Impact of the expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor receptor on the prognosis of superficial bladder cancer. Türkeri LN, Erton ML, Cevik I, Akdaş A.
146. Hum Pathol. 1999 Apr;30(4):372-7. Expression of transforming growth factor beta1 and its receptors in normal human urothelium and human transitional cell carcinomas. Izadifar V, de Boer WI, Muscatelli-Groux B, Maillé P, van der Kwast TH, Chopin DK.
147. J Natl Cancer Inst. 1993 Feb 3;85(3):241-2. Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients. Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Folkman J.
148. Int J Oncol. 1999 Jun;14(6):1123-7. Detection of basic fibroblast growth factor mRNA in urinary bladder cancer: correlation with local relapses. Gazzaniga P, Gandini O, Gradilone A, Silvestri I, Giuliani L, Magnanti M, Gallucci M, Saccani G, Frati L, Agliano AM.

149. Anticancer Res. 1999 Jan-Feb;19(1B):869-73. Serum concentrations of VEGF and b-FGF in renal cell, prostate and urinary bladder carcinomas. Edgren M, Lennernäs B, Larsson A, Nilsson S.

150. J Urol. 1999 Mar;161(3):799-804. Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates. Crew JP, O'Brien T, Bicknell R, Fuggle S, Cranston D, Harris AL.

151. Cancer. 2001 Jul 1;92(1):188-93. Relation between cyclooxygenase-2 expression and tumor invasiveness and patient survival in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Shirahama T, Arima J, Akiba S, Sakakura C.

152. Urology. 2002 Nov;60(5):816-21. Association of cyclooxygenase-2 expression with prognosis of stage T1 grade 3 bladder cancer. Kim SI, Kwon SM, Kim YS, Hong SJ.

153. Cancer Res. 1998 Mar 15;58(6):1298-304. Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. Campbell SC, Volpert OV, Ivanovich M, Bouck NP.

154. J Histochem Cytochem. 1996 Jul;44(7):761-6. Immunohistochemical detection of thrombospondin-1 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Grossfeld GD, Shi SR, Ginsberg DA, Rich KA, Skinner DG, Taylor CR, Cote RJ.

155. J Natl Cancer Inst. 1997 Feb 5;89(3):219-27. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S, Dunn M, Nichols PW, Taylor CR, Skinner DG, Cote RJ.

156. Urology. 1996 Sep;48(3):496-500. Significance of serum laminin P1 values in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. Mungan U, Kirkali G, Celebi I, Kirkali Z.

157. J Urol. 1995 Jul;154(1):237-41. An immunohistochemical and prognostic evaluation of cathepsin D expression in 105 bladder carcinomas. Dickinson AJ, Fox SB, Newcomb PV, Persad RA, Sibley GN, Harris AL.

158. Urology. 1996 Jan;47(1):34-7. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in patients with superficial bladder cancer. Hasui Y, Marutsuka K, Asada Y, Osada Y.

159. Urology. 2003 May;61(5):1053-8. Association of plasma urokinase-type plasminogen activator and its receptor with clinical outcome in patients undergoing radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. Shariat SF, Monoski MA, Andrews B, Wheeler TM, Lerner SP, Slawin KM.
160. Clin Cancer Res. 1998 Dec;4(12):3011-6. Matrix metalloproteinase-9 expression in bladder washes from bladder cancer patients predicts pathological stage and grade. Bianco FJ Jr, Gervasi DC, Tiguert R, Grignon DJ, Pontes JE, Crissman JD, Fridman R, Wood DP Jr.
161. Br J Cancer. 1998 Feb;77(4):650-5. Imbalance between serum matrix metalloproteinase-2 and its inhibitor as a predictor of recurrence of urothelial cancer. Gohji K, Fujimoto N, Ohkawa J, Fujii A, Nakajima M.
162. J Pathol. 1998 Oct;186(2):157-64. Expression of CD44 standard and variant-v6 proteins in transitional cell bladder tumours and their relation to prognosis during a long-term follow-up. Lipponen P, Aaltoma S, Kosma VM, Ala-Opas M, Eskelinen M.
163. Varkarakis MJ, Gaeta J, Moore RH, et al: Superficial bladder tumor: Aspects of clinical progression. Urology 1974; 4:414.
164. See WA, Fuller JR: Staging of advanced bladder cancer: Current concepts and pitfalls. Urol Clin North Am 1992; 19:663.
165. Koshikawa T, Leyh H, Schenck U: Difficulties in evaluating urinary specimens after local mitomycin therapy of bladder cancer. Diagn Cytopathol 1989; 5:117.
166. Tribukait B: Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genitourinary neoplasms. World J Urol 1987; 5:108.
167. Badalament RA, Hermensen DK, Kimmel M, et al: The sensitivity of bladder wash flow cytometry, bladder wash cytology and voided cytology in the detection of bladder carcinoma. Cancer 1987; 60:1423.
168. Parry WL, Hemstreet 3d GP: Cancer detection by quantitative fluorescence image analysis. J Urol 1988; 139:270.
169. Cheng L, Weaver AL, Bostwick DG: Predicting extravesical extension of bladder carcinoma: A novel method based on micrometer measurement of the depth of invasion in transurethral resection specimens. Urology 2000; 55:668.
170. Koraitim M, Kamal B, Metwally N, Zaky Y: Transurethral ultrasonic assessment of bladder carcinoma: Its value and limitations. J Urol 1995; 154:375.
171. Koss JC, Arger PH, Coleman BG, et al: CT staging of bladder carcinoma. AJR Am J Roentgenol 1981; 137:359.

172. Barentsz JO: Imaging: Old and new issues. Presented at 3rd International Symposium on Bladder Cancer. Invasive Bladder Cancer: the State of the Art. Padova, Italy, September 24, 1999.

173. [JUrol](#). 1999 Jul;162(1):74-6. The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors. [Herr HW](#).

174. Eur Urol. 2003 Mar;43(3):241-5. The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumours. Miladi M, Peyromaure M, Zerbib M, Saïghi D, Debré B.

175. Eur Urol. 2002 Feb;41(2):178-81. Prediction of muscle invasion of bladder cancer by cystoscopy. Satoh E, Miyao N, Tachiki H, Fujisawa Y.

176. Eur Urol. 2002 Dec;42(6):533-41. Superficial bladder tumors. Chopin DK, Gattegno B.

177. Urol. 1976 Aug;116(2):180-3. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. Morales A, Eidinger D, Bruce AW.

178. Eur Urol. 2001 Aug;40(2):144-50. Intravesical BCG in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder: long-term results of EORTC GU Group phase II protocol 30861. Jakse G, Hall R, Bono A, Hörtl W, Carpentier P, Spaander JP, van der Meijden AP, Sylvester R.

179. J Urol. 2005 Jul;174(1):86-91; discussion 91-2. Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published randomized clinical trials. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA, Kurth K.

180. Urology. 2006 Jun;67(6):1216-23. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. Han RF, Pan JG.

181. J Urol. 2002 Nov;168(5):1964-70. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. Sylvester RJ, van der MEIJDEN AP, Lamm DL.

182. J Urol. 2006 Aug;176(2):486-92; discussion 491-2. Cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: results of a surgery only series in the neobladder era. Hautmann RE, Gschwend JE, de Petroni RC, Kron M, Volkmer BG.

183. J Clin Oncol. 2003 Feb 15;21(4):690-6. Radical cystectomy for bladder cancer today--a homogeneous series without neoadjuvant therapy. Madersbacher S, Hochreiter W, Burkhard F, Thalmann GN, Danuser H, Markwalder R, Studer UE.

184. J Biol Chem. 1993 Aug 15;268(23):17478-88. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT.

185. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, Gözükara EM. Nitrik oksit(NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS)'ın fizyolojik ve patolojik özellikleri. T Klin Pediatri 2001; 10: 226-235.

186. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Department of Pharmacology, Boyer Center for Molecular Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06536, USA

187. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 27;98(5):2604-9. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK.

188. Cancer Lett. 2004 Jul 8;210(1):63-71. eNOS protects prostate cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. Tong X, Li H.

189. J Clin Invest. 1998 Jun 1;101(11):2567-78. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM.

190. Lung. 2000 Nov-Dec;178(6):351-60. Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme in patients with lung cancer. Cheon KT, Choi KH, Lee HB, Park SK, Rhee YK, Lee YC

191. Carcinogenesis. 2009 Apr;30(4):621-5. Epub 2009 Jan 23. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. Lee KM, Kang D, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, Chanock S, Huang WY, Hayes RB.

192. Cancer. 2006 Nov 1;107(9):2245-53. Promoter polymorphism (-786t>C) in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women age younger than 55 years. Lu J, Wei Q, Bondy ML, Yu TK, Li D, Brewster A, Shete S, Sahin A, Meric-Bernstam F, Wang LE.

193. Cancer Detect Prev. 2009;32(5-6):416-23. Epub 2009 Mar 20. Association of NAT2, GSTM1, GSTT1, CYP2A6, and CYP2A13 gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of bladder cancer in Central China. Song DK, Xing DL, Zhang LR, Li ZX, Liu J, Qiao BP

194. BJU Int. 2008 Feb;101(4):503-7. Epub 2007 Nov 6. A single-nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances bladder cancer susceptibility. Tasci AI, Tugcu V, Ozbek E, Ozbay B, Simsek A, Koksall V.

195. Clin Cancer Res. 2009 Apr 1;15(7):2567-72. Epub 2009 Mar 10. A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter associated with risk and progression of bladder cancer. Wang M, Zhang Z, Tian Y, Shao J, Zhang Z.
196. J Biomed Sci. 2008 Mar;15(2):261-9. Epub 2007 Oct 6. Androgen receptor gene polymorphism may affect the risk of urothelial carcinoma. Liu CH, Huang JD, Huang SW, Hour TC, Huang YK, Hsueh YM, Chiou HY, Lee TC, Jan KY, Chen CJ, Pu YS.
197. Urology. 2009 Mar;73(3):670-4. Epub 2008 Nov 26. Association between survivin gene promoter -31 C/G polymorphism and urothelial carcinoma risk in Taiwanese population. Wang YH, Chiou HY, Lin CT, Hsieh HY, Wu CC, Hsu CD, Shen CH.
198. Chien YH, Bau DT, Jan KY. Nitric oxide inhibits DNA-adduct excision in nucleotide excision repair. Free Radic Biol Med 2004;36:1011-17.
199. Jadeski LC, Chakraborty C, Lala PK. Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. Int J Cancer 2003;106:496-504.
200. Forrester K, Ambs S, Lupold SE, Kapust RB, Spillare EA, Weinberg WC, Felley-Bosco E, Wang XW, Geller DA, Tzeng E, Billiar TR, Harris CC. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:2442-7.
201. Kong L, Dunn GD, Keefer LK, Korthuis RJ. Nitric oxide reduces tumor cell adhesion to isolated rat postcapillary venules. Clin Exp Metastasis 1996;14:335-43.
202. Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. J Biochem Mol Biol 2002;35:116-26.
203. Urol Res. 2003 Aug;31(4):232-5. Epub 2003 Feb 27. Nitric oxide synthase expression in human bladder cancer and its relation to angiogenesis. Lin Z, Chen S, Ye C, Zhu S.
204. Urology. 1999 Jun;53(6):1252-7. Endogenously formed nitric oxide modulates cell growth in bladder cancer cell lines. Morcos E, Jansson OT, Adolfsson J, Kratz G, Wiklund NP.
205. Nitric Oxide. 2005 Feb;12(1):39-45. Epub 2004 Dec 21. Expression of inducible nitric oxide synthase in tumoral and non-tumoral epithelia from bladder cancer patients. Sandes EO, Faletti AG, Riveros MD, Vidal Mdel C, Gimenez L, Casabé AR, Eiján AM.
206. Urology. 2007 May;69(5):1001-6. Inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism, cigarette smoking, and urothelial carcinoma risk. Shen CH, Wang YH, Wang WC, Jou YC, Hsu HS, Hsieh HY, Chiou HY.
207. Int J Cancer. 2009 Apr 1;124(7):1565-71. An intron 4 VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with early-onset colorectal cancer. Yeh CC, Santella RM, Hsieh LL, Sung FC, Tang R.

208. Lack of association between NOS3 Glu298Asp and breast cancer risk: a case-control study. Jose Luis Royo Æ Jose' Andre' s Moreno-Nogueira Æ Jose Jorge Gala'n Æ Antonio Gonza'lez-Marti'n Æ Agustin Ruiz Æ Rosario Gonza'lez-Mancha Æ Luis Miguel Real

209. Cancer. 2006 Nov 1;107(9):2245-53. Promoter polymorphism (-786T>C) in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women age younger than 55 years. Lu J, Wei Q, Bondy ML, Yu TK, Li D, Brewster A, Shete S, Sahin A, Meric-Bernstam F, Wang LE.

210. Eur J Cancer Prev. 2002 Aug;11(4):343-50. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and genetic susceptibility to prostate cancer. Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Lopes C

211. Cancer Detect Prev. 2006;30(1):7-13. Epub 2006 Feb 2. The endothelial nitric oxide synthase Glu-298-Asp polymorphism and its mRNA expression in the peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Marangoni K, Neves AF, Cardoso AM, Santos WK, Faria PC, Goulart LR

212. Urol Oncol. 2009 Jul 2. [Epub ahead of print] Despite the lack of association between different genotypes and the presence of prostate cancer, endothelial nitric oxide Synthase a/b (eNOS4a/b) polymorphism may be associated with advanced clinical stage and bone metastasis. Sanli O, Kucukgergin C, Gokpinar M, Tefik T, Nane I, Seckin S.

213. Urol Oncol. 2009 Jul 2. Despite the lack of association between different genotypes and the presence of prostate cancer, endothelial nitric oxide Synthase a/b (eNOS4a/b) polymorphism may be associated with advanced clinical stage and bone metastasis. Sanli O, Kucukgergin C, Gokpinar M, Tefik T, Nane I, Seckin S.

214. J Investig Med. 2009 Oct;57(7):769-76. Distribution of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Turkish population. Sinici I, Karahan S, Atalar E.