

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MESANE KANSERİNDE SİTOKERATİN 20
mRNA EKSPRESYONUNUN REAL-TIME
REVERS TRANSKRİPTAZ ZİNCİR
REAKSİYONU İLE KANTİTATİF TAYİNİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Sunde Yılmaz

Bornova / İZMİR

2006

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MESANE KANSERİNDE SİTOKERATİN 20
mRNA EKSPRESYONUNUN REAL-TIME
REVERS TRANSKRİPTAZ ZİNCİR
REAKSİYONU İLE KANTİTATİF TAYİNİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Sunde Yılmaz

DANIŞMAN: Doç. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ

Bornova / İZMİR

2006

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU

Üye : Prof. Dr. Oktay NAZLI

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca, korkularımı sınırsız sabrı ve hoşgörüsüyle dinlediği, sorularıma kendi soruları gibi benimseyip cevap bulmaya çalıştığı, hayat görüşü ile baktığım çerçeveyi genişlettiği ve “benim” danışmanım olduğu için, tez çalışmam süresince her zaman desteğini hissettiğim, yanımda olduğunu bildiğim, Sayın Doç. Dr. Cumhur GÜNDÜZ e

Tez çalışmamın aşamaları ile ilgilenip gösterdiği destekten ötürü, Ana Bilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU' na

Çalışmamda kullandığım yöntemin standardizasyonu, bilgi ve katkılarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA' ya,

İlgisi ve desteği için Sayın Yrd. Doç. Dr. Zuhâl EROĞLU' na,

Yüksek lisans öğrenciliğimin başladığı ilk günden itibaren beni hep destekleyen, bana ekip ruhunu aşıl原因an, ikinci kardeşi olduğunu hissettiren, sevgili ablam Sayın Ar. Gör. Çığır BİRAY AVCI' ya,

Altı yılımı birlikte çok keyifli ve bir o kadar da değerli anılarla geçirdiğim, yurdu keşfe çıktığım, daha çok uzun yıllar yollarımızın ayrılmamasını dilediğim o çok sevgili omzun sahibi Sayın Zeynep Özlem Doğan' a,

Tez çalışmam süresince gösterdikleri yardımseverlik için başta Prof. Dr. Oktay NAZLI, Op. Dr. Burak TURNA, Dr. Serkan DEMİRYOĞURAN ve Hemş. Güngör CAN olmak üzere tüm Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi, asistan, ve hemşirelerine,

Gösterdiği ilgi ve önerileri için Uz. Dr. Gül SAPMAZ' a,

Yüksek lisans kariyerim boyunca paylaştığımız her güzel ve birikim dolu gün için, değerli çalışma arkadaşlarım Ar. Gör. Nur SELVİ' a, Ar. Gör. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ' a, Ar. Gör. Burçin TEZCAN' a ve Ana Bilim Dalımızdaki diğer tüm arkadaşlarıma,

Güler yüzlerini hiç esirgemedikleri için anabilim dalımızın tüm diğer çalışanlarına,

Tüm ruh hallerime uyum gösterip, beni anlayışla karşılayan, canım kardeşim Aylin YILMAZ 'a,

Her zaman benim için en iyiyi, en güzeli isteyen ve şartlar ne olursa olsun beni destekleyen, yanımda olan sevgili aileme teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

1. BÖLÜM I

1.1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.2. GENEL BİLGİLER	2
1.2.1. Üriner Sistem	2
1.2.1.1.	B
öbrekler (Ren)	3
1.2.1.2.	Ü
reter	4
1.2.1.3.	M
esane (Vesica Urinaria)	4
1.2.1.3.1. Anatomisi	4
1.2.1.3.2. Histolojisi	5
1.2.2. Kanser	7
1.2.2.1.	M
esane Kanseri	8
1.2.2.1.1. Tümör Derecesi	11
1.2.2.1.2. Karsinoma İn Situ	15
1.2.2.1.3. Mesane Tümörü Tanı Yöntemleri	15
1.2.2.1.3.1.	T
anısal Sistoskopi	15
1.2.2.1.3.2.	İ
ntravenöz Ürografi	16
1.2.2.1.3.3.	U
ltrasonografi	16
1.2.2.1.3.4.	B
ilgisayarlı Tomografi	16
1.2.2.1.3.5.	M
anyetik Rezonans Görüntüleme	17
1.2.2.1.3.6.	İ
drar Sitolojisi	17
1.2.3. Proteinler	19
1.2.4. Hücre İskeleti	19
1.2.4.1.	M
ikrotübüller	20
1.2.4.2.	A
ktinler (Mikroflamentler)	21
1.2.4.3.	A
ra (İntermediate) Flamentler	21
1.2.4.3.1. Sitokeratinler	22
1.2.4.3.1.1.	S
itokeratinlerin Spesifik Dokusal Dağılımı	23
1.2.4.3.1.2.	S
itokeratin 20	25
1.2.5. Nükleik Asit Amplifikasyonu	26
1.2.5.1.	P
olimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	26
1.2.5.1.1. Real Time PCR	27

1.2.5.2.	R
eal Time On-Line Revers Transkripsiyon PCR _____	29
1.2.5.3.	R
ibonükleik Asit (RNA) _____	29
1.2.5.3.1. Mesajcı RNA (mRNA) _____	30
1.2.5.3.2. Transfer RNA (tRNA) _____	30
1.2.5.3.3. Ribozomal RNA (rRNA) _____	31
1.2.5.3.4. Heterojen nüklear RNA (hnRNA) _____	31
1.2.5.3.5. Küçük nüklear (snRNA) _____	31
1.2.5.3.6. Küçük nükleolar RNA (snoRNA) _____	31
1.2.5.3.7. Rehber RNA (gRNA) _____	31
1.2.5.3.8. MikroRNA (miRNA) _____	320
1.2.5.3.9. Efference RNA (eRNA) _____	32
1.2.5.3.10.	S
ignal recognition particle (SRP) _____	32
1.2.5.3.11.	t
ransfer-mesajcı RNA (tmRNA) _____	32
1.2.5.3.12.	S
mall interfering RNA (siRNA) _____	32
1.2.5.3.13.	K
odlanmayan RNA (ncRNA) _____	32
1.2.6. Komplementer DNA (cDNA) _____	33
1.2.7. Kalibratör RNA _____	33
1.2.7.1.	H
T-29 hücre hatınının Özellikleri _____	33
1.2.8. Negatif Kontrol _____	35
1.2.9. CK20 Ekspresyonunun Kantifikasyonun Standardize Edilmesi _____	35

2. BÖLÜM II

2.1. GEREÇ VE YÖNTEM _____	37
2.1.1. Ölgu Grubu _____	37
2.1.2. Kontrol Grubu _____	37
2.1.3. Etik kurul _____	37
2.1.4. İdrar Örneğinin Toplanması _____	38
2.1.5. İdrardan RNA izolasyonu _____	38
2.1.6. High Pure RNA İzolasyon Kiti İçeriği _____	38
2.1.7. İdrardan total RNA izolasyonu aşamaları _____	39
2.1.8. CK 20 mRNA'nın Kantitasyonu _____	40
2.1.8.1.	c
DNA sentezi _____	40
2.1.8.2.	c
DNA' dan CK20' yı kodlayan mRNA' nın Amplifikasyonu _____	42
2.1.8.3.	C
K20' nin Amplifikasyon İşlemi _____	44
2.1.8.4.	C
K20 mRNA Ekspresyonu Kantitasyonunun Hesaplanması _____	45
2.1.8.5.	S
onuçların yorumlanması _____	46

2.1.8.6.	Y
üksek Spesifiklik _____	47
2.1.8.7.	G
eçiş Noktasındaki PCR Ürünlerinin Kantifikasyonu _____	47
2.1.9. İstatistiksel Değerlendirme _____	48
2.1.10.	İ
şlemler Sırasında Kullanılan Malzemeler _____	48
3. BÖLÜM III	
3.1. BULGULAR _____	51
3.1.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri _____	51
3.1.2. Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri _____	53
3.1.3. CK20 mRNA Ekspresyonu _____	55
3.1.4. Olgu Grubu _____	55
3.1.5. Kontrol Grubu _____	56
4. BÖLÜM IV	
4.1. TARTIŞMA _____	66
5. BÖLÜM V	
5.1. SONUÇ VE ÖNERİLER _____	73
6. BÖLÜM VI	
6.1. ÖZET _____	76
6.2. ABSTRACT _____	79
7. BÖLÜM VII	
7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR _____	82
7.2. ÖZGEÇMİŞ _____	89

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1: WHO tarafından yapılan histopatolojik sınıflandırma _____	12
Tablo 2: Mesane Tümörlerinin TNM sınıflandırılması _____	12
Tablo 3: Sitokeratinlerin buldukları bölgeler ve mutasyona bağlı meydana gelen hastalıklar _____	24
Tablo 4: cDNA sentezi için PCR karışımı _____	41
Tablo 5: Reverse Transkriptaz PCR Protokolü _____	42
Tablo 6: CK20 Kitinin PCR karışım içeriği _____	43
Tablo 7: Program 1-Denatürasyon _____	44
Tablo 8: Program 2-Amplifikasyon _____	45
Tablo 9: Program 3-Soğutma _____	45
Tablo 10: Plastik ve Cam Malzemeler listesi _____	49
Tablo 11: Kimyasal Malzemeler Listesi _____	49
Tablo 12: Cihazlar Listesi _____	50
Tablo 13: Olguların demografik özellikleri _____	52
Tablo 14: Olguların klinik özellikleri _____	52
Tablo: 15 Kontrol grubunun demografik özellikleri _____	54
Tablo 16: Kontrol grubunun özellikleri _____	54
Tablo 17: Kontrol grubundaki olguların geçiş noktası ve rölatif oranları _____	57
Tablo 18: Olgu grubunun geçiş noktaları ve rölatif oranları _____	58

Tablo 19: Grade ve evrelere göre CK20 ekspresyonunun ortalaması _____62

Tablo 20: CK20 kantitasyonunun sensitivite ve spesifite değerleri _____63

Tablo 21: AUC (Area Under the Curve) _____64

Tablo 22: Eğrinin koordinatları _____65

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1: Mesane Anatomisi _____	5
Şekil 2: Transizyonel hücrelerin basınç altındaki değişimleri _____	6
Şekil 3: Mesane duvarının kesiti _____	6
Şekil 4: Mesane duvarının histolojisi _____	7
Şekil 5: TNM sınıflandırması _____	10
Şekil 6: Tanısal Sistoskopi _____	15
Şekil 7: İdrar sitolojisi _____	18
Şekil 8: Hücre iskeleti elemanları _____	20
Şekil 9: tip I ve tip II sitokeratin filamentleri. Boyalı alanlar molekülün L-segmentleri ile bağlanan sarmal parçalarını, E- ve V- segmentleri değişken bölgeleri, H-segmenti homolog bölgeleri gösteriyor. "Stutter " bölgesi 2B' nin oranını S ile belirler _____	23
Şekil 10: FRET yöntemi _____	28
Şekil 11: (a) CK20 Hedef Gen, (b) Referans Gen Geçiş Noktası _____	46
Şekil 12: CK20 mRNA Ekspresyonunun Geçiş Noktalarına Göre Kantitasyon Yazılımı ile Hesaplanan Rölatif Oranları _____	47
Şekil 13: Olguların saptanan CK20 mRNA ekspresyonunun rölatif oranı _____	55
Şekil 14: Kontrol grubunun CK20 rölatif oranları _____	56
Şekil 15: Karşılaştırmalı ortalaması _____	61
Şekil 16: CK20 ekspresyon ortalamasının gradelere göre dağılımı _____	62
Şekil 17: Saptanan sensitivite ve spesifisite değerlerinden ROC (Reciever Operating Characteristic) eğrisi _____	64

KISALTMALAR

A:	Adenin
AMW:	Amplification Microwells
C:	Sitozin
cDNA:	Koplementer deoksiribonükleik asit
Cis:	Karsinoma in Situ
CK20:	Sitokeratin 20
°C:	Santigrat derece
dk:	Dakika
DNA:	Deoksiribonükleik asidit
dNTP:	Deoksinükleotid trifosfat
eRNA:	Efference RNA
G:	Guanin
gRNA:	Rehber RNA
hnRNA:	Heterojen nüklear RNA
ISUP:	Uluslararası Ürolojik Patoloji Topluluğu
KİDEM:	Kanser İzlem ve Denetim Merkezi
Mg⁺²:	Magnezyum
MgCl₂:	Magnezyum klorür
miRNA:	MikroRNA
ml:	mililitre
MR:	Manyetik Rezonans
mRNA:	Mesajcı ribonükleik asit

ncRNA:	Kodlanmayan RNA
nM:	Nanomolar
PBGD:	Porfobilinojen deaminaz
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA:	Ribonükleik asit
rpm:	revolutions per minute
RT-PCR:	Real Time Polimerase Chain Reaction
s:	Saat
siRNA:	Small interfering RNA
sn:	Saniye
snoRNA:	Küçük nükleolar RNA
snRNA:	Küçük nüklear RNA
SRP:	Sinyal tanıyan partikül
T:	Timin
THK:	Transizyonel hücreli kanser
tmRNA:	Transfer-mesajcı RNA
TUR:	Transüretal Rezeksiyon
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
µl:	mikro litre

BÖLÜM-I

1.1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri ürogenital sistemde rastlanan malignitelerde ikinci sırada yer almakta ve erkeklerde görülen kanserlerin yaklaşık % 7' sini, kadınlarda görülen kanserlerin ise yaklaşık % 3' ünü oluşturmaktadır. Her yıl Avrupa ülkelerinde 66.000 (6), Amerika Birleşik Devletleri' nde ise 54.500 kişiye yeni tanı konulmaktadır (61). Tanı konduğunda tümörlerin önemli bir çoğunluğunu yüzeysel mesane kanserleri oluşturur.

Mesane tümörlerinin tanısında ve nükslerin takibinde en çok kabul gören yöntem sistoskopidir ve idrar sitolojisi de ek veriler sağlamaktadır (19). Sistoskopinin duyarlılığının % 90' ı aşmasına (74) karşın bu invaziv yöntemin bazı durumlarda kesin tanı koydurması güçtür. Ayrıca yöntemin maliyeti ve hastaların yakınmalarına yol açan morbiditelerinin olması da unutulmamalıdır.

İdrar sitolojisi tedavi edilen hastaların izleminde, tümör nüksünün saptanmasında ve progresyonun erken belirlenmesinde kullanılmaktadır. İdrar sitolojisi yeni tümör tanısı ve transizyonel hücreli karsinom (THK) taraması amacıyla kullanılabilirse de bu tip lezyonlarda spesifitesi % 90' dan az iken sensitivitesi özellikle düşük derece ve evreli tümörlerde % 25-40 oranında kalmaktadır (47). Sensitivite karsinoma in situ ve yüksek evreli tümörlerde

artmaktadır. İdrar sitolojisi örneğini değerlendirenler arasındaki görüş farklılıkları yöntemin önemli dezavantajlarından birisidir.

Sistoskopinin invaziv bir yöntem olması ve sitolojinin yukarıda tanımlanan dezavantajlarından dolayı mesane tümörlü hastaların uzun süreli izleminde kullanılabilecek daha güvenilir, invaziv olmayan ve etkin bir yöntemin geliştirilmesi bunun için de tümör belirleyicilerinin araştırılması zorunluluğu doğmaktadır.

Araştırma aşamasında olan tümör belirleyicileri arasında sitokeratinler yer almaktadır. Sitokeratin 20 (CK20), sitoiskelet ile ilişkili filamentlerden biri olmakla birlikte, normal ürotelyumda olduğu gibi gastrointestinal epitelyumda ve mesane tümörü hücrelerinde de eksprese edildiği bilinmektedir. CK20 ekspresyonu, diferansiyasyon ile ilişkilidir. Mesane tümör hücrelerinde, restriksiyon kaybolur ve CK20 ekspresyonu her katmanda gözlenebilir (27). Çalışmamızda, CK20 ekspresyonunun tümör oluşumu veya rekürrensinde ne kadar güvenilir olduğu hipotezinden yola çıkılarak normal ve tümöral ürotelyal hücreli olgular arasındaki ekspresyonun kantifikasyonunun farkının saptanması amaçlanmıştır.

1.2. GENEL BİLGİLER

1.2.1. Üriner Sistem

Üriner sistem homeostaza katılan en önemli organ sistemlerinden birisidir. Vücut sıvılarının hacim ve içeriğinin, kan basıncının, pH' ın, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi, hücrelerde metabolizma sonucu oluşan ve kana verilen artık ürünlerden kanın arındırılması üriner sistemin fonksiyonla-

rıdır. Boşaltım sistemini oluşturan yapılar, sağ ve solda idrarı oluşturan böbrek-ler ile taşımak ya da depolamakla görevli olan idrar yolları, idrar kesesi (mesane) ve idrar kanalıdır.

1.2.1.1. Böbrekler (Ren)

Böbrekler psoas kası boyunca yerleştikleri için oblik konumdadırlar. Karaciğerin konumu sağ böbreğin sola göre daha aşağıda yerleşmesine neden olur. Yetişkin böbreği yaklaşık 150 gr' dır. Uzunlamasına kesitte böbreğin dışta korteks, en içte medulla ve internal pelvis ve kalikslardan oluştuğu görülür.

Korteksin görünümü homojendir. Korteksin pelvise doğru papillalarla forniksler arasından gönderdiği uzantılara Bertini kolonları denir. Medulla; birbirlerine yaklaşan ve minör kalikslere boşalan toplayıcı renal tübüllerin oluşturduğu sayısız piramit içerir. Minör kalikslerin (8-12 adet) uç kısımları piramitlerin uzantılarıyla çentiklenmiştir. Minör kaliksler birleşerek böbrek pelvisine boşalan 2 veya 3 majör kaliksi oluşturur. Pelvis renalis, bütünüyle intrarenal veya kısmen intrarenal, kısmen de ekstrarenal olabilir. Aşağı-iç yanda incelerek üreteri oluştururlar.

Böbrekler, vücudun metabolik artık ürünlerinin (üre, elektrolitler, toksik maddeler) ve fazla suyun idrar olarak organizmadan çıkmasını sağlarlar. Bu yol ile doku sıvılarının yoğunluğunu, elektrolit ve su dengesini korurlar ve pH' ını düzenlerler. Kanın asit-baz dengesinin korunmasında da büyük öneme sahiptirler. Eritropoietin ve renin salgıları ile de iç salgı bezi olarak fonksiyon görürler. Kalsiyum metabolizması üzerine de etkileri vardır. Nefronlar; böbrek-

lerde idrarı oluşturan en küçük birimlerdir. Nefronların çift yapraklı Bowman kapsülü içine yerleşmiş kapiller damarların oluşturduğu glomerül yumağı, kanın filtre edildiğı, tübüller ise idrarın oluşturulduğu bölümdür. Nefronların renin–anjyotensin sistemi, hem glomerül filtrasyon hızının hem de sistemik kan basıncının düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Nefronlar ortak açılma kanalları ile böbrek papillaları üzerindeki deliklere açılırlar. Böylece oluşan idrar ilk olarak kaliklerde ve dolayısı ile pelviste biriktirilmiş olur. Nefronlarda gerçekleşen filtrasyon, salgılama ve geri emilme aşamalarından sonra oluşan günlük idrar hacmi 1,5 lt kadardır.

1.2.1.2. Üreter

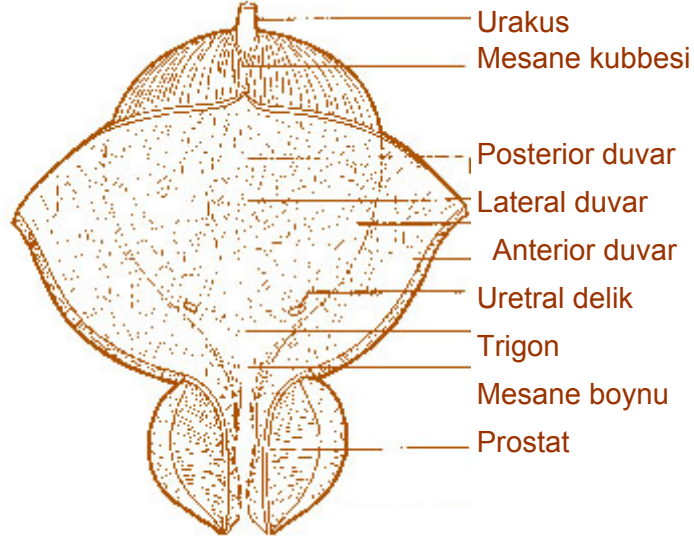
İdrarı peristaltik hareketlerle ve yer çekimi yardımıyla böbrekten mesaneye kadar ileten boru şeklindeki bir çift oluşumdur. Yetişkin üreterin uzunluğu yaklaşık 30 cm uzunlukta olup bireyin boyuyla doğrudan ilişkili olarak değişir. Oldukça düzgün bir S eğrisi çizer. Göreceli darlık alanları; üretopelvik bileşke, üreterin iliyak damarları üstten çaprazladığı bölge ve mesane içine girdiğı yerdir.

1.2.1.3. Mesane (Vesica Urinaria)

1.2.1.3.1. Anatomisi

Mesane pubik kemiğin hemen arkasında, karnın en aşağı noktasındaki pelvisin ortasında yer alan musküler bir organdır. Mesanenin; üreterler aracılığı ile böbreklerden gelen idrarı yaklaşık 500 ml hacme kadar içerisinde belirgin bir basınç artışı olmadan ve idrarın içinde erimiş durumda bulunan katı

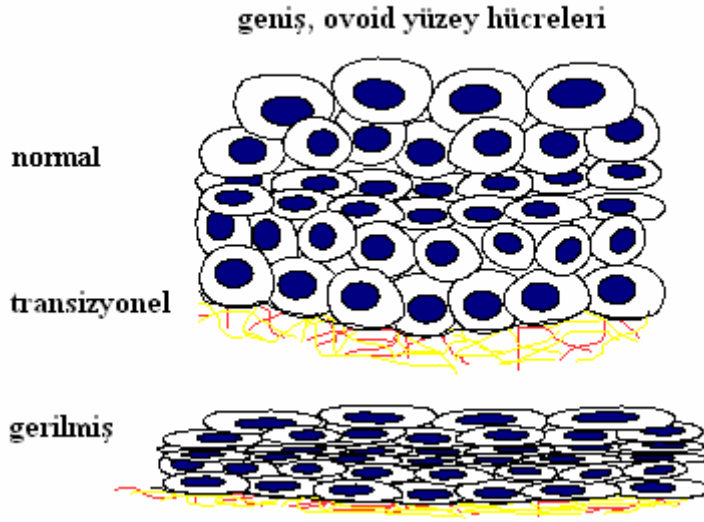
maddelerde bir çökme olmadan depolamak ve idrar belirli bir hacme ulaştığında oluşan idrar yapma refleksi sonucu ani bir basınç artışı ile depolanmış olan bu idrarı istemli olarak dışarı pompalamak gibi iki çok önemli görevi vardır.



Şekil 1: Mesane Anatomisi (73)

1.2.1.3.2. Histolojisi

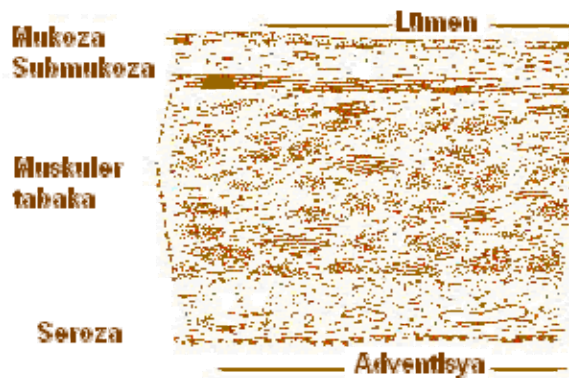
Mesane mukozası değişici epitel ve gevşekten sıkıya doğru değişen bağ dokusunun yaptığı lamina propriadan oluşur. Mesanenin çevresindeki lamina propriayı örgü biçiminde yoğun düz kas tabakası sarar. Mesane gevşek iken epitelyum 5–6 sıra hücreden oluşur; yüzeydeki hücreler yuvarlaktır ve lümeneye uzanır. Bu hücreler genellikle poliploid ve çift çekirdeklidir. Epitel gerildiğinde epitelin kalınlığı 3–4 hücre sırasından oluşur ve yüzeydeki hücreler yassılaştır.



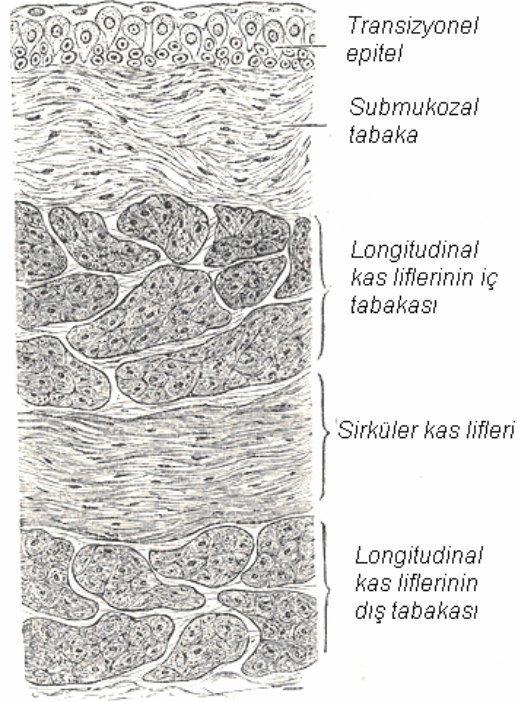
Şekil 2: Transizyonel hücrelerin basınç altındaki değişimleri (35)

Değişken epitelin yüzeyindeki hücrelerin kalın plaklardan oluşan özel bir membranı bulunur. Bu plaklar idrarla doku sıvıları arasında ozmotik bariyeri oluşturduğu düşünülen daha ince bir membranın yaptığı dar şeritlere bölünür. Mesane kasıldığında membran ince bölümlerden katlanır ve kalın plaklar içi şeklinde sitoplazmik veziküller oluşturacak şekilde içeri çöker. Bu veziküller boş mesanenin yüzeyinde bulunan hücrelerin sitoplazması içinde bu kalın plakların yerleştiği depolar olarak iş görürken dolu mesanede artan hücre yüzeyine yayılırlar.

Mesane Duvarı



Şekil 3: Mesane duvarının kesiti



Şekil 4: Mesane duvarının histolojisi (33)

Mesanedeki kas lifleri mesane boyunca ulaşınca dek her yöne dağılırlar. Burada 3 ayrı tabaka seçilir: erkeklerde mesane boyunun distalinde yer alan içteki longitudinal tabaka, prostatik üretra ve prostat parankimi çevresinde sirküler hale geçer. Dişilerde dış açılışa (metausa) dek uzanır. Bu kas lifleri gerçek üretral sfinkteri oluşturur. Orta tabaka, erkekte prostat sonuna dek devam ederken dişide, diş üretra meatusuna dek ilerler.

1.2.2. Kanser

Kanser, ister kalıtsal isterse sporadik olsun, hücresel bazda genetik bir hastalıktır. Kanserde temel patoloji hastalığın başladığı doku içerisinde bir hücrenin kontrolsüz ve uygunsuz olarak çoğalmasıdır. Bu hücre çoğalması önce lokal olarak organ içerisinde bir kitle (tümör) oluşumu, daha sonra ise bu tümöral yapıda damarlanmanın artması ve tümörün yakın dokulara veya

kan yoluyla vücut içerisinde yaygın olarak dağılması (metastaz) ile sonuçlanır.

Normal hücrelerde, mitoz her aşamasında birçok farklı mekanizma ile kontrol altında tutulur ve ancak tüm koşullar yerine getirildikten sonra bir sonraki evreye geçilir (hücre döngüsü kontrol noktaları). Kanserde bu moleküler kontrol mekanizması genetik mutasyonlar ve / veya çevresel koşullar nedeniyle fonksiyonunu kaybeder. Kontrol mekanizmalarındaki bu fonksiyon kaybına, genellikle proliferasyonu stimüle eden sinyallerde bir artış, hasarlı DNA kısımlarının onarımında rol alan moleküler mekanizmalarda (tümör baskılayıcı) ek patolojiler ve apoptozisin baskılanması eşlik eder. Böylece kanserli dokuda kontrolsüz çoğalmanın yanı sıra “genetik kararsızlık” olarak ifade edilen mutasyonlara açık ve genetik olarak dengesiz bir durum oluşur.

Hücre çoğalmasında ve / veya hasarlı DNA onarımında görevli mekanizmaları kontrol eden kritik genlerde doğuştan var olan kalıtsal bir bozukluk, doğal olarak kişiyi kansere meyilli kılar. Bu kişilerde çevre koşulları sonucu diğer normal genin de fonksiyonunu yitirmesi veya zaten aksak olan hücre içi kontrol mekanizmalarında ek patolojilerin oluşması sonucu çok daha erken yaşta kanser ortaya çıkabilmektedir.

1.2.2.1. Mesane Kanseri

Mesane tümörü, Amerika Birleşik Devletleri'nde erkeklerde görülen kanserler içerisinde 4., kadınlarda ise 8. sıradadır (23).

Türkiye' de görülme sıklığı KİDEM (Kanser İzlem ve Denetim Merkezi) çalışmalarına göre akciğer kanserinden sonra 2. sırada, ürogenital kanserler arasında ise erkeklerde ilk sıradadır.

Yeni tanı konan olguların % 74' ü yüzeysel, % 18' i lokal ileri evre ve % 18' i uzak metastaz yapmış durumdadır (45).

İlk tanıda kas invazyonu bulunmayan (Ta, T1 evre) hastalarda primer tedavi seçeneği olan transüretral rezeksiyon (TUR) sonrası uygulanan ek tedavilere rağmen % 30-85 nüks olasılığı vardır. Buna ek olarak % 10-15 olguda da zaman içerisinde kas tutulumu gerçekleşebilir (40, 45).

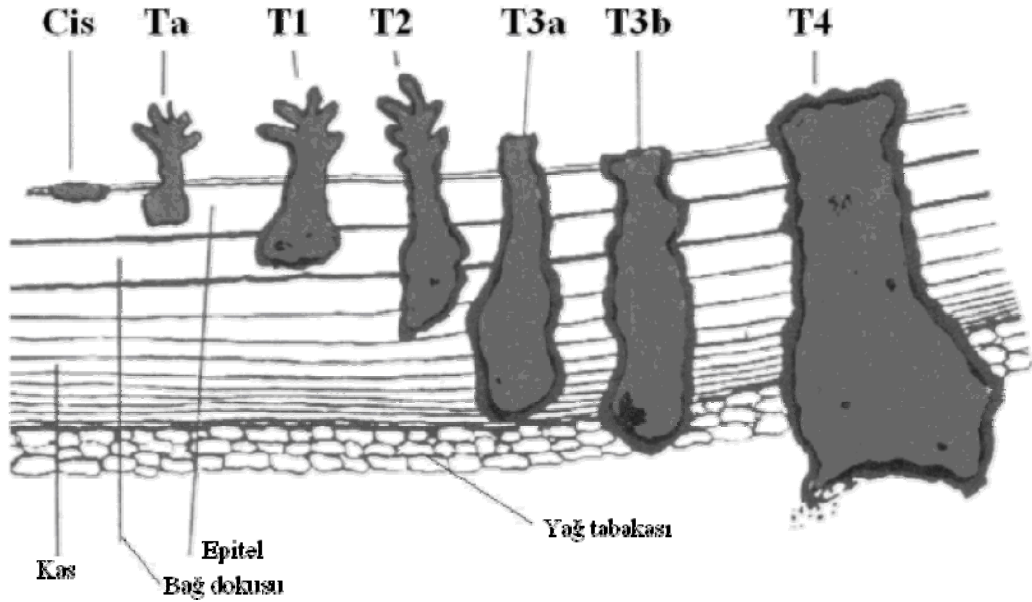
Kas invazyonu gelişen hastalarda evre ilerlediği için ideal tedavi olarak radikal cerrahi gündeme gelmektedir.

Mesane kanseri, erkeklerde kadınlara göre 2,5 kat daha fazla görülür ve ortalama görülme yaşı erkeklerde 69, kadınlarda ise 71 olarak saptanmıştır (23, 54).

Mesane tümörlerinin % 90' ından fazlası, en iç tabaka olan mukozayı oluşturan ve değişici epitel adı verilen özel hücre yapısındaki atipik değişikliklerden kaynaklanır. Bu tip tümörler erken safhalarda bu tabakada sınırlı kalırlar ve değişici epitel hücreli kanserler (transizyonel hücreli karsinoma: THK) olarak adlandırılırlar. Bunların dışında mesanenin diğer tabakalarından kaynağını alan farklı tümörler de nadir olmakla birlikte gelişebilir (14). Bu lezyonlar genellikle papiller özellik gösterir ve mesane içerisinde yer işgal eden lezyonlardır.

Daha az oranda ise ülsere lezyonlar şekilde olabilirler. Ülserleşmiş yapıda olan tümörler daha agresif olma eğilimindedir.

Kanser, belli bir süre sadece mesane lümenine doğru ilerleme gösterir. Bir sonraki aşama, kanserin dışarı doğru, mesanenin kas tabakasına yayılmasıdır. Aynı zamanda, kanser lümeninde daha da büyür ve çevreye doğru yayılır. İlerleyen kanser, mesane duvarını aşarak peritonu veya mesanenin dış tarafındaki diğer dokuları invaze edebilir. Kanser mukozada sınırlı olduğunda, uzak lenf düğümlerine veya daha öteye metastaz, beklenen bir durum değildir. Ancak mesane duvarı kası tutulduğunda, kanserlerin yaklaşık % 13'ü de lenf düğümlerine metastaz yapmış olur.



Şekil 5: TNM sınıflandırması (69)

Mesane tümörlerinde tedavinin şeklini belirleyen en önemli faktör, tümörün derinliğinin hangi tabakaya kadar ulaştığıdır. Sayısı ve büyüklüğü ne olursa olsun tümör ya da tümörlerin derinliği mukoza tabakasını geçmiyorsa bu tip tümörler yüzeysel tümörler olarak sınıflandırılırlar. Tedavileri de genelde mesanenin yerinde bırakılıp tümörün kapalı yolla çıkartılması (tümör rezeksiyonu) şeklindedir. Nüks oranı % 40–80 arasında değişmektedir. Bu tip tümörler tamamen çıkartılsa da zaman içerisinde mesanenin farklı bölgelerinden nüks görülebileceği için mesane içine koruyucu ilaç tedavileri uygulanabilir. Tümör ya da tümörlerin sayısı ve büyüklüğü ne olursa olsun, derinliği mukoza tabakasını geçmiş ve kas dokusunu invaze etmişse bunlar derin ya da invaziv tümörler olarak sınıflandırılırlar. Tedavide mesanenin ve çevresindeki prostat / rahim gibi komşu organ ve dokuların çıkartılması gerekir. Aksi takdirde tümör hücreleri çok kısa sürede kan ve lenf damarları yolu ile başka organlara yayılırlar. Bu tip tümörlerde başka bir tedavi seçeneği de radyoterapidir. Bu tedavilere ek olarak invaziv ve metastatik mesane tümörlerinde kemoterapi uygulamaları da gerekebilir.

1.2.2.1.1. Tümör Derecesi

Mesane kanseri için yaygın kabul gören tek bir dereceleme sistemi yoktur. Genelde kullanılan sistemler, tümör hücresindeki anaplazi derecesine göre düzenlenmiştir (46, 57). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan histopatolojik sınıflandırma (Tablo 1) dünyanın hemen her tarafında kullanılmaktadır.

Tablo 1: WHO tarafından yapılan histopatolojik sınıflandırma

PTNM patoloji sınıflandırması

G	Histopatolojik evre belirlemesi
Gx	Farklılaşma evresi değerlendirilemiyor
G1	İyi farklılaşmış
G2	Orta derecede farklılaşmış
G3-4	İyi farklılaşmamış / farklılaşmamış

Tablo 2: Mesane Tümörlerinin TNM sınıflandırılması (3)

Primer Tümör

Tx: Bilinmeyen primer tümör

To: Saptanamayan primer tümör

Ta: İnvaziv olmayan papiller karsinom

Tis: Karsinoma in situ

T1: Subepitelyal bağ dokusuna invaze tümör

T2: Kasa invaze tümör

T2a: Tümör yüzeysel kas dokusuna invaze (iç yarı)

T2b: Tümör derin kas dokusuna invaze (dış yarı)

T3: Tümör perivezikal dokuya invaze

T3a: Mikroskobik

T3b: Makroskobik (ekstravezikal kitle)

T4: Tümör komşu organlara invaze

T4a: Tümör prostat, uterus veya vajinaya invaze

T4b: Tümör pelvis ve / veya karın duvarına invaze

Bölgesel Lenf Nodları (N)

Nx: Bilinmeyen lenf nodu metastazı

No: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Tek bir lenf nodunda 2 cm' den küçük metastaz

N2: Tek bir lenf nodunda 2-5 cm arasında ya da birden fazla lenf nodunda <5 cm olmayan metastaz

N3: 5 cm< lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz

Mx: Bilinmeyen uzak metastaz

Mo: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

Tümör derecesi ve evresi arasında belirgin bir ilişki bulunmaktadır. İyi ve orta diferansiye tümörlerin çoğu yüzeysel iken kötü diferansiye tümörler invaziv olma eğilimindedir (49). Sitogenetik ve moleküler verilere göre düşük dereceli (iyi ve orta diferansiye) tümörlerle, yüksek dereceli (kötü diferansiye) tümörlerin orijini farklıdır. Düşük dereceli tümörler kromozom 9' da bir ya da daha fazla tümör süpresor gen kaybederken yüksek dereceli tümörlerde p53, prb ve p16 kromozom anormallikleri vardır (43,57).

WHO ve Uluslararası Ürolojik Patoloji Topluluğu (ISUP) 1988 yılında yapılan konferansta genel kabul görececek bir sınıflandırma sistemi geliştiril-

mesini amaçlamış ve bu konferans sonrasında bu tümörlerin papiller üroteliyal neoplazmlar olarak sınıflanmasına karar verilmiştir (17).

Papilloma (derece 0); normal mesane mukozası ile çevrili fibrovasküler çekirdekli papiller lezyondur (10, 65). Üroteliyal tümörlerden farklı olarak histolojik anormallik yoktur ve endoskopik rezeksiyondan sonra tekrarlamaz. Tek lezyon olarak saptandığında benign kabul edilir ancak sıklıkla yüksek dereceli üroteliyal tümörlerle birlikte görüldüğü unutulmamalıdır (10).

İyi diferansiye (derece 1) tümörler; mukozaya sınırlı olduklarında WHO ve ISUP tarafından düşük malignite potansiyeli papiller üroteliyal tümörler olarak tanımlanmışlardır (17).

Bununla birlikte, sıklıkla tekrarlamakta hatta nüksler daha yüksek histolojik derece ve evrede olabilmektedir (10). Yüksek dereceli tümörlerle birlikte bulunabilmesi ve derece 2 tümörlerle benzer prognostik özellikler göstermesi nedeniyle dikkatle izlenmelidir.

Orta derece diferansiye tümörler (derece 2); WHO ve ISUP tarafından düşük dereceli üroteliyal karsinom olarak tanımlanmıştır.

Kötü diferansiye tümörler (derece 3); WHO ve ISUP tarafından yüksek dereceli üroteliyal karsinom olarak tanımlanmıştır. Düşük dereceli lezyonlara göre çok fazla progresyon riski vardır, ayrıca eş zamanlı invaziv hastalık görülme riski de fazladır.

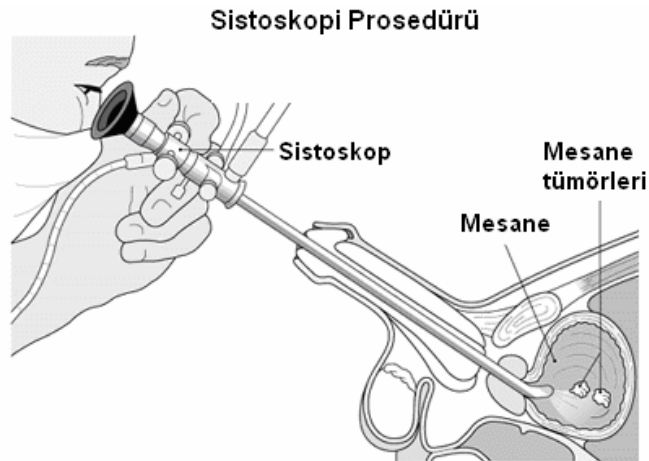
1.2.2.1.2. Karsinoma In Situ

Mesane karsinoma in situ (Cis) ilk defa Melikow tarafından tanımlanmıştır (56). Histolojik olarak ürotelyuma sınırlı kötü diferansiye transizyonel hücreli karsinom hücrelerini içerir. Sitogenetik, moleküler genetik ve immunohistolojik çalışmalarda Cis ve kas invaziv mesane kanserinde p53 gen mutasyonu ya da delesyonu olduğu gösterilmiştir (18, 43, 68).

1.2.2.1.3. Mesane Tümörü Tanı Yöntemleri

1.2.2.1.3.1. Tanısal Sistoskopi

Mesane tümörü tanısında en önemli yöntem sistoskopidir. Girişimin hasta konforu ve invaziv uygulamalara olanak sağlaması açısından anestezi altında yapılması tercih edilir (Şekil 6).



Şekil 6: Tanısal Sistoskopi

1.2.2.1.3.2. İntrevenöz Ürografi

İntrevenöz ürografi (IVU); idrar yollarının temel radyolojik incelemesidir ve esas amacı; böbreklerin fonksiyonunu, yapısını, şeklini değerlendirmektir. İntrevenöz olarak enjekte edildiğinde, çoğu kontrast ajan hızla böbrekler tarafından atılır, böylece enjeksiyon sonrasında alınan seri radyografiler idrar yollarını gösterecektir. Papiller tümöral oluşumlar IVU' de dolma defektleri şeklinde kendilerini gösterir.

1.2.2.1.3.3. Ultrasonografi

Ultrasonografi; yüksek frekanstaki ses dalgalarının değişik yoğunluktaki dokulardan farklı şekilde yansımaları prensibine dayanan bir inceleme şeklidir. Non-invaziv bir yöntem olan abdominal ultrasonografi, üriner sistemin ve mesanenin değerlendirilmesi için kullanılabilir. Ultrasonografik bakıda 0,5 cm çapından büyük mesane tümörleri tanımlanabilir. İnvaziv bir yöntem olan transüretal ultrasonografi kas invazyonu değerlendirmede hassas bir yöntemdir ve mesane tümörlerinin evrelendirilmesi için kullanılabilir. Abdominal ve transüretal ultrasonografinin ise mesane kanseri tanı ve evrelemesindeki değeri kısıtlıdır.

1.2.2.1.3.4. Bilgisayarlı Tomografi

Bilgisayarlı tomografi (BT); X-ışını kullanılarak vücudun incelenen bölgesinin kesitsel görüntüsünü oluşturmaya yönelik radyolojik teşhis yöntemidir. Cihaz bir bilgisayara bağlıdır. X-ışını kaynağı incelenecek hasta etrafında 360 derecelik bir dönüş hareketi gerçekleştirirken "gantry" (cihazın açıklığı) boyunca dizilmiş dedektörler tarafından X-ışını demetinin vücudu geçen kıs-

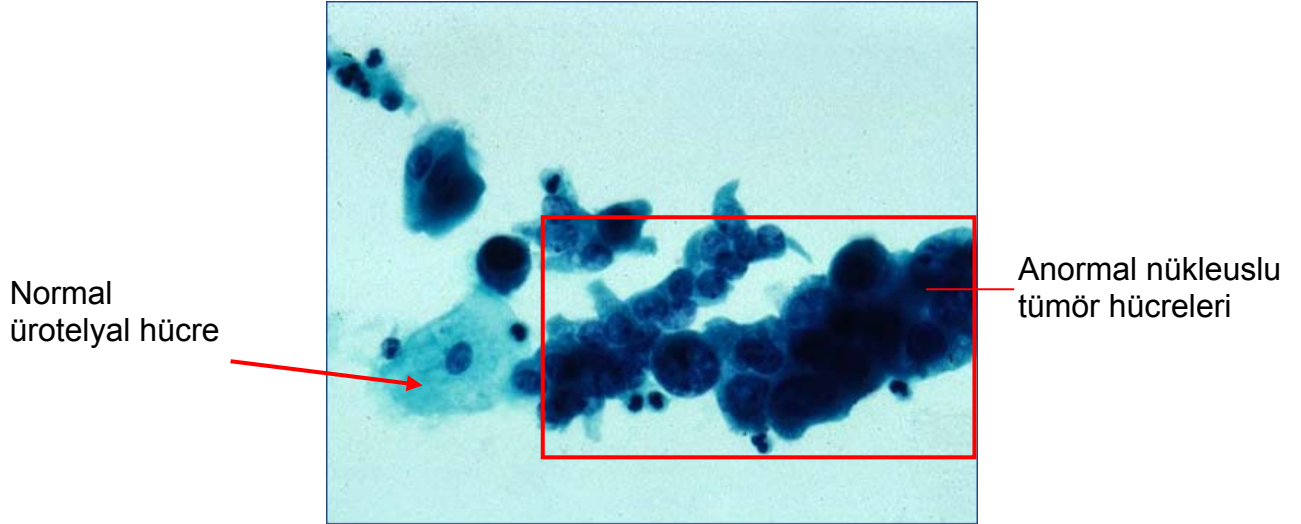
mı saptanarak elde edilen veriler bir bilgisayar tarafından işlenir. Sonuçta dokuların birbiri ardısına kesitsel görüntüleri oluşturulur. Oluşturulan görüntüler bilgisayar ekranından izlenebilir. Özellikle organların, yumuşak doku ve kemiklerin şekil ve yerleşimini oldukça net gösterir. Ayrıca BT incelemeleri hastalıkların ayırıcı tanısını yaparak tedavi yöntemlerini değiştirmektedir. Erken ve doğru şekilde birçok hastalığın teşhisini sağlamaktadır.

1.2.2.1.3.5. Manyetik Rezonans Görüntüleme

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG); iyonizan olmayan radyo frekansı kullanan bir görüntüleme yöntemidir. Bu yöntemle, bir manyetik alan içerisine yerleştirilen vücudun herhangi bir düzleminin görüntüsü elde edilir. Yöntem, görüntü elde etmek için hücre sıvısı ve lipidler içerisindeki hidrojen çekirdeğinin yoğunluğunun dağılımını ve çekirdeğin hareketleri ile ilgili parametreleri kullanır. MRG, abdominal ve pelvik anatomisinin daha iyi belirlenmesini, lenf nodlarının damarlardan daha iyi ayrılmasını, tümör dokusunun mesane tabakalarından daha iyi görüntülenmesini sağlar.

1.2.2.1.3.6. İdrar Sitolojisi

İdrar Sitolojisi, standart non-invaziv, ve tümöre özgü bir belirleyicidir. Malign hücreler mesane yıkama suyu veya miksiyon idrarının mikroskopik değerlendirilmesiyle saptanabilir. Papanicolaou ve Marshal tarafından 1945 yılında tanımlanmasından bu yana, idrar sitolojisi mesane kanseri tarama ve takibinde kullanılmaktadır (60).



Şekil 7: İdrar sitolojisi (34)

Sitolojinin özgünlüğü % 90–95 arasındadır, ancak yüksek dereceli tümörler ve karsinoma in situ dışında duyarlılığı düşüktür. Mesane kanseri için izlenen hastalarda pozitif idrar sitolojisinin toplam duyarlılığı yaklaşık % 40-60 oranındadır (24, 66). Yüksek dereceli tümörü olan olgularda ise üriner sitolojinin duyarlılığı % 90 düzeyine ulaşır (7, 44, 50, 63, 72, 75).

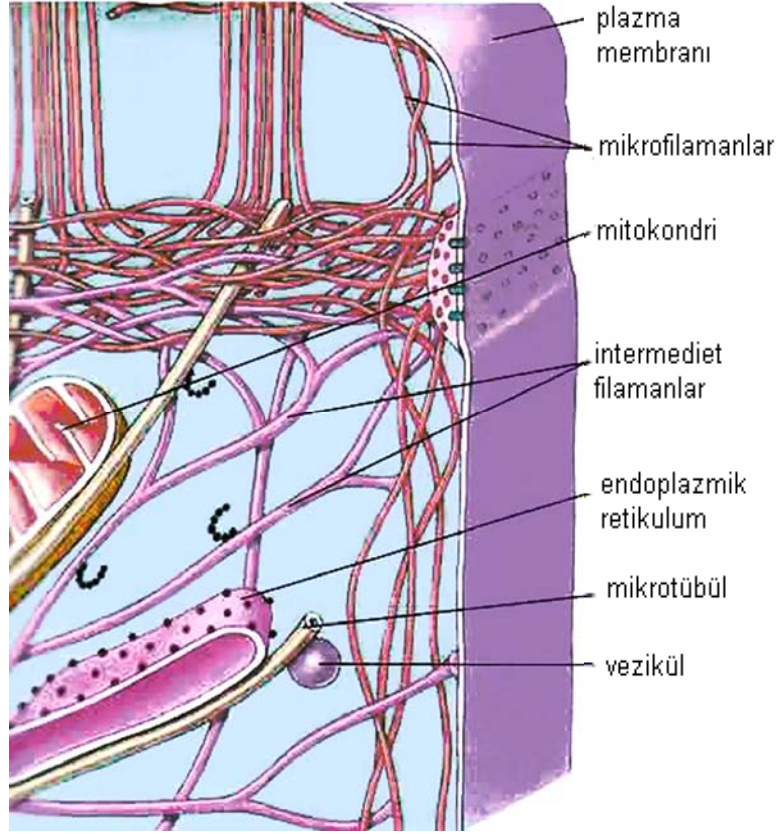
Sitoloji tek başına tanısal test olarak kullanıldığında, sadece % 25 olguda doğru tanı konulabilir (20, 51). Bu nedenle negatif sitoloji bulgularına dayanarak mesanede değişici epitelyuma ait bir tümörün bulunmadığı söylenebilir. Ancak sitolojinin pozitif olması sistoskopi normal olsa bile transizyonel hücreli karsinomu için yüksek prediktif değer taşımaktadır. Sistoskopide herhangi bir lezyon görülmeden çok önce idrarda malign hücreler bulunabilmektedir (59).

1.2.3. Proteinler

Proteinler ribozomlarda sentezlenirler. Doğada bulunan 300' den fazla aminoasitten 20 tanesinin birbirine peptit bağlarıyla bağlanarak oluşturduğu dev yapılı moleküllerdir. Bu moleküllerin ağırlığı Dalton cinsinden ölçülmektedir (1 Dalton=1 Hidrojen atomu ağırlığı). Bir protein molekülü birkaç bin ile birkaç milyon Dalton ağırlığında olabilmektedir. Proteinler, yapı ve fonksiyon maddeleri olarak, biyokimyasal açıdan çok önemli bir yere sahiptirler. Canlı bünyesinde en fazla işleve sahip moleküllerdir. Enzimlerin ve polipeptit hormonların yapısında bulunarak vücut metabolizmasının düzenlenmesi, kastaki kontraktıl proteinler sayesinde hareketin sağlanması, kemikteki kollojen isimli proteinlerin yapıyı güçlendirmesi, dolaşımında hemoglobin ve plazma albümini gibi proteinlerin hayat için gerekli molekülleri taşıması, immunoglobulinlerin enfeksiyöz bakteri ve virüsleri yok etmesi gibi görevleri vardır.

1.2.4. Hücre İskeleti

Hücre iskeletini mikrotübüller, mikrofilamentler ve ara filamentler oluşturur. Hücrelerin şekillenmesinde, organellerin hücre içi konumlarının belirlenmesinde, molekül ya da organellerin hücre içinde taşınmasında rol oynarlar. Hücre iskeleti unsurları organeller arasında bir çatı oluştururlar ve organellerin çevresini bir ağ gibi kuşatırlar (Şekil 8).



Şekil 8: Hücre iskeleti elemanları (36)

1.2.4.1. Mikrotübüller

25 nm çapında α ve β tubulin monomerlerinden oluşan silindirik yapılar-
dır. α ve β monomerleri heterodimer şeklinde birleşerek protofilamentleri
oluşturur. Genellikle 13 protofilament, sarmal şekilde tubulinlerin bağlanması
sonucu mikrotübülleri oluştururlar. α tubulinler, GTP bağlar ancak parçala-
yamaz. β tubulinler ise GTP ya da GDP'yi bağlar ve belirli koşullarda GTP'yi
GDP + Pi şeklinde parçalar.

Mikrotübüller sil ve flajel yapısında, çevresel dizilmiş 9 mikrotübül çifti,
ortada ise iki tek mikrotübül şeklinde bulunur. Çift mikrotübüller birbirlerine
dinein (ATPaz) kollar ile dokunarak eş zamanlı sil ya da kamçı hareketini

oluştururlar. Bazal cisimcik ve sentriol yapısı ise sadece çevresel dizilen, üçlü 9 mikrotübülden oluşmaktadır. Mikrotübüller dinamiktir; sitozolde devamlı olarak oluşturulur ya da çözülürler. Sitozoldeki kararlılığı ise mikrotübüllere bağlanan bazı proteinlerle sağlanır. Bu proteinler kinazlar ile fosforile edildiklerinde mikrotübüllere bağlanamazlar ve mikrotübülü oluşturan tubulin altbirimleri çözülür.

Mikrotübüller, hücre şekillenmesi ve hücrelerde mekanik destek, molekül ve organel taşınması ve lokalizasyonunda, pseudopod-hücre hareketinde, sil ve spermium hareketinde, mitoz-mayoz hücre bölünmesi sırasında kromozomların kutuplara hareketinde (mitotik içcikler) işlevseldir. Mikrotübüllerde motor hareketler, iki asıl protein; kinezin ve sitozolik dineinler ile sağlanır. Kinezinler, yüklerini (granül ya da organelleri), protofilamentlerin daha çabuk uzayan (+) ucuna doğru, dineinler ise daha yavaş uzayan (-) ucuna doğru gönderir (1).

1.2.4.2. Aktinler (Mikroflamentler)

Aktin protein monomerlerinden oluşan ve çapı 8 nm kadar olan en ince filament yapılarıdır. Plazma zarının hemen altında bulunarak mekanik gerilmelere direnç oluştururlar. Sitoplazma bölünmesinde kasılma halkası oluşumunu sağlar. Kas hücrelerinde kasılmayı sağlarlar ve sitoplazmada organel hareketlerine eşlik ederler (1).

1.2.4.3. Ara (İntermediate) Filamentler

Hücre çekirdeğinin iç zarının hemen altında yer alırlar. Mikrotübüller ve mikrofilamanlara benzer şekilde olup 8–10 nm çapındadırlar. İntermediate

filamentleri oluşturan proteinler birden fazladır. Örneğin mezenşimal hücrelerde vimentin, düz kas hücrelerinde desmin, nöroglial hücrelerde gliyal proteinler, nöronlarda nörofilamentler ve epitel hücrelerinde sitokeratinler bulunur. Bu çeşitlilik kanser araştırmalarında önemlidir (1). Intermediate filamentlerin buldukları yere göre çeşitli görevleri vardır. Örneğin epitel hücrelerinde başlıca görevleri mekanik sağlamlılık kazandırmak, su ve ısı kaybını önlemektir (2, 12, 13, 31, 42, 53, 55, 62).

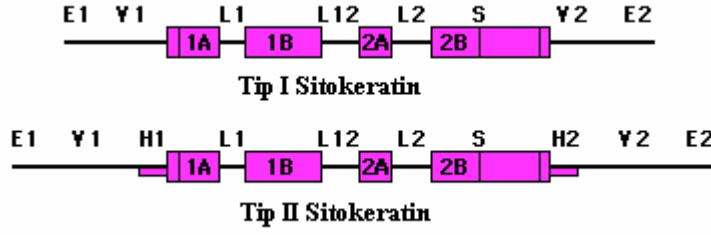
1.2.4.3.1. Sitokeratinler

Keratinler epitel hücrelerin yapısal bütünlüğünden sorumlu intermediate filament proteinlerdir ve sitokeratinlere ve saç keratinlerine ayrılırlar.

Sitokeratinler epitel hücrelerinin sitoskelet bileşenleridir ve epiteliyal keratin / yumuşak keratin ve sert keratin olarak anılırlar (48).

Sitokeratinler iki gruba ayrılırlar: Tip I sitokeratinler asidik proteinlerden oluşur ve CK9' dan CK23' e kadar olan sitokeratinleri içerirler. Tip II sitokeratinler alkalindirler ve CK1' den CK8' e kadar olan sitokeratinler bu gruba girerler (13).

Tüm sitokeratinler, 1A, 1B, 2A ve 2B gibi dört helikal segmentten meydana gelen benzer molekülleri içerirler. Ayrıca, ligand segmentleri adı verilen L1, L2 ve L12 gibi kısa non-helikal segmentlerle ayrılırlar. Temel CK' larda helikal ve değişken segmentler arasında H1 ve H2 gibi varolan segmentler bulunurken ekstremitelerde, V1 ve V2 gibi değişken segmentler bulunmaktadır [13, 35, 70, 39, (Şekil 9)].



Şekil 9: tip I ve tip II sitokeratin filamentleri. Boyalı alanlar molekülün L-segmentleri ile bağlanan sarmal parçalarını, E- ve V- segmentleri değişken bölgeleri, H-segmenti homolog bölgeleri gösteriyor. “Stutter ” bölgesi 2B’ nin oranını S ile belirler (37)

1.2.4.3.1.1. Sitokeratinlerin Spesifik Dokusal Dağılımı

Sitokeratin her bir epitelde karakteristik bir dağılıma sahiptir. Epidermiste CK5 ve CK14 bazal ekspresyona sahipken CK1 ve CK10 suprabazal ekspresyona sahiptir. Saç folikülünde bazal CK ve hiperproliferatif CK bulunur (CK6, 16 ve 17).

Sitokeratinler için dağılımın foliküler ve epidermal modellerinin üzerinde durmak mümkündür. Bu spesifik modeller sitokeratinleri epitel farklılaşmasının önemli belirteçleri olarak kullanma olanağı sağlar.

CK6 ve CK16 epidermiste, hiperproliferasyon görülen durumlarda (se-def hastalığı veya epitelial tümör) eksprese edilmektedirler, bu yüzden hiperproliferatif sitokeratin olarak da adlandırılırlar. Epidermis, interferon gamma, epitelial büyüme faktörü (EGF) ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi sitokinler tarafından ultraviyole radyasyonu ile uyarıldığında CK6’ nın deney-

sel indüksiyonu gösterilmiştir. Daha sonra ise CK19 da indüklenmekte ve CK ekspresyonunun dinamik durumu ortaya konmaktadır (5, 29).

Tablo 3: Sitokeratinlerin buldukları bölgeler ve mutasyona bağlı meydana gelen hastalıklar

Lokalizasyon	Sitokeratinler	Mutasyona bağlı hastalık
Epidermal bazal tabaka	5 ve 14	Bullosa Simpleks
Epiderminin suprabazal tabakaları	1 ve 10	Epidermolitik Hiperkeratozis
Palmoplantar suprabazal epidermis	1 ve 9	Palmoplantar Epidermolitik Hip.
Dış kök kılıfı, oral mukoza, tırnak yatağı, anneksler	6a, 6b, 16	Pakionişi konjenita
Dış kök kılıfının eksternal tabakası	19	–
Kornea	3 ve 12	Korneal Distrofi
Temal epitel	8 ve 18	Kriptogenik Siroz
Tabakalaşmış epitelin dışı	4 ve 13	White sponge nevus (Beyaz renkli lezyon)
Tırnak yatağı, anneksler	17	Pakionişi konjenita
Merkel Hücreleri	20	Steatosistoma multipleks

Önceki çalışmalarda CK 8, 13, 18 ve 19 için idrardan immün boyama ve / veya flow sitometri analizleri kullanılmış ve bunların kesin ilerlemiş THK invazyonlarıyla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır ve mesane kanseri rekürensini ortaya çıkarılmasında bazı klinik yararlar sağladığı bulunmuştur.

1.2.4.3.1.2. Sitokeratin 20

Sitokeratin 20 gastrik ve bağırsak epitelyumunda, ürothelyumda ve merkel hücrelerinde eksprese edilen tip I keratindir. Sitokeratin 20 olgun enterositlerin ve goblet hücrelerinin majör hücresel proteinidir ve özellikle gastrik ve barsak mukozasında eksprese edilirler. Aynı zamanda kolon, mide, pankreas adenokarsinomlarında eksprese edilirler ve musinöz over tümörlerinde, transizyonel hücre ve merkel hücrelerinde bulunurlar. Skuamöz hücre karsinomlarında, göğüs, akciğer ve endometriyumun adenokarsinomlarında, musinöz olmayan over tümörlerinde ve küçük hücre karsinomlarında bulunmazlar.

CK20 ekspresyonu diferansiyasyonla ilişkilidir ve süperfisiyal veya intermediate hücrelerde sınırlıdır. Mesane kanser hücrelerinde bu restriksiyon kaybolur ve CK20 ekspresyonu her katmanda görülebilir (27). CK20 immunositolojisi THK' u özellikle evre T1, derece 2 ve derece 3 tümörlerini ortaya çıkarmada standart sitolojiden daha hassastır. Non-invaziv papiller THK' da CK20 ekspresyonunun dağılımı incelenmiş ve tümör rekürensini önceden haber verdiği bulunmuştur.

İdrar örnekleri alınan mesane kanserli olgularda CK20 mRNA' nın, normal üroteliyal doku veya normal idrar örneklerine göre dikkate değer bir şekilde yüksek düzeylerde eksprese edildiği gösterilmiştir (11).

Yüksek düzeydeki displazilerde, CK20 mRNA ekspresyonunun disregülasyonu, üroteliyal tümör gelişiminin erken evrelerinde gözlenen bir olay olarak karşımıza çıkmaktadır. CK20 mRNA ekspresyonunun normal olduğu durumlarda, immunohistokimyasal yöntemlerle normal olarak farklılaşmış üroteliyal epitelyum gözlenirken, herhangi bir malign transformasyona rastlanmamaktadır.

1.2.5. Nükleik Asit Amplifikasyonu

1.2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu bir çeşit *in vitro* klonlamadır. Her PCR, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur. Bir PCR döngüsü sırasıyla, deoksiribonükleik asidin (DNA) iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (Denatürasyon); sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA' ya bağlanması (Annealing) ve zincirin yeni çift zincirli DNA' lar oluşturacak şekilde uzaması (Polimerizasyon) aşamalarından meydana gelir. Bu aşamaların her biri sırasıyla 94°C–98°C; 37°C–65°C; 72°C sıcaklıklarda gerçekleştirilir.

PCR tekniği, tek ve çift sarmallı DNA, ya da RNA için kullanılabilir. PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Reaksiyon başlatılmadan önce istenen sayıda döngünün tekrarlanması sağlanabilir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik

oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR' in en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde vardır. Bunlar DNA örneği, çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer, deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP), yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı, genelde $MgCl_2$ ' dır (64).

1.2.4.1.1. Real Time PCR

Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PCR) nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesi ile kısa sürede kantitatif sonuç verebilen PCR yöntemidir.

Yalnızca çift zincirli DNA' ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Sybr Green I) kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA' nın çift sarmal hale gelmesi ile DNA' ya bağlanan "sybr green" miktarı ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir (21, 25, 30)

PCR amplifikasyonunun ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltılarak, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca "sybr green" boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampikonun Tm derecesi saptanabilmektedir. Klinik örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme

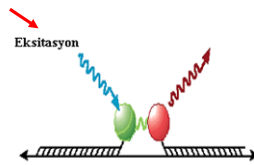
alınan pozitif kontrolün Tm derecesi ile karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya yanlış olduğuna karar verilmektedir.

Diğer bir uygulama şekli hedefe özgül problemler kullanılmasıdır. Burada problemlerle testin özgüllüğü artırılmıştır. Problemlerden biri 3' ucundan floresans boya -donör boya- florescein ile işaretli, diğeri 5' ucundan alıcı boya-akseptör boya-LightCycler Red 640 ile işaretlenmiştir. Problemler hedef ampliconlar üzerinde birbirine 1–5 nükleotit uzaklıkta yere bağlanırlar ve işaretli uçlar yan yana gelirler. İki boyanın yan yana gelmesi ile açığa çıkan enerji ikinci problem üzerindeki alıcı boyayı etkiler ve "Fluorescence Resonance Energy Transfer, (FRET)" olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine, yani PCR siklusu süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artar [32, 52, 58, Şekil 10].

Light Cycler- Red 640' ın floresansı kalıp DNA' ya hibridizasyondan sonra yansıtılan floresan-Light Cycler cihazı ile ölçülür.

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

- Donör fluorofor uygun dalga boyu ile eksite edilir.
- Donör enerjisi akseptör fluorofora aktarılır.
- Akseptör fluorofor daha uzun dalga boyunda emisyon yapar.



Şekil 10: FRET yöntemi

1.2.5.2. Real –Time Online Revers Transkripsiyon PCR

Real –Time Online Reverse Transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) mRNA deteksiyonu için en duyarlı tekniktir ve kantitasyon eş zamanlı yapılmaktadır. (RT-PCR) bir RNA molekülünün belirli bir parçasını amplifiye etmek amacı ile kullanılır. RNA ipliği ilk önce komplementer DNA (cDNA)' ya transkribe edilir. Öncelikle PCR kullanılarak DNA sonuçlarının amplifikasyonunu takiben, RNA zincirinin ya DNA komplementine ya da cDNA' ya çevrimi gerçekleşir.

RT-PCR' ın ilk basamağında cDNA dNTP' ler ve RNA bağımlı DNA polimeraz; revers transkriptaz kullanılarak bir mRNA' dan oluşturulur. Revers transkripsiyon reaksiyonu tamamlandıktan ve cDNA orjinal tek iplikli mRNA' dan oluşturulduktan sonra standart PCR başlar. Termostabil bir DNA polimeraz ve “forward” ve “reverse” DNA primerleri eklenir. DNA primerlerinin cDNA' ya dizi spesifik bağlanmaları için reaksiyon ısıtılır. Daha fazla ısıtma işlemi termostabil DNA polimerazın primer cDNA' dan çift zincirli DNA yapmasını sağlar. İki DNA zincirini ayırmak için reaksiyon ısı yükseltilir. Reaksiyon, primerlerin tekrar bağlanmaları için soğutulur ve döngü tekrar eder. Yaklaşık 45 döngü sonunda ilgili dizinin milyon tane kopyası oluşturulur. Orjinal RNA kalıbı RNAaz ile degrade edilir, saf cDNA ayrılır.

1.2.5.3. Ribonükleik Asit (RNA)

RNA' lar ribonükleotitlerin birbirlerine bağlanması ile meydana gelen tek zincirli nükleik asitlerdir.

RNA'da, şeker olarak riboz şekeri, baz olarak Adenin, Urasil, Guanin ve Sitozin bazları bulunur. Kimi özel durumlar dışında RNA tek dallıdır. RNA' da riboz şekerinin 2' pozisyonunda –OH grubu bulunur.

Tüm RNA' lar tek zincirli özel bir baz dizisine, karakteristik bir molekül ağırlığına sahiptirler ve belirli bir biyolojik fonksiyonu yerine getirmektedirler.

1.2.5.3.1. Mesajcı RNA (mRNA)

DNA' da saklı bulunan genetik bilginin, protein yapısına aktarılmasında kalıplık görevi yapan aracı bir moleküldür. mRNA ribozomlara tutunur ve DNA' dan aldığı genetik şifreye göre sentezlenecek proteinin amino asit sırasını tayin etmektedir. Her mRNA molekülü, DNA üzerinde bulunan ve gen adı verilen belirli bir bölge ile komplementerlik göstermektedir. Her bir mRNA molekülünden bir veya daha fazla polipeptid zinciri sentezlenmektedir.

1.2.5.3.2. Transfer RNA (tRNA)

Ribonukleotidlerin polimerize olması ile meydana gelmiş, çok kıvrımlı ve tek zincirli yapıya sahip bir RNA çeşididir. tRNA' lar yonca yaprağına benzeyen üç boyutlu yapılarında yer yer çift sarmallı bir durum göstermektedir. Doğada yer alan 20 aminoasitin her biri için en az bir tRNA molekülü bulunmaktadır. tRNA' lar adaptörlük görevi yaparak bir uçlarına bağladıkları amino asiti, ribozoma tutunmuş mRNA' nın taşıdığı kodona göre polipeptid zincirine dizerler. tRNA' lar üç bazdan meydana gelen antikodon adı verilen uçları ile yine mRNA üzerinde bulunan ve kodon adı verilen bölgeye geçici bağlanarak aminoasitlerin mRNA üzerindeki şifreye göre doğru bir şekilde dizilmelerini temin etmektedir.

1.2.5.3.3. Ribozomal RNA (rRNA)

Ribozomların ana yapısal elementi olup ribozom ağırlığının yaklaşık olarak % 65' ini teşkil ederler. Prokaryotik hücrelerde 3 çeşit, ökaryotik hücrelerde ise 4 çeşit rRNA bulunmaktadır. Ribozomal RNA' lar ribozomların yapı ve fonksiyonlarında önemli roller oynamaktadır. rRNA bütün canlılarda korunmuş olduğu için, nükleotid dizilimleri incelenerek canlılar arasındaki evrimsel ilişkiler hesaplanabilir (16)

1.2.5.3.4. Heterojen nüklear RNA (hnRNA)

Ökaryotik hücrelerde sentezlenen ve prosese uğramamış öncül mRNA molekülleridir.

1.2.5.3.5. Küçük nüklear (snRNA)

Öncül mRNA moleküllerinin prosese uğraması esnasında ortaya çıkmaktadırlar.

1.2.5.3.6. Küçük nükleolar RNA (snoRNA)

Ribozomal RNA' ların ve diğer RNA genlerinin kimyasal modifikasyonlarına rehberlik eden küçük RNA moleküllerinin bir sınıfıdır.

1.2.5.3.7. Rehber RNA (gRNA)

RNA düzenlenmesinde fonksiyon gören RNA genleridir.

1.2.5.3.8. MikroRNA (miRNA)

miRNA' lar DNA' dan transkribe edilen fakat proteine çevrilmeyen RNA genleridir.

1.2.5.3.9. Efference RNA (eRNA)

Genlerin intron dizilerinden veya kodlanmayan DNA' dan elde edilir.

1.2.5.3.10. Sinyal tanıyan partikül (SRP)

Hücrelerin sitoplazmalarında meydana gelen RNA-protein kompleksidir.

1.2.5.3.11. Transfer-mesajcı RNA (tmRNA)

tRNA benzeri ve mRNA benzeri bölgeleri ile kompleks bir yapıya sahiptir. Sadece bakterilerde bulunur.

1.2.5.3.12. Small interfering RNA (siRNA)

Çeşitli roller oynayan 20-25 nükleotit uzunluğundaki RNA moleküllerinin bir sınıfıdır.

siRNA, RNA yolağında rol oynar ve antiviral mekanizma olarak veya bir genomun kromatin yapısı olarak RNA interference (RNAi) ile ilgili yollarda da görevlidir (26).

1.2.5.3.13. Kodlanmayan RNA (ncRNA)

Bir proteine çevrilmeden fonksiyon gören herhangi bir RNA molekülüdür. Genel bir sinonimi bakterilerdeki küçük RNA (sRNA)' dır.

1.2.6. Komplementer DNA (cDNA)

RNA molekülünden ters transkriptaz (revers transkriptaz) enzimi ile DNA kopyasının sentezi sonucu elde edilir. Normalde polimeraz enzimleri (DNA polimeraz I, taq polimeraz, vb.) DNA' yı kalıp olarak kullanıp RNA sentezlerken, revers transkriptaz enzimi bunların tersine RNA' yı kalıp olarak kullanıp cDNA sentezlerler. Tersine bir transkripsiyon olduğu için buna revers transkripsiyon denir. Burada sentez edilen DNA, kopyalanan RNA' ya tamamlayıcı olduğu için komplementer DNA olarak adlandırılmaktadır.

1.2.7. Kalibratör RNA

Kalibratör RNA (pozitif kontrol), CK20 mRNA eksprese eden immortalize hücre hatlarından purifiye edilmiş az bir miktar stabilize total RNA içerir. HT29 kolorektal karsinom hücre hattından elde edilmiş 10 ng/µl RNA' dır. Bu, her RT-PCR sırasında eklenmelidir.

1.2.7.1. HT-29 hücre hatının Özellikleri

Organizma: *Homo sapiens*

Kaynak: Kolon, kolorektal karsinom

Hücresel ürünler: IgA bileşeni, karsinoembriyonik antijen (CEA); transforming büyüme faktörü beta bağlayıcı protein; musin

İzolasyon tarihi: 1964. Primer bir tümörden J. Fogh tarafından eksplant kültür metodu uygulanarak izole edilmiştir.

Aplikasyonları: Transfeksiyon konukçu

Reseptörleri: Urokinaz reseptör (u-PAR); vitamin D (orta ekspresyon)
insan adrenerjik alfa2A insan adrenerjik alfa2A urokinaz reseptör(u-PAR)
vitamin D (orta ekspresyon)

Virüs duyarlılığı: HIV, LAV

Onkogen: myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -

Antijen ekspresyonu: Kan tipi A; Rh+; HLA A1, A3, B12, B17, Cw5

DNA profili: Amelogenin: X, CSF1PO: 11,12, D13S317: 11,12,
D16S539: 11,12, D5S818: 11,12, D7S820: 10, THO1: 6,9, TPOX: 8,9, vWA:
17,19

Sitogenetik analiz: Modal sayısı= 71; sıra = 68 – 72. Genelde her kro-
mozomda tek kopya, çoğu metafazda 17 marker kromozomu bulunur.

Markır isimleri: M1p-(=t(3p-;?), t(7q;?), t(10q;?), i(13q), 19q+a; M6,
?t(8q;9q-), ?Xp, M9, 6q+, t(13;?)a, t(13;?)b, 19q+b, M14, M15, 15p+, ve Xq-.
Kromozom 13 nullizomik ve kromozom 8 ve 14 genelde monozomik. QM
band analizi ile Y kromozomu bulunmamıştır.

İzoenzimleri: AK-1, 1; ES-D, 1; G6PD, B; GLO-I, 1-2; Me-2, 1; PGM1,
1-2; PGM3, 1-2

Yaş: 44

Cinsiyet: Kadın

İrk: Beyaz

1.2.8. Negatif Kontrol

Negatif kontrol hazırlamak için kalıp RNA / cDNA yerine serbest nükleaz su kullanılır. Reaktifleri kontaminasyon açısından kontrol amaçlı olarak kullanılır.

1.2.9. CK20 Ekspresyonunun Kantifikasyonun Standardize Edilmesi

Relatif kantifikasyon; kantifikasyonu potansiyel olarak etkileyen üç önemli kontrolü birleştirerek çoğalma özelliğini maksimize eder.

İlk unsur housekeeping-gen olan porfobilinojen deaminazın (PBGD) kantitasyonunun hesaplara eklenmesidir. Bu, RNA yüklenmesi ve doğruluğu için bir PCR kontrolü ve RNA miktarı hakkında bilgi sağlar.

Bu durumda, büyük oranda standart eğri kopya sayıları ve RNA yükleme miktarlarının spektrofotometrik değerlendirilmesi gibi absolut kopya sayısı kantifikasyon metotlarından daha uygun bir temsil sağlanmaktadır.

İkinci unsur her RT-PCR çalışması ve her bir örnek için CK20' nin PBGD' ye oranı ile birlikte kalibratörün hesaplara eklenmesidir. Kalibratör oranının eklenmesi karşılaştırma ve standardizasyon için bir referans sunar ve PCR çalışma varyasyonlarını ayarlama yardımcı olur.

Üçüncü unsur her hesaplamada CK20 ve PBGD için bireysel PCR reaksiyon verimi kullanımınıdır. Bu bize verimsiz PCR reaksiyonları olduğu durumlarda bir kontrol sağlar.

Üç farklı RNA konsantrasyonunu, üç revers transkripsiyon ve 6 PCR reaksiyonunu içeren 27 kez tekrarlanmış bir örnek kullanılarak, relatif kantifikasyon yazılımı ile standart eğrilerden kopya sayısı tayinleri ile karşılaştırılır. Bu seleksiyonun desteği ile relatif oranı sırasıyla % 17 ve % 22 olan, kalibre edilmiş CK20 için varyasyonların katsayıları karşılaştırılır. PCR döngüleri arasındaki standart eğri yapımındaki varyasyonlar ile daha sonraki hatalar ortaya çıkarılır. PBGD değerleri ve bir kalibratör oranı faktörlerine ayrılmadan, nanogram başına düşen RNA' daki absolut CK20 kopya sayılarının belirlenmesinde kullanılan metottaki hatalar, standart eğri yoluyla % 40 olarak belirlenmektedir.

BÖLÜM II

2.1. GEREÇ ve YÖNTEM

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Ana Bilim Dalı'nda Kasım 2005–Haziran 2006 tarihleri arasında, mesane tümörü ön tanısı / tanısı almış olan olguların sabah idrar örneklerinde CK20 mRNA ekspresyonu çalışıldı. Kontrol grubu aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan ve 43–68 yaş aralığında olan olgulardan oluşturuldu.

2.1.1. Olgu Grubu

Üroloji Ana Bilim Dalında transizyonel hücreli karsinom öntanısı veya tanısı almış 40 olgu (2 K, 38 E) çalışmaya alınmıştır. Bu olgulardan 34 tanesi transizyonel hücreli karsinom tanılı ve 6 tanesi de ön tanılıdır.

2.1.2. Kontrol Grubu

Gönüllü olan ve herhangi bir hastalığı bulunmadığı düşünülen 10 sağlıklı (4 K, 6 E) birey kontrol grubu olarak alınmıştır.

2.1.3. Etik kurul

Çalışma ve kontrol grubumuz bilgilendirilerek gönüllü olur formu imzalanmıştır. Çalışmamız için etik kurul kararı alınmıştır. (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 03.02.2006 tarihli, 06–01/29 sayılı kararı)

2.1.4. İdrar Örneğinin Toplanması

Çalışmamızda sabah idrarı örnekleri çalışıldı. Örnekler 100 ml steril idrar kaplarında toplanılmıştır. İdrar hacmi 40 ml' nin altındaki örnekler çalışmaya alınmadı. Örneklerden, bekletilmeden yarım saat içinde RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

2.1.5. İdrardan RNA izolasyonu

Kontrol ve çalışma grubu olgularının idrarlarından total RNA izolasyonu için High Pure RNA İzolasyon Kit' i (Roche Applied Science, Germany) kullanıldı. DNA kontaminasyonu, kit içindeki "RNAaz free" DNAaz I ile önlenmiştir.

2.1.6. High Pure RNA İzolasyon Kiti İçeriği

1. Liziz Bağlama Tamponu: 25 ml, [4,5 M guanidin hidroklorid, 50 mM Tris-HCl ve %30 Triton X-100 (w/v), pH 6,6 (25°C)]
2. DNAaz I, liyofilizat: (0.55 ml Elusyon tampon içerisinde resuspanse edilmiş 10 KU DNAz I.)
3. DNAaz Inkübasyon Tamponu: 10 ml, [1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl ve 10 mM MnCl₂, pH 7.0 (25°C)]
4. Yıkama Tamponu I: 33 ml, [5 M guanidin hidroklorid ve 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25°C); 20 ml etanol ilave edildikten sonra kullanılır]
5. Yıkama Tamponu II: 10 ml, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C); 40 ml etanol ilave edildikten sonra kullanılır.]
6. Elüsyon tamponu: 30 ml, serbest nükleaz, steril, bidistile su

2.1.7. İdrardan total RNA izolasyonu aşamaları

1. Tüm idrar örneği 50 ml steril falkon tüplere aktarıldıktan sonra +4°C' de 1200 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak dipte kalan hücreler 15 ml soğuk serum fizyolojik ile tekrar süspansiyon haline getirildi ve örnek tekrar aynı devir ve sürede santrifüj edildi.
3. İki kez serum fizyolojik ile yıkandı.
4. Santrifüj sonrası süpernatantı atılarak üzerine 1 ml serum fizyolojik eklendi
5. İyice resüspanse ettikten sonra 1,5 ml' lik ependorfa aktarıldı
6. Örnek 2500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatantı uzaklaştırıldı.
8. Çöken hücreler önce soğuk 200 µl serum fizyolojik, ardından da 400 µl liziz / bağlama tamponu ile resuspanse edildi.
9. Karışım bir toplama tüpünün içerisindeki filtre tüpünün içerisine aktarıldı.
10. Oda ısısında 10.000 rpm' de 15 saniye santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrasında, toplama tüpü atıldı ve filtreli kısım yeni bir toplama tüpe aktarıldı.
12. Ayrı bir 1,5 ml' lik ependorf tüpüne 90 µl DNAaz inkübasyon tamponu ve 10 µl DNAaz I pipetlendi ve sonra filtre tüpüne aktarıldı.
13. Oda ısısında 15 dakika süreyle inkübe edildi.
14. İnkübasyon sonunda filtrenin üzerine 500 µl yıkama tamponu I ilave edildi ve örnek oda ısısında 10.000 rpm' de 15 saniye santrifüj edildi.

15. Santrifüj sonrasında, toplama tüpü atıldı ve filtreli kısım yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
16. Filtre tüpü üzerine 500 µl yıkama tamponu II eklendi ve örnek oda ısısında 10.000 rpm' de 15 saniye santrifüj edildi
17. Santrifüj sonrasında, toplama tüpü atıldı ve filtreli kısım yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
18. Filtre tüpü üzerine 200 µl yıkama tamponu II eklendi ve örnek oda ısısında 13.000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi.
19. Toplama tüpü atıldı ve filtre tüpü temiz bir 1,5 ml' lik ependorf tüpünün içerisine yerleştirildi.
20. Filtre tüpü üzerine 50 µl elüsyon tamponu ilave edildi ve örnek oda ısısında 10.000 rpm' de 60 saniye santrifüj edildi.
21. Ependorf tüpünün içerisinde izole edilen total RNA içeren sıvı alındı ve 1ml' lik kriyo tüp içerisinde -86°C ' de saklandı.

2.1.8. CK 20 mRNA'nın Kantitasyonu

CK 20 mRNA'nın kantitasyonu 2 aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada izole edilen total RNA' dan cDNA elde edildi. İkinci aşamada CK20 mRNA'nın amplifikasyonu ve kantitasyonu gerçekleştirildi.

2.1.8.1. cDNA sentezi

Random Hekzamerler primer kullanılarak AMW (Amplification Microwells) revers transkriptaz enzimi ile total RNA' dan cDNA sentez edildi. Bu işlem transkripsiyon kiti (Roche Diagnostic) ile gerçekleştirildi.

Tablo 4: cDNA sentezi için PCR karışımı

İçerik	Hacim	Son konsantrasyon
Steril H ₂ O,PCR-grade	2 µl	-
Revers Transkriptaz Reaksiyon Karışımı	4 µl	1x
Random Hekzamerler p(dN) ₆	1 µl	0.1A ₂₆₀
Deoksinukleotid trifosfat (dNTP) Karışımı	2 µl	1nM
Revers Transkriptaz	1µl	25 ünite
Toplam hacim	10 µl	

Elde edilen total RNA' dan cDNA, aşağıdaki aşamalar uygulanarak sentez edildi.

Her bir örnek için tablo 4' teki karışım hazırlandı;

1. Her bir PCR tüpüne 10 µl cDNA PCR karışımı kondu.
2. Üzerine 10 µl total RNA eklendi
 - Hasta RNA
 - Kalibratör RNA [porfibilinojen deaminazı (PBGD) kodlayan mRNA house-keeping gen]
 - Negatif kontrol (su)
3. Resuspansedildi.
4. Örnekler 3000rpm' de 5 saniye santrifüj edildi.

5. Tüpler thermocycler' a yerleştirildi. Thermocycler' in zamanlanması ve sıcaklığı tablo 5' te olduğu gibi programlandı ve çalıştırıldı.

Tablo 5: Revers Transkriptaz PCR Protokolü

	ZAMAN	SICAKLIK
Hekzamer Primerlerin ve RNA' nın Annealing'i	10 dakika	25 ⁰ C
Revers Transkripsiyon	30 dakika	42 ⁰ C
RT reaksiyonunun inaktivasyonu	5 dakika	94 ⁰ C
Soğutma	–	4 ⁰ C

2.1.8.2. cDNA' dan CK20' yı kodlayan mRNA' nın Amplifikasyonu

İkinci aşamada ise, PCR ile mRNA' yı kodlayan CK20' nin 124 baz çiftlik fragmanı cDNA' dan amplifiye edildi. Primer dizileri patent yasasından dolayı bilinmemektedir.

Sırasıyla Red 640 ve ile 5' ucunda ve 3' ucunda floresan boya floresein ile işaretlenmiş bir çift spesifik hibridizasyon probu kullanıldı. Amplifikasyon, kalıp DNA'ya hibridizasyondan sonra yansıtılan floresan LightCycler cihazı ile ölçülerek tespit edildi.

Aynı örnekteki PBGD kodlayan mRNA house-keeping gen kullanıldı. House-keeping genin 151 baz çiftlik fragmanı çoğaltıldı ve RNA kontrolü ve rölatif kantitasyon için kullanıldı.

CK20 Kitinin PCR karışım içeriği Tablo 6' da verilmiştir.

Tablo 6: CK20 Kitinin PCR karışım içeriği

İçerik	Hacim	Son konsantrasyon
Steril H ₂ O, PCR-grade	14 µl	-
CK20 Deteksiyon Karışımı veya CK20 Referans Deteksiyon Karışımı	2 µl	1x
CK20 Enzim Ana Karışımı	2 µl	1x
	18 µl	-

Her bir örnek için tablo 6' teki karışım hazırlandı;

1. CK20 deteksiyon ve referans deteksiyon için ayrı ayrı PCR karışımı hazırlandı.
2. Her bir örnek için bu karışımdan 18 µl kapillere ilave edildi.
3. cDNA örneği, CK20 deteksiyon ve referans deteksiyon kapillerine eklendi
4. Örnekler 3000rpm' de 5 saniye santrifüj edildi.
5. Örnekler cihazda karosele yerleştirildi.

2.1.8.3. CK20' nin Amplifikasyon İşlemi

Program 1: Denatürasyon

Program 2: Amplifikasyon

Program 3: Soğutma

CK20' nin Amplifikasyon işlemi tablo 7, 8 ve 9' daki aşamalar uyularak gerçekleştirildi.

Tablo 7: Program 1-Denatürasyon

Parametre	Değer
Döngü	1
Analiz modu	yok
Sıcaklık Hedefleri	Segment 1
Hedef Sıcaklığı (°C)	95
İnkübasyon Süresi (s:dk: sn)	00:10:00
Sıcaklık Değişimi Oranı (°C / sn)	20
İkincil Hedef Sıcaklık (°C)	0
Basamak derecesi (°C)	0
Döngüler	0
Kazanç modu	yok

Tablo 8: Program 2-Amplifikasyon

Döngü Program Verisi	Değer		
Döngü	50		
Analiz modu	Kantifikasyon		
Sıcaklık Hedefleri	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklığı (°C)	95	60	72
İnkübasyon Süresi (s:dk: sn)	0:00:10	0:00:10	0:00:05
Sıcaklık Değişimi Oranı (°C / sn)	20.0	20.0	20.0
İkincil Hedef Sıcaklık (°C)	0	0	0
Basamak derecesi (°C)	0.0	0.0	0.0
Döngüler	0	0	0
Kazanç modu	yok	tek	yok

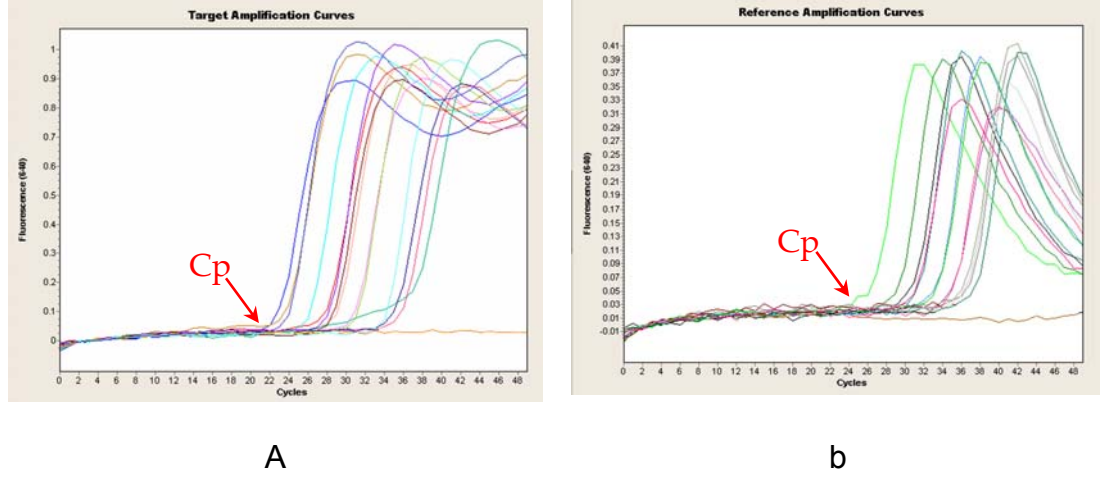
Tablo 9: Program 3-Soğutma

Döngü Program Verisi	Değer
Döngü	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık Hedefleri	Segment 1
Hedef Sıcaklığı (°C)	40
İnkübasyon Süresi (s:dk: sn)	0:00:30
Sıcaklık Değişimi Oranı (°C / sn)	20.0
İkincil Hedef Sıcaklık (°C)	0
Basamak derecesi (°C)	0.0
Döngüler	0
Kazanç modu	Yok

2.1.8.4. CK20 mRNA Ekspresyonu Kantitasyonunun Hesaplanması

CK20 mRNA ekspresyon hesaplanması PCR' in verimine ve örneğin geçiş noktasına (Cp) bağlıdır. Geçiş noktası PCR amplifikasyonunun logaritmik faza başladığı döngüdür ve oransal olarak o anki konsantrasyonu belir-

ler. Her parametreye spesifik bileşen (hedef gen ve house-keeping gen) için primerler, hibridizasyon problemleri özel PCR verimine sahiptirler ve bu da tüm kantifikasyon süresince değerlendirilir.



Şekil 11: (a) CK20 Hedef Gen, (b) Referans Gen Geçiş Noktası

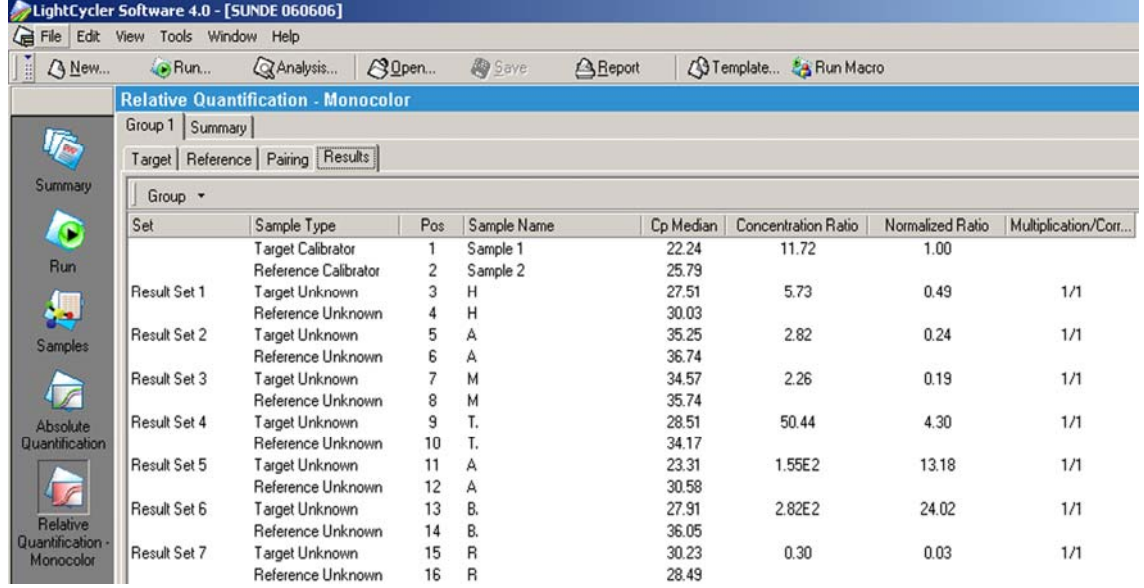
2.1.8.5. Sonuçların yorumlanması

CK20 miktarı hesaplanması; ilk olarak, hedef (T) gen kopya sayısının house-keeping gen (R) kopya sayısına (PBGD) oranı şeklinde hesaplanır.

İkinci basamakta, örnekteki hedefin house-keeping gen kopyalarına oranı (T:H), aynı reaksiyon koşullarındaki kalibratör RNA' nın T:H oranına bölünmesi ile elde edilmektedir. Bu işlem, tayin süresince hedef ve house-keeping gen arasındaki sabit farklılıkları dengeler ve PCR reaksiyonları arasında sabit bir kalibrasyon noktası koşulunu sağlar.

Kesin sonuç, kalibratördeki T:H oranıyla rölatif olarak, örnekteki T:H oranını ifade etmektedir. Kalibratör RNA daki T:H oranı 1,00 değeri olarak belirlenmiştir, bu yüzden değeri 0,1 olan bir örnek CK20 mRNA ekspresyonu

bakımından kalibratör RNA' dan 10 kat daha azdır. Tüm bu hesaplamalar kantitasyon yazılımı ile hesaplanmaktadır.



Set	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio	Multiplication/Corr...
	Target Calibrator	1	Sample 1	22.24	11.72	1.00	
	Reference Calibrator	2	Sample 2	25.79			
Result Set 1	Target Unknown	3	H	27.51	5.73	0.49	1/1
	Reference Unknown	4	H	30.03			
Result Set 2	Target Unknown	5	A	35.25	2.82	0.24	1/1
	Reference Unknown	6	A	36.74			
Result Set 3	Target Unknown	7	M	34.57	2.26	0.19	1/1
	Reference Unknown	8	M	35.74			
Result Set 4	Target Unknown	9	T	28.51	50.44	4.30	1/1
	Reference Unknown	10	T	34.17			
Result Set 5	Target Unknown	11	A	23.31	1.55E2	13.18	1/1
	Reference Unknown	12	A	30.58			
Result Set 6	Target Unknown	13	B	27.91	2.82E2	24.02	1/1
	Reference Unknown	14	B	36.05			
Result Set 7	Target Unknown	15	R	30.23	0.30	0.03	1/1
	Reference Unknown	16	R	28.49			

Şekil 12: CK20 mRNA Ekspresyonunun Geçiş Noktalarına Göre Kantitasyon Yazılımı ile Hesaplanan Rölatif Oranları

2.1.8.6.Yüksek Spesifiklik

Hem CK20 hem de PBGD için PCR deteksiyonu sadece diziye-spesifik 4 oligonükleotidin annealinginden sonra gerçekleşir. Bu iki primer ve iki hibridizasyon probu, genomik DNA' yı ortaya çıkarma olasılığını engelleyen ekzon-intron sınırlarını baştan aşağı dolaşması için dizayn edilmiştir.

2.1.8.7. Geçiş Noktasındaki PCR Ürünlerinin Kantifikasyonu

Hibridizasyon probu formatını kullanarak tüm PCR reaksiyon süreci floresan deteksiyonu ile görüntülenir. Kantifikasyonun en çok güvenilir noktası olan eksponantiyal fazın başlangıcında ölçüm imkanı sağlar.

2.1.9. İstatistiksel Değerlendirme

Olgu ve kontrol gruplarındaki ortalama, standart sapma, minimum, maksimum ve median değerleri, olgu ve kontrol grubunun birbiri ile karşılaştırıldığı *student' s t* testi ve regresyon analizi ve ROC (Receiver Operating Characteristic) analizi SPSS 13.0 for Windows istatistik paket programında gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlılık derecesi alınmıştır.

Yöntemlerin sensitivite (duyarlılık) ve spesifisitesini (özgüllük), pozitif tanısal değerini, negatif tanısal değerini ve toplam tanı değerini hesaplamada aşağıda verilen formüller kullanılmıştır:

$$\text{Sensitivite} = GP / GP + YN \times 100$$

$$\text{Spesifisite} = GN / YP + GP \times 100$$

$$\text{Pozitif tanısal değer} = \text{PTD} = GP / YN + GN \times 100$$

$$\text{Negatif tanısal değer} = \text{NTD} = GN / YN + GN \times 100$$

$$\text{Toplam tanı değeri} = \text{TTD} = GP + GN / \text{GENEL TOPLAM} \times 100$$

*GP= gerçek pozitif, GN= gerçek negatif, YP= Yalancı pozitif, YN=yalancı negatif

2.1.10. İşlemler Sırasında Kullanılan Malzemeler

Çalışmamız süresince kullanılan malzemeler tablo 10,11 ve 12' de gösterilmiştir.

Tablo 10: Plastik ve Cam Malzemeler listesi

<u>Plastik ve Cam Malzemeler</u>	<u>Markası</u>
Steril İdrar Kabı	
15 cc Falkon Tüp	Greiner bio-one cell star
50 cc Falkon Tüp	Greiner bio-one cell star
Reaksiyon Tüpleri	Ependorf
Kriyo Tüp	Greiner
Pipet Ucu	Finntip
Cam Pipet	
Enjektör	Ayset

Tablo 11: Kimyasal Malzemeler Listesi

<u>Kimyasal Malzemeler</u>	<u>Markası</u>
İzotonik Solüsyon	Eczacıbaşı/ Baxter
CK20 Kantitasyon Kiti	Roche Diagnostics GmbH, Germany
High Pure RNA İzolasyon Kiti	Roche Diagnostics GmbH, Germany

Tablo 12: Cihazlar Listesi

<u>Cihazlar</u>	<u>Markası</u>
Santrifüj	Eppendorf
Santrifüj	Thermo Electrocorporatuar
Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µl' lik)	Eppendorf
Buzdolabı	Vestel
Derin Dondurucu (-20°C)	Uğur
Derin Dondurucu (-86°C)	Revco
Thermocycler	Thermo
LightCycler	Roche

BÖLÜM-III

3.1. BULGULAR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Ana Bilim Dalı'nda Kasım 2005–Haziran 2006 tarihleri arasında, transizyonel hücreli karsinom ön tanısı / tanısı almış olan 40 olgu çalışmaya alınmıştır. Kontrol grubu olarak aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 10 sağlıklı birey çalışmaya alınmıştır.

Tüm bireylerden alınan sabah idrar örneklerinden revers transkriptaz PCR ile CK20 mRNA ekspresyonu kantitasyonu yapılmıştır.

3.1.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri

Mesane tümörü çalışma grubunu oluşturan 38 erkek olgunun yaş ortalaması $66,33 \pm 10,98$; 2 kadın olgunun yaş ortalaması $65,5 \pm 12,02$ ve toplam 40 olgudan oluşan çalışma grubunun yaş ortalaması $66,29 \pm 10,87$ olarak saptanmıştır.

Çalışma grubumuzda 6 olgu transizyonel hücreli karsinom ön tanılı olmakla birlikte, 34 THK olgunun grade ve evreleri; 1 olguda G1/Ta, 1 olguda G2/Ta, 18 olguda G2/T1, 1 olguda G2/T2, 3 olguda G3/T1, 8 olguda G3/T2, 1 olguda G3/T3 ve 1 olguda da G3/T4' tür.

Tablo 13: Olguların demografik özellikleri

Cinsiyet	Sayı	Yaş
	n (%)	Ortalama ± SD*
Erkek	38	66,33±10,98
Kadın	2	65,5±12,02
Toplam	40	66,29±10,87

*SD: Standart sapma

Tablo 14: Olguların klinik özellikleri

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Tümör tipi	G / E
MS	E	53	THK öntanı	
CK	E	50	THK öntanı	
EA	E	54	THK öntanı	
AA	E	68	THK öntanı	
NM	E	67	THK öntanı	
MB	E	46	THK öntanı	
YÇ	E	59	THK	G1 / Ta
MD	E	75	THK	G2 / Ta
RP	E	75	THK	G2 / T1
Eİ	E	55	THK	G2 / T1
FI	E	59	THK	G2 / T1
FA	E	83	THK	G2 / T1
AHY	E	79	THK	G2 / T1
YB	E	46	THK	G2 / T1
AÇ	K	57	THK	G2 / T1
NY	E	74	THK	G2 / T1
BK	E	75	THK	G2 / T1

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Tümör tipi	G / E
AO	E	72	THK	G2 / T1
EY	E	67	THK	G2 / T1
AA	E	67	THK	G2 / T1
MD	E	53	THK	G2 / T1
TK	E	71	THK	G2 / T1
EK	E	67	THK	G2 / T1
SI	K	74	THK	G2 / T1
HK	E	78	THK	G2 / T2
HB	E	64	THK	G2 / T2
SE	E	75	THK	G2 / T2
AÖ	E	80	THK	G3 / T1
MA	E	84	THK	G3 / T1
VY	E	52	THK	G3 / T1
MA	E	82	THK	G3 / T2
DG	E	65	THK	G3 / T2
MM	E	76	THK	G3 / T2
AK	E	61	THK	G3 / T2
Kİ	E	65	THK	G3 / T2
AU	E	69	THK	G3 / T2
ME	E	61	THK	G3 / T2
HK	E	61	THK	G3 / T2
ZK	E	44	THK	G3 / T3
MET	E	73	THK	G3 / T4

3.1.2. Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri

Sağlıklı bireylerden seçilerek kontrol grubuna dahil edilen 6 erkek olgunun yaş ortalaması, $53,17 \pm 9,83$; 4 kadın olgunun yaş ortalaması $52,50 \pm 3,67$ ve toplam 10 olgudan oluşan kontrol grubunun yaş ortalaması $52,90 \pm 7,70$ olarak saptanmıştır.

Tablo: 15 Kontrol grubunun demografik özellikleri

Cinsiyet	Sayı	Yaş
	n (%)	Ortalama ± SD*
Erkek	6	53,17±9,83
Kadın	4	52,50±3,67
Toplam	10	52,90±7,70

*SD: Standart sapma

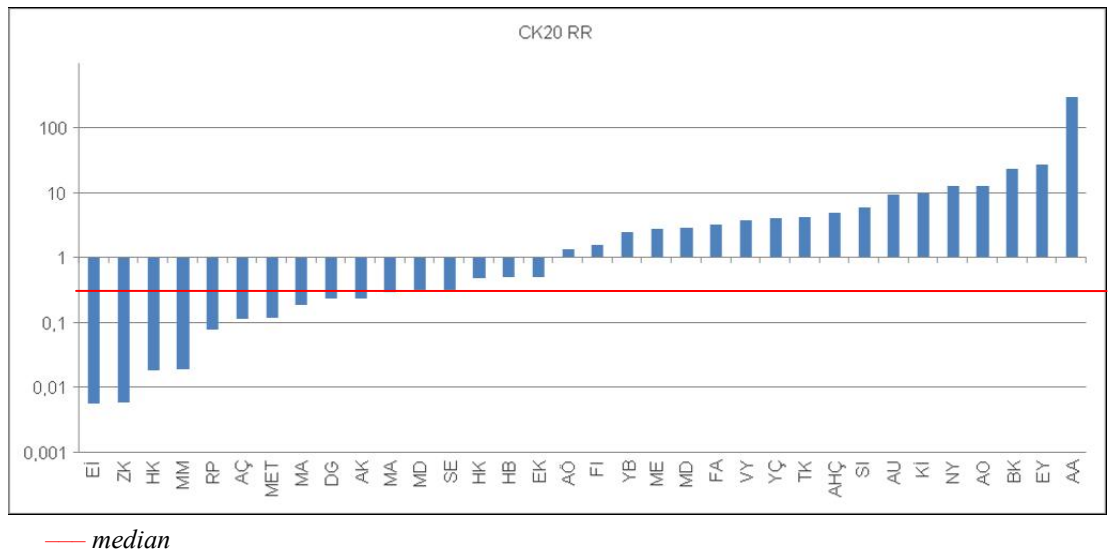
Tablo 16: Kontrol grubunun özellikleri

Ad	Cinsiyet	Yaş
CG	E	45
NT	E	62
MK	E	43
ÖD	E	68
NK	E	51
MK	E	50
ET	K	58
HY	K	49
HK	K	50
MA	K	53

3.1.3. CK20 mRNA Ekspresyonu

3.1.4. Olgu Grubu

CK20 Kantifikasyon Kiti ile olgu grubumuzun idrar örneklerindeki sitokeratin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Çalışılan 40 olgunun CK20 mRNA ekspresyon rölatif oranının ortalaması $11,12 \pm 47,53$, median 0,50, minimum 0 ve maksimum 305,41 olarak saptanmıştır (Şekil 13).

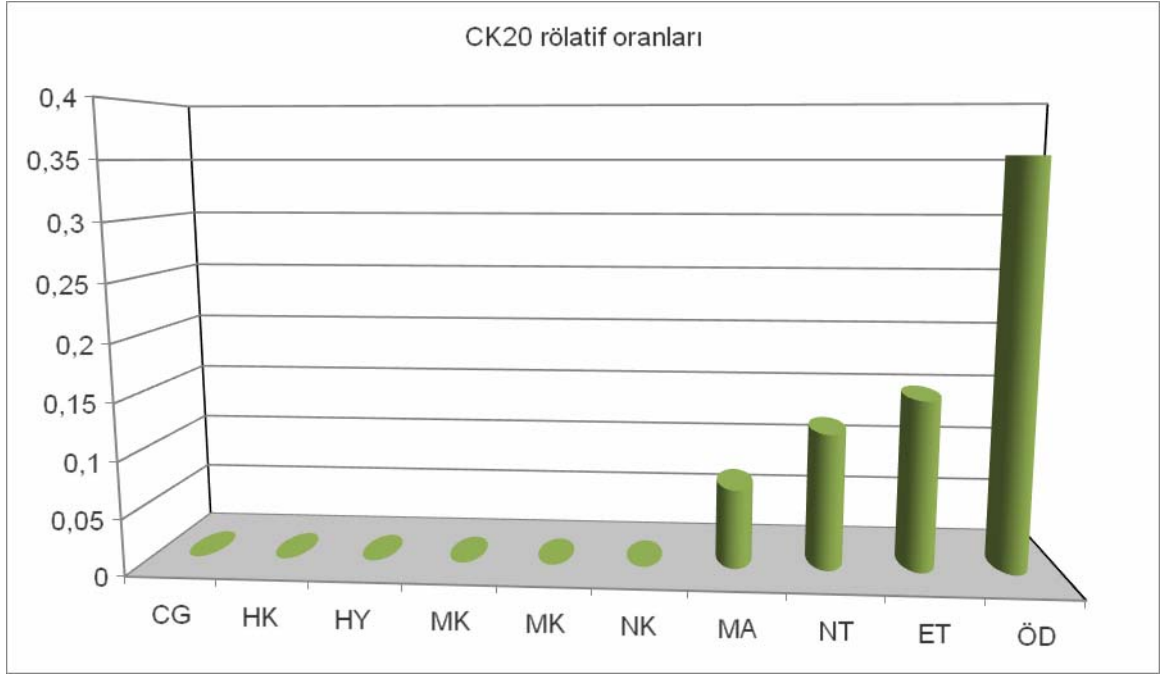


Şekil 13: Olguların saptanan CK20 mRNA ekspresyonunun rölatif oranı

Mesane kanseri ön tanılı 6 olgunun CK20 mRNA ekspresyon rölatif oranının ortalaması $0,06 \pm 0,12$ olarak saptanmıştır. Yapılan klinik incelemeler sonucu, bu olgular mesane kanseri tanısı almamıştır. Bu 6 olgu hariç tutulup, geri kalan 34 THK' lu olguda CK20 mRNA ekspresyon rölatif oranının ortalaması $11,91 \pm 50,01$, median 0,50, minimum 0,005 ve maksimum 305,41 olarak saptanmıştır.

3.1.5. Kontrol Grubu

Çalışılan 10 olgunun CK20 mRNA ekspresyon rölaf oranının ortalaması $0,17 \pm 0,12$ median 0, minimum 0 ve maksimum 0,35 olarak saptanmıştır (Şekil 14).



Şekil 14: Kontrol grubunun CK20 rölaf oranları

Kontrol grubumuzdaki olguların geçiş noktası (Cp), konsantrasyon oranı (CR), rölaf oranı (RR) ve kalibratör konsantrasyon (CAL CR) oranı tablo 17' te verilmiştir.

Tablo 17: Kontrol grubundaki olguların geçiş noktası ve rölatif oranları

OLGU	CK20	Cp	CR	RR	CAL CR
CG	T	>45	0	0	8,63
	R	35,18			
MK	T	>45	0	0	23,65
	R	28,74			
NK	T	>45	0	0	23,65
	R	23,74			
MK	T	>45.	0	0	23,65
	R	28,78			
HK	T	>45	0	0	23,65
	R	28,51			
HY	T	>45	0	0	50,22
	R	25,99			
MA	T	35,21	0,62	0,071842	8,63
	R	35,53			
NT	T	23,57	1,05	0,121669	8,63
	R	32,63			
ET	T	36,79	1,26	0,146002	8,63
	R	37,12			
ÖD	T	33,79	3,45	0,353846	9,75
	R	35,57			
Ortalama			0,983	0,07704	
Standart Sapma			1,383097	0,118886	

Cp: geçiş noktası, CR: konsantrasyon oranı, RR: rölatif oranı, CAL CR: kalibratör konsantrasyon

Çalışma grubumuzdaki olguların geçiş noktası (Cp), konsantrasyon oranı (CR), rölatif oranı (RR) ve kalibratör konsantrasyon (CAL CR) oranı tablo 18' de verilmiştir. Kontrol grubunda 10 olguda saptadığımız CK20 mRNA ekspresyonu rölatif oranı ortalamasının (0,07±0,12) iki standart sap-

masını (0,31) eşik değeri olarak aldık. Buna göre 22 olgu CK ekspresyonu yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 18: Olgu grubunun geçiş noktaları ve rölatif oranları

Olgu	CK20	Cp	CR	RR	CAL CR
AA	T	>45,00	0	0	11,72
	R	33,95			
CK	T	>45,00	0	0	5,73
	R	34,11			
MB	T	>45,00	0	0	23,85
	R	20,42			
NM	T	20,44	0,02	0,004587	4,36
	R	14,9			
Eİ	T	27,8	0,24	0,005739	41,82
	R	25,74			
ZK	T	30,13	0,25	0,005978	41,82
	R	28,12			
HK	T	36,88	0,79	0,01889	41,82
	R	36,54			
MM	T	35,41	0,17	0,019699	8,63
	R	32,87			
MS	T	34,32	2,59	0,061932	41,82
	R	35,39			
RP	T	35,68	3,39	0,081062	41,82
	R	37,44			
AÇ	T	33,49	4,96	0,118604	41,82
	R	35,8			
MET	T	37,59	5,15	0,123147	41,82
	R	39,96			
MA	T	34,51	2,26	0,192833	11,72
	R	35,74			
DG	T	35,62	2,05	0,237543	8,63
	R	35,66			

Olgu	CK20	Cp	CR	RR	CAL CR
AK	T	35,25	2,82	0,240614	11,72
	R	36,74			
MA	T	33,05	2,56	0,29664	8,63
	R	34,41			
EA	T	28,79	12,66	0,302726	41,82
	R	32,45			
MD	T	37,26	1,4	0,321101	4,36
	R	37,74			
SE	T	15,69	7,72	0,32369	23,85
	R	18,63			
HK	T	27,52	5,73	0,488908	11,72
	R	30,03			
HB	T	34,67	2,9	0,506108	5,73
	R	36,21			
EK	T	40,63	2,28	0,522936	4,36
	R	41,81			
AÖ	T	29,08	69,24	1,378734	50,22
	R	35,19			
FI	T	28,01	68,49	1,637733	41,82
	R	34,11			
YB	T	34,3	14,31	2,497382	5,73
	R	38,13			
ME	T	27,65	33,19	2,831911	11,72
	R	32,7			
MD	T	30,55	34,58	2,950512	11,72
	R	35,66			
FA	T	29,2	19,06	3,326353	5,73
	R	33,45			
VY	T	22,97	31,98	3,90	8,20
	R	27,97			
YÇ	T	17,18	101	4,234801	23,85
	R	23,84			
TK	T	28,51	50,44	4,303754	11,72
	R	34,17			

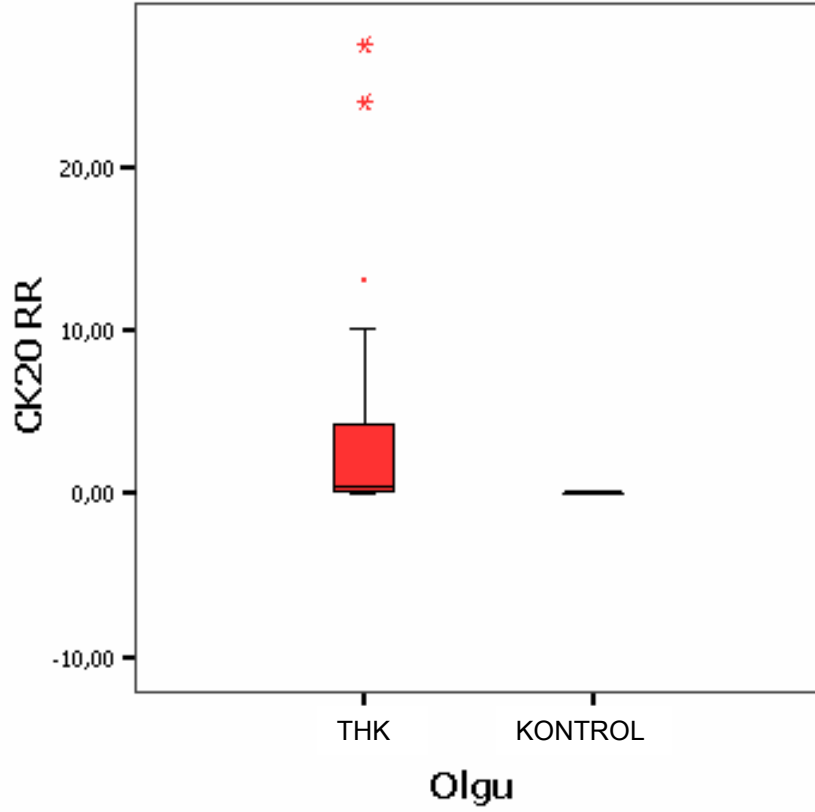
Olgu	CK20	Cp	CR	RR	CAL CR
AHÇ	T	28,24	28,74	5,015707	5,73
	R	33,06			
SI	T	23,71	252	6,025825	41,82
	R	31,63			
AU	T	18,47	81,9	9,490151	8,63
	R	24,83			
Kİ	T	23,32	118	10,06826	11,72
	R	30,21			
NY	T	30,31	75,57	13,18848	5,73
	R	36,55			
AO	T	23,31	155	13,22526	11,72
	R	30,58			
BK	T	27,91	282	24,06143	11,72
	R	36,05			
EY	T	25,71	120	27,52294	4,36
	R	32,62			
AA	T	34,23	1750	305,4101	5,73
	R	45			
Ortalama			77,1442	10,25887	21,50977
Standart Sapma			269,0674	46,48719	16,59674

Cp: geçiş noktası, CR: konsantrasyon oranı, RR: rölatif oranı, CAL CR: kalibratör konsantrasyonu

THK ön tanıli olgular

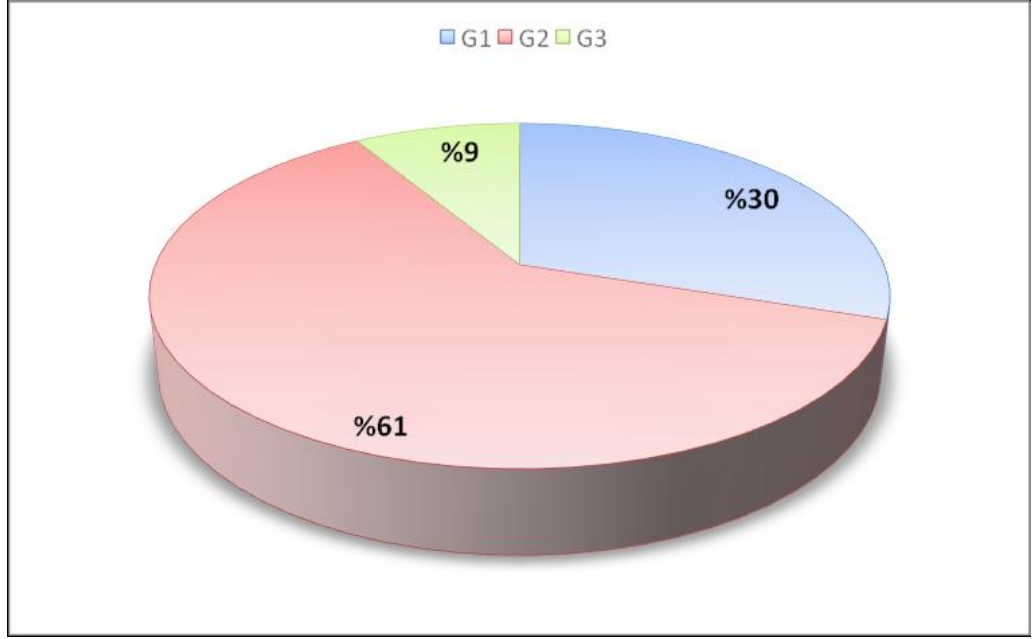
Pozitif olgular

Çalışma ve kontrol gruplarındaki hariç tutulan olgulardan sonraki karşılaştırmalı ortalama Şekil 15' te verilmiştir. Bu iki grubun CK20 mRNA rölatif oranı ortalamaları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 15: Karşılaştırmalı ortalaması

THK tanılı 34 olgu grubunun grade (şekil 16) ve evrelerine göre CK20 mRNA ekspresyonu rölatif oranları tablo 19' da verilmiştir. Gruplardaki CK20 mRNA ekspresyonu rölatif oranı ortalamaları incelendiğinde G2/T1' de 22,68 ile en yüksek değer saptanmıştır. Bunu takiben de, 1 olguda G1/Ta 4,23, 1 olguda G2/Ta 2,95 ve 8 olguda da G3/T2 2,88 yüksek olarak saptanmıştır. Grade artışı ile rölatif oranlar arasında bir korelasyon saptanamamıştır ($p>0,05$). Diğer bir ilginç bulgu da yüksek grade ve evredeki olgularda CK20 mRNA rölatif oranı oldukça düşük olarak saptanmıştır.



Şekil 16: CK20 ekspresyon ortalamasının gradelere göre dağılımı

Tablo 19: Grade ve evrelere göre CK20 ekspresyonunun ortalaması

Grade/Derece	Olgu Sayısı	CK20 Rölatif Oranı	
		Ortalama	Standart sapma
G1	1	4,234801	
G1 / Ta	1	4,234801	
G2	20	8,651760	67,51309
G2 / Ta	1	2,950512	
G2 / T1	18	22,68108	71,04338
G2 / T2	1	0,323689	
G3	14	1,218767	3,570671
G3 / T1	3	1,858458	1,848960
G3 / T2	8	2,887488	4,357327
G3 / T3	1	0,005978	
G3 / T4	1	0,123147	

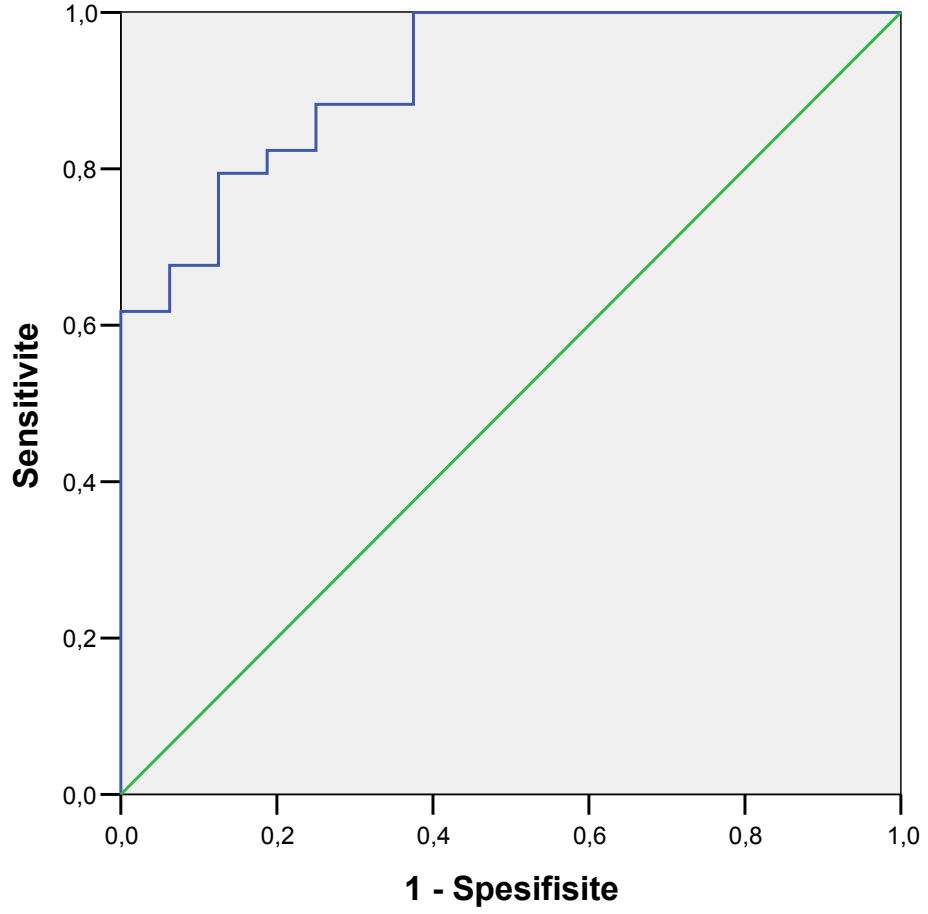
Belirlediğimiz eşik değerine göre tespit ettiğimiz pozitif ve negatif olguların sonuçlarına göre yöntemimizin spesifitesi % 69,56; sensitivitesi % 67,65; pozitif tanısal değeri % 85,19; negatif tanısal değeri % 59,26 ve toplam tanı değeri % 78,00 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 20: CK20 kantitasyonunun sensitivite ve spesifite değerleri

	% Değeri
Sensitivite	67,65
Spesifisite	69,56
Pozitif tanısal değer (PTD)	85,19
Negatif tanısal değer (NTD)	59,26
Toplam tanı değeri (TTD)	78,00

Saptadığımız eşik değerinin sensitivite ve spesifisite değerlerinden ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisi oluşturuldu (Şekil 16). ROC eğrisi altındaki alanlar (AUC=Area Under Curve) hesaplandı (Tablo 21). ROC analizi ile CK20' nin en yüksek sensitivite (% 82,4) ve spesifiteye (% 81,2) sahip cut-off değerinin 0,1224 olduğu saptandı (Tablo 22)

ROC Eğrisi



Şekil 17: Saptanan sensitivite ve spesifisite değerlerinden ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisi

Tablo 21: AUC (Area Under the Curve)

Area	Standart Hata	p	% 95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
0,917	0,039	0,000	0,841	0,994

Tablo 22: Eğrinin koordinatları

Eğer Pozitif Değer Eşit veya Büyük	Sensitivite	1 - Spesifisite
-1,0000	1,000	1,000
0,0023	1,000	,438
0,0052	1,000	,375
0,0059	0,971	0,375
0,0124	0,941	0,375
0,0193	0,912	0,375
0,0408	0,882	0,375
0,0669	0,882	0,313
0,0765	0,882	0,250
0,0998	0,853	0,250
0,1201	0,824	0,250
0,1224	0,824	0,188
0,1346	0,794	0,188
0,1694	0,794	0,125
0,2152	0,765	0,125
0,2391	0,735	0,125
0,2686	0,706	0,125
0,2997	0,676	0,125
0,3119	0,676	0,063
0,3224	0,647	0,063
0,3388	0,618	0,063
0,4214	0,618	0,000
0,4975	0,588	0,000
0,5145	0,559	0,000
0,9508	0,529	0,000
1,5082	0,500	0,000
2,0676	0,471	0,000
2,6646	0,441	0,000
2,8912	0,412	0,000
3,1384	0,382	0,000
3,6132	0,353	0,000
4,0674	0,324	0,000
4,2693	0,294	0,000
4,6597	0,265	0,000
5,5208	0,235	0,000
7,7580	0,206	0,000
9,7792	0,176	0,000
11,6284	0,147	0,000
13,2069	0,118	0,000
18,6433	0,088	0,000
25,7922	0,059	0,000
166,4665	0,029	0,000
306,4101	0,000	0,000

BÖLÜM-IV

4.1. TARTIŞMA

Çalışmamızda mesane kanserli olguların idrarından dökülen hücrelerde Sitokeratin 20 mRNA (CK20 mRNA) ekspresyonu RT-PCR ile araştırılmıştır.

Sitokeratinler iki gruba ayrılırlar: CK9' dan CK23' e kadar olan sitokeratinler Tip I sitokeratinleri ve CK1' den CK8' e kadar olan sitokeratinler ise Tip II sitokeratinleri oluşturur (13). Sitokeratinler epitel farklılaşmasının önemli belirteçlerindedir. CK6 ve CK16 sedef hastalığı veya epiteliyal tümör hiperproliferasyonu görülen durumlarda eksprese edilmektedir. Mide, bağırsak epitelinde, ürotelyum epitelinde ve merkel hücrelerinde eksprese edilen CK20; kolon, mide, pankreas adenokarsinomlarında, musinöz olmayan over tümörlerde ve transizyonal hücre karsinomlarında saptanabilmektedir (4).

CK20 mRNA ekspresyonu, immunohistokimyasal veya RT-PCR çalışmaları ile farklı gruplardan elde edilen idrardan dökülen hücrelerde tespit edilmektedir (22, 38, 41).

CK20 mRNA ekspresyonunun disregülasyonu üroteliyal tümör gelişiminde erken bir durum olarak özellikle yüksek dereceli displazilerde saptanmaktadır (27).

Buchumensky ve arkadaşları, RT PCR tekniğini kullanarak CK20 mRNA yönteminin dökülen idrar örneklerinde THK hücrelerin 1/1.000.000

kadar az dahi olsa tespit edilebileceğini bildirmişlerdir. CK20 mRNA testinin özellikle düşük gradeli kanserlerin belirlenmesinde avantajlı olduğunu savunmuşlardır (8).

Southgate ve Harnden' in yaptıkları çalışmada, normal süperfisiyal ürotelyumun CK20' yi eksprese ettiğini rapor etmişler ve idrardaki CK20 saptanması ile tümör varlığı veya rekürrensini belirlenemeyeceğini ileri sürmüşlerdir (71).

Rotem ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; CK20 ekspresyonunu THK' lu hastaların % 86,7' sinde ve sağlıklı gönüllülerin yalnızca % 3,3' ünde tespit etmişlerdir (67).

Eissa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, CK20 mRNA pozitiflik oranları kontrol, benign ve malign gruplarda sırası ile 0 (% 0), 1/34 (% 2.9) ve 51/63 (% 82.3) olarak bulunmuştur (15).

Çalışmamızda THK tanılı olguların tümünde (% 100), THK öntanıli 6 olgunun 3' ünde (% 50) ve kontrol grubunun 4' ünde (% 40) CK20 mRNA ekspresyonu saptanmıştır. Ekspresyon saptanması Southgate ve arkadaşlarının öne sürdüğü gibi normal hücrelerde de gerçekleşebilmektedir. Fakat saptanan ekspresyonun kantitasyonu, HT29 kolorektal hücre hattındaki CK20 mRNA ekspresyonuna (kalibratör RNA) oranlandığı için ekspresyonun varlığı her zaman pozitif olarak yorumlanmamakta ve belli bir eşik değerinin üzerinde olanlar "pozitif" olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızdaki bu eşik değeri 0,31 olup kalibratör RNA' daki ekspresyondan 3 kat daha az bir ekspresyonu göstermektedir. Bu değer üstündeki olgular pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Harnden ve arkadaşları, CK20 ekspresyonu başlangıçta negatif olan süperfisiyal tümörlerin 5 yıllık takip serilerinde herhangi bir tümör rekürrensini gelişmediğini bulmuşlardır. Bundan yola çıkarak, tümör bir kez oluştuğunda ve nüks ettiğinde CK20 mRNA ekspresyonunun yeniden düzenlendiği veya arttığı hipotezini ileri sürmüşlerdir (28).

THK' lu hastalardan alınan idrarda ve tümör dokularında CK20 mRNA ekspresyonu, normal ürotelyal doku veya normal idrar örneklerinde dikkate değer oranda daha yüksek düzeylerde eksprese edilmektedir. Christoph ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, tümör dokularında yaklaşık 8 kat ve tümörlü hastaların idrarından dökülen hücrelerde ise normal doku veya idrar örneklerindeki göre 13 kat daha fazla CK20 mRNA eksprese edildiği bildirilmiştir. Tümörlü hastaların idrarları ile normal idrar karşılaştırıldığında CK20 mRNA ekspresyonunda anlamlı bir fark saptamıştır ve hastalığın erken tanı ve evrelendirilmesinde katkıda bulunabileceğini ileri sürmüşlerdir (11).

Çalışmamızda, THK olgularında saptanan CK20 mRNA ekspresyonu normal idrar örneklerine göre 33 kat artmış oranda saptanmıştır. Olgularımızın % 47' sinin subepitelyal bağ dokusuna invaze tümör (T1) grubunda olduğu ve bu gruptaki CK20 mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre 73 kat, kalibratör RNA' ya göre 22 kat artmış oranda CK20 mRNA ekspresyonu sergiledikleri gözlenmiştir.

Christoph ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Ta tümörlerinin T1 tümörlerine göre dikkate değer derecede düşük CK20 mRNA ekspresyonu sergiledikleri gösterilmiştir. Bazı Ta tümörlerinde CK20 ekspresyonu zayıf olmasına rağmen tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Bununla birlikte CK20

ekspresyonunun T2 gibi ileri tümör evrelerinde veya daha üst basamaklarda düştüğünü göstermişlerdir (11).

Çalışmamızda da benzer şekilde, en yüksek ekspresyon T1 grubunda gözlenmiştir. Bulgularımız ışığında, yüksek CK20 mRNA ekspresyonlarının özellikle T1 tümör evresini belirlemede oldukça tanımlayıcı olduğunu düşünmekteyiz. Christoph ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi çalışmamızda, T2 ve daha ileri evreli tümörlerde CK20 mRNA ekspresyonu saptanırken, ekspresyon değerleri T1' e göre düşük seviyelerdedir. Harnden ve arkadaşlarının ileri sürdüğü gibi yüksek derece tümörlerde CK20 mRNA ekspresyonunun disregülasyonu gözlenmemiş olup Christoph ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile koreledir.

Çalışmamızda tümör grade' i ile CK20 mRNA ekspresyonu arasında bir korelasyon saptanmamıştır.

Rotem ve arkadaşları, CK20 mRNA ekspresyonu ile tümör gradeleri arasında güçlü bir korelasyon saptamışlardır. Grade 3 ve 4 tümörlerini, CK 20 mRNA ekspresyonu açısından pozitif olarak (% 100) bulmuşlardır (67).

Inoue ve arkadaşları, (38) dokuda tümör grade' i (G3' e karşı G1 / G2) ve CK20 mRNA ekspresyonu arasında bir korelasyon tespit edip, iyi farklılaşmamış tümörlerin daha agresif ve daha fazla rekürens oranlarına sahip olduklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda G1 ve G2 olgularında CK20 mRNA ekspresyonu arasında korelasyon gözlenirken, G3 olgularında CK20 mRNA ekspresyonu grade yükselmesine rağmen düşük saptanmıştır. G3 olgularımızın büyük bir kısmı takip olguları oldukları için gördükleri tedavi nedeni ile

CK20 mRNA ekspresyonunun bu grupta düşük olarak saptandığını düşünmekteyiz.

Yöntemimizin kontrol grubundaki CK20 mRNA ekspresyonunun ortalaması \pm iki standart sapma ile belirlediğimiz eşik değerine göre yöntemimizin spesifitesi % 69,56; sensitivitesi % 67,65 ve toplam tanı değeri % 78.00 olarak saptanmıştır.

Eissa ve arkadaşlarının yaptıkları 62 olguyu içeren çalışmada CK20 mRNA; kontrol, benign ve malign gruplar için sensitivite ve spesifitesi sırası ile % 82.3 ve % 98.8 olarak bulunmuştur (15).

Buchumensky ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada malign ürotelyal epitelyumda RT-PCR ile regüler sitoloji karşılaştırıldığında, CK20 mRNA ekspresyonunun sırası ile % 91 ve % 56 sensitivite sergilediği bulunmuştur (8).

Çalışmamızdaki sensitivite ve spesifite değerleri Eissa ve Buchumensky' nin çalışmasına göre kısmen düşük olmakla birlikte yapılan ROC analizinde bu değerler istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p < 0,005$). ROC analizine göre CK20 mRNA ekspresyonu rölatif oranının "cut off" değerini 0,1224 olarak aldığımızda yöntemimizin sensitivitesi % 82,4 ve spesifitesi % 81,2 olarak belirlenmiştir. Bu sensitivite ve spesifite değerlerinin bir tanı testi için geçerli seviyede olduğunu düşünmekteyiz. Ancak olgu sayımız az olduğundan dolayı, yöntemimizin gradelerdeki sensitivite ve spesifite değerlerinin gerçeği yansıtmayacağını düşündüğümüzden dolayı hesaplanmamıştır.

Ayrıca CK20 mRNA ekspresyonu yüksek olarak saptanan diğer kanser tiplerinde de tanı testi olarak kullanılabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır.

Chausovsky ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; periferik kandan CK20 mRNA ekspresyonu incelenmiş ve metastatik kolon karsinomlu 22 olgunun 14 tanesi CK20 mRNA pozitif (sensitivite % 63,6 ve spesifite % 92,3); pankreatik karsinomlu 28 hastadan 22' si ve gastrik karsinomlu 18 hastadan 12 tanesi CK20 mRNA ekspresyonu bakımından pozitif bulunmuştur. Metastatik akciğer karsinomlu hastalardan biri haricinde ekspresyon negatif olarak bulunmuştur. Metastaz gözlenmeyen 13 karsinomlu olgunun, 12' si ekspresyon açısından negatif ve hiçbir malign hastalığı bulunmayan 22 olgunun CK20 mRNA ekspresyonu negatif olarak bulunmuştur (9).

Çalışmamızda olguların periferik kanında CK20 mRNA ekspresyonu değerlendirilmemiştir.

Chausovsky' nin yaptığı çalışmanın da gösterdiği gibi CK20 mRNA' nın mesane, kolon, mide ve pankreas kanserlerinde potansiyel bir tümör belirleyicisi olabileceğini düşünmekteyiz ve bu tür kanserli olguların periferik kanında CK20 mRNA ekspresyonunun incelenmesini ileriki çalışmalar açısından planlamaktayız.

Sonuç olarak; düşük veya yüksek CK20 mRNA ekspresyonu, mesane tümörlerinin tanı ve takibinde güçlü bir yöntem olarak düşünülmekte ve mesane kanserinin görüntülenmesinde halen standart referans olarak kullanılan sistoskopi aralığındaki değişime katkıda bulunabilir.

Artmış CK20 mRNA ekspresyonu ve patolojik tümör sınıflandırılmasının kombinasyonunun, daha agresif olan tümör davranışlarının göstergesi olduğu ve daha agresif tedavi ve yakın takip ile olguların izlenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. İncelenen idrar örneklerine ilave olarak periferik kanda da CK20 mRNA ekspresyonunun değerlendirilmesi, olgularda saptanan artmış CK20 mRNA ekspresyonunun, papilloma veya tümörün tanısında oldukça yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

BÖLÜM-V

5.1. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, mesane kanserli olguların idrarlarında RT-PCR ile CK20 mRNA ekspresyonunun normal ve tümöral ürotelyal hücreler arasındaki kantifikasyon farkı araştırılmıştır.

Mesane tümörü çalışma grubunu oluşturan 38 erkek olgunun yaş ortalaması $66,33 \pm 10,98$; 2 kadın olgunun yaş ortalaması $65,5 \pm 12,02$ ve toplam 40 olgudan oluşan çalışma grubunun yaş ortalaması $66,29 \pm 10,87$ olarak saptanmıştır.

Çalışma grubumuzda 6 olgu transizyonel hücreli karsinom ön tanılı olup, 34 THK olgunun grade ve evreleri; 1 olgu G1/Ta, 1 olgu G2/Ta, 18 olgu G2/T1, 1 olgu G2/T2, 3 olgu G3/T1, 8 olgu G3/T2, 1 olgu G3/T3 ve 1 olgu da G3/T4' tür.

Olgu grubumuzun CK20 Kantifikasyon Kiti ile idrar örneklerindeki sitokeratin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Çalışılan 40 olgunun CK20 mRNA ekspresyon rölatif oranının ortalaması $11,12 \pm 47,53$, median 0,50, minimum 0 ve maksimum 305,41 olarak saptanmıştır.

Mesane kanseri ön tanılı 6 olgunun CK20 mRNA ekspresyon rölatif oranının ortalaması $0,06 \pm 0,12$ olarak saptanmıştır. Yapılan klinik incelemeler sonucu, bu olgular mesane kanseri tanısı almamıştır. Bu 6 olgu hariç tutulup, geri kalan 34 THK' lu olguda CK20 mRNA ekspresyon rölatif oranının ortala-

ması $11,91 \pm 50,01$, median 0,50, minimum 0,005 ve maksimum 305,41 olarak saptanmıştır.

Çalışılan 10 olgunun CK20 mRNA ekspresyon rölatif oranının ortalaması $0,17 \pm 0,12$ median 0, minimum 0 ve maksimum 0,35 olarak saptanmıştır.

Kontrol grubunda 10 olguda saptadığımız CK20 mRNA ekspresyonu rölatif oranı ortalamasının ($0,17 \pm 0,12$) iki standart sapmasını (0,31) eşik eğeri olarak aldık. Buna göre 22 olgu CK ekspresyonu yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Grublardaki CK20 mRNA ekspresyonu rölatif oranı ortalamaları incelendiğinde G2/T1' de 22,68 ile en yüksek değer saptanmıştır. Bunu takiben de, 1 olguda G1/Ta 4,23, 1 olguda G2/Ta 2,95 ve 8 olguda da G3/T2 2,88 yüksek olarak saptanmıştır. Grade artışı ile rölatif oranlar arasında bir korelasyon saptanamamıştır ($p > 0,05$). Diğer bir ilginç bulgu da yüksek grade ve evredeki olgularda CK20 mRNA rölatif oranı oldukça düşük olarak saptanmıştır.

Belirlediğimiz eşiğe göre tespit ettiğimiz pozitif ve negatif olguların sonuçlarına göre yöntemimizin spesifitesi % 69,56; sensitivitesi % 67,65; pozitif tanısal değer % 85,19; negatif tanısal değer % 59,26 ve toplam tanı değer % 78,00 olarak hesaplanmıştır.

Saptadığımız eşik değerinin sensitivite ve spesifisite değerlerinden ROC eğrisi oluşturuldu. ROC eğrisi altındaki alanlar (AUC) hesaplandı. ROC analizi ile CK20' nin en yüksek sensitivite (% 82,4) ve spesifiteye (% 81,2)

sahip cut-off deęerinin 0,1224 olduęu saptandı. Bu sensitivite ve spesifite deęerlerinin bir tanı testi için geęerli seviyede olduęunu dűşűnmekteyiz.

Artmış CK20 mRNA ekspresyonu ve patolojik tűmör sınıflandırılmasının kombinasyonunun, daha agresif olan tűmör davranışlarının göstergesi olduęu ve daha agresif tedavi ve yakın takip ile olguların izlenmesi gerektięini dűşűnmekteyiz. İncelenen idrar ۆrneklerine ilave olarak periferik kanda da CK20 mRNA ekspresyonunun deęerlendirilmesi, olgularda saptanan artmış CK20 mRNA ekspresyonunun, papilloma veya tűmörün tanısında oldukça yardımcı olacaęını dűşűnmekteyiz.

Mesane kanserli hastalar için biyolojik olarak hedeflenmiş ajanların entegrasyonu, kombine modalite tedavilerini destekleyici özellik kazanacaktır.

Mesane kanserindeki klinik arařtırmalardaki ilerlemelerin desteklenmesi amacıyla, hastalıęa paralel olarak, hűcre hatları ve hayvan modelleri de kullanılmalıdır. Ayrıca, spesifik antijen ekspresyonları, floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve mikrosatellit analizlerinin, hastalıęın teřhisinde ve / veya seyrinin takibinde ۆmit vaat edeceęini dűşűnmekteyiz. Bununla beraber, rekűrren hastalıęın karakterizasyonu ve tanısında idrar sitolojisinin de incelenmesi gereklilięine inanmaktayız. Yűksek iřlevli genomik / proteomik metotların, çok yۆnlű veri tabanları ve saęlam biyoinformatik ile birleřtirilmesi sonucunda, mesane tűmörűgenezi ve kanser progresyonu ile iliřkili regűlatör ve sinyal yolaklarının komponentlerinin aydınlatılmasında anahtar parçaları oluřturacaęını da dűşűnmekte ve daha sonraki çalıřmalarımızın rotasını bu yۆnde planlamaktayız.

BÖLÜM-VI

6.1. ÖZET

Sistoskopi, mesane tümörlerinin tanısında ve nükslerin rutin takibinde yaygın olarak kullanılan invaziv bir yöntemdir. Bundan dolayı araştırmacılar mesane kanseri için invaziv olmayan, hızlı sonuç veren, ucuz, kişi bağımsız, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan tümör belirleyicilerini araştırmaya yönlenmiştir.

Araştırma aşamasında olan tümör belirleyicileri arasında sitokeratinler yer almaktadır. Sitokeratinler epitel hücrelerinin intermediate filamentlerden meydana gelen ve 20 polipeptitten oluşan multigen proteinlerdir.

Transizyonel hücreli karsinomlarda (THK), sitokeratinlerin (CK) ekspresyonlarındaki değişikliklerin, potansiyel tanı ve önceden teşhiste önemli olduğu düşünülmektedir.

Yüksek düzeydeki displazilerde, CK20 ekspresyonunun disregülasyonu, ürotelyal tümör gelişiminin erken evrelerinde gözlenen bir olay olarak karşımıza çıkmaktadır. Kantitatif olarak ifade edilebilen CK20 ekspresyon düzeyindeki fark, mesane kanserinin erken evrelerde tespit edilebilmesi açısından önem taşımaktadır.

Biz çalışmamızda CK20 ekspresyonunun tümör oluşumu veya rekürrensinde ne kadar güvenilir olduğu hipotezinden yola çıkarak normal ve tümöral ürotelyal hücreler arasındaki ekspresyonun kantifikasyon farkını araştırmayı hedefledik.

Çalışmamızda Üroloji Ana Bilim Dalında THK öntanısı (6) ve tanısı (34) almış 40 olgu ve herhangi bir hastalığı bulunmadığı düşünülen 10 sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışmaya alındı.

Olgulardan alınan sabah idrar örneklerinden gerçekleştirilen total RNA izolasyonunu takiben cDNA sentez edildi. Daha sonra CK20 Kantifikasyon Kiti ile CK20 mRNA' nın amplifikasyonu ve kantitasyonu gerçekleştirildi.

Çalışma grubumuzdaki 34 THK' lu olgunun grade ve evreleri; 1 olguda G1/Ta, 1 olguda G2/Ta, 18 olguda G2/T1, 1 olguda G2/T2, 3 olguda G3/T1, 8 olguda G3/T2, 1 olguda G3/T3 ve 1 olguda da G3/T4' tür.

Olgu grubumuzun idrar örneklerindeki CK20 mRNA ekspresyonunun rölatif oranları belirlenmiştir. Çalışılan 40 olgunun CK20 mRNA ekspresyon rölatif oranının ortalaması $11,12 \pm 47,53$, median 0,50, minimum 0 ve maksimum 305,41 olarak saptanmıştır.

Mesane kanseri ön tanılı 6 olgunun CK20 mRNA ekspresyonunun rölatif oranının ortalaması $0,06 \pm 0,12$ olarak saptanmıştır. Yapılan klinik incelemeler sonucu, bu olgular mesane kanseri tanısı almamıştır.

THK öntanılı 6 olgu hariç tutulup, geri kalan 34 THK' lu olguda CK20 mRNA ekspresyon rölatif oranının ortalaması $11,91 \pm 50,01$, median 0,50, minimum 0,005 ve maksimum 305,41 olarak saptanmıştır.

Çalışılan 10 olgunun CK20 mRNA ekspresyon rölatif oranının ortalaması $0,07 \pm 0,12$, median 0, minimum 0 ve maksimum 0,35 olarak saptanmıştır.

Gruplardaki CK20 mRNA ekspresyonu rölatif oranı ortalamaları incelendiğinde G2/T1' de 22,68 ile en yüksek değer saptanmıştır. Bunu takiben de, 1 olguda G1/Ta 4,23, 1 olguda G2/Ta 2,95 ve 8 olguda da G3/T2 2,88 yüksek olarak saptanmıştır. Grade artışı ile rölatif oranlar arasında bir korelasyon saptanamamıştır ($p > 0,05$). Yüksek grade ve evredeki olgularda CK20 mRNA rölatif oranı oldukça düşük olarak saptanmıştır.

Belirlediğimiz eşik değere göre tespit ettiğimiz pozitif ve negatif olguların sonuçlarına göre yöntemimizin spesifitesi %69,56; sensitivitesi %67,65; pozitif tanısal değeri %85,19; negatif tanısal değeri %59,26 ve toplam tanı değeri %78,00 olarak hesaplanmıştır.

Bu sensitivite ve spesifite değerlerinden ROC eğrisi oluşturuldu. ROC eğrisi altındaki alanlar (AUC) 0,917 olarak ($p=0,000$) hesaplandı. ROC analizi ile CK20' nin en yüksek sensitivite (% 82,4) ve spesifiteye (% 81,2) sahip cutt-off değerinin 0,1224 olduğu saptandı.

Sonuçlarımıza göre; yüksek veya düşük CK20 mRNA ekspresyonunun, mesane tü-

mörlü olguların tanı ve takibinde geçerli bir yöntem olduğunu düşünmekte ve mesane kanserinin görüntülenmesinde halen standart referans olarak kullanılan sistoskopi aralığının genişletilmesinde katkıda bulunabileceğine inanmaktayız.

6.2. ABSTRACT

Cystoscopy is an invasive method that is used in diagnosis and routine follow up of the recurrence of bladder cancer. Therefore, investigators directed to investigate the tumor markers that have the specialities of being non invasive, cheap and independent from the individual also provide rapid results and have high sensitivity and specificity.

Cytokeratins are the tumor markers which are in continual investigation period. These are multigenic proteins that formed of intermediate filament of epithelial cells and consist of twenty polypeptides.

It is believed that in transitional cell carcinoma (TCC), the changes in the expression of cytokeratins are indispensable in potential diagnosis and early detection.

In high level dysplasias, dysregulation of Cytokeratin 20 (CK20) expression is an early event of urothelial tumor development. The quantitatively stated difference in the level of CK 20 expression is considerable in early detection of bladder carcinoma.

In our study we questioned the reliability of the expression of CK20 in tumor development and recurrence. Due to this aim, we investigated the quantification differences of expression between tumor and normal urothelial cells.

Totally 40 cases who were pre-diagnosed (6) and diagnosed (34) with TCC in Urology Department and 10 healthy volunteers as control group were recruited to the study.

Following to the total RNA isolation from voided urine samples of patients, cDNA was synthesized. Afterwards, the quantification and amplification of CK20 mRNA was succeeded according to the manufacturers' instructions.

The stages and grades of the 34 cases with TCC in our study group were as follows; G1/Ta (1 case), G2/Ta (1 case), G2/T1 (18 cases), G2/T2 (1 case), G3/T1 (3 cases), G3/T2 (8 cases), G3/T3 (1 case) and G3/T4 (1 case).

In our study the relative ratio of the expression of cytokeratin in the urine samples of the cases was determined. Among 40 study cases the average relative ratio of CK20 mRNA expression was found as; $11,12 \pm 47,53$. The median was appointed 0,50, minimum 0 and maximum 305,41.

The established average relative ratio of CK20 mRNA expression in pre-diagnosed 6 cases was revealed as $0,06 \pm 0,12$. According to the clinical investigations, these cases were not diagnosed for bladder cancer.

When the 6 cases who had pre-diagnosed with TCC was left off, the average relative ratio of CK20 mRNA expression in 34 cases with TCC is assigned as $11,91 \pm 50,01$. The value of the median was stated as 0,50, minimum 0,005 and maximum 305,41.

The average relative ratio of CK20 mRNA expression in studied 10 cases was found as $0,07 \pm 0,12$. The median value was calculated as 0, minimum 0 and maximum as 0,35.

The highest value of the average relative ratio found as in G2/T1 was 22,68. Subsequent to this, the value was determined high in G1/Ta in one case 4,23, in G2/Ta in one case 2,95 and in G3/T2 in 8 cases 2,88. According to our results, no correlation was determined between relative ratios and grade rise ($p > 0,05$). The relative ratio of CK20 mRNA in elevated grades and stages was found low.

The positive and negative cases results that were determined according to the “borderline”, the specificity, sensitivity, positive diagnosis value negative diagnosis value and total diagnosis value of the method were respectively calculated as; 69,56 %, 67,65 %, 85,19%, 59,26% , 78,00%.

The ROC curve was created from sensitivity and specificity values. The areas under the ROC curve (AUC) were calculated as 0,917 ($p = 0,000$). By using ROC analysis; cut-off value of CK20 that had the highest sensitivity (%82,4) and the specificity value (% 81,2) was determined as 0,1224.

In respect of our results; we think that the highest or the lowest CK20 mRNA expression is an available method for the diagnosis and follow up of bladder cancer cases. In addition; we believe that this method can contribute to expand the cystoscopy range that is still being used as a standard reference to monitor the bladder cancer.

BÖLÜM-VII

7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Alberts B, Bray D, Johnson A *et al.* O Citoesqueleto. In: Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Fundamentos da Biologia Celular- Uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed 1999: 526-60
2. Alberts,B.,Bray,D., Lewis,J.,Raf,M., Robert,K.,Watson,JD.,Garland Molecular Biology of the Cell,3rd.ed. Publishing, New York and London,1994
3. American Joint Commission on Cancer/Union Internationale Contra Cancre,1997
4. Berezowski K, Stastny JF, Kornstein MJ. Cytokeratins 7 and 20 and carcinoembryonic antigen in ovarian and colonic carcinoma. Mod Pathol. 1996; 9:426-9
5. Bernerd F, Del Bino S, Asselineau. Regulation of keratin expression by ultraviolet radiation: differential and specific effects of ultraviolet B and ultraviolet A exposure. J Invest Dermatol 2001; 117: 1421-9
6. Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. Eur J Cancer. 1997; 33:1075-107
7. Brown FM.Urine cytology. It is still the gold standard for screening? Urol Clin North Am. 2000; 27:25-37
8. Buchumensky V, Klein A, Zemer R, *et al*: Cytokeratin 20: a new marker for early detection of bladder cell carcinoma. J Urol 1998; 160:1971–1974
9. Chausovsky G, Luchansky M, Figer A, Shapira J, Gottfried M, Novis B, Bogelman G, Zemer R, Zimlichman S, Klein A.Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach, and lung.Cancer. 1999; 86:2398-405

10. Cheng L, Neumann RM, Bostwick DG. Papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. Clinical and biologic implications. *Cancer*. 1999; 86:2102-8
11. Christoph F, Muller M, Schostak M, Soong R, Tabiti K, Miller K. Quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA expression in bladder carcinoma by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Urology*. 2004; 64:157-61
12. Cooper, GM., *The Cell: A Molecular Approach* ASM Press, Washington DC, 1997
13. Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 110-22
14. Eble JN, Young RH. Carcinoma of the urinary bladder: a review of its diverse morphology. *Semin Diagn Pathol* 1997; 14:98-108
15. Eissa S, Kenawy G, Swellam M, El-Fadle AA, Abd El-Aal AA, El-Ahmady O. Comparison of cytokeratin 20 RNA and angiogenin in voided urine samples as diagnostic tools for bladder carcinoma.1: *Clin Biochem*. 2004; 37:803-10
16. Engin M. Gözükara.: *BİYOKİMYA* Baskı Nobel Tıp Kitabevi Millet Caddesi No:111 Çapa İstanbul 1997
17. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol*. 1998; 22:1435-48
18. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*. 1994; 331:1259-64
19. Foresman WH, Messing EM. Bladder cancer: natural history, tumor markers, and early detection strategies. *Semin Surg Oncol*. 1997; 13:299-306
20. Gamarra MC, Zein T. Cytologic spectrum of bladder cancer. *Urology*. 1984; 23:23-6

21. Gibson UEM, Heid CA, Williams PM. A novel method for real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001
22. Golijanin D, Shapiro A, and Podes D: Immunostaining of cytokeratin 20 in cells from voided urine for detection of bladder cancer. *J Urol* 2000; 164:1922–1925
23. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin.* 2000; 50:7-33
24. Grossman HB. New methods for detection of bladder cancer. *Semin Urol Oncol.* 1998;1:17-22
25. Grove DS. Quantitative real time polymerase chain reaction for the core facility using TagMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. *J Biomol Tech* 1999; 10:11-6
26. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 1999; 286:950-2
27. Harnden P, Allam A, Joyce AD, *et al*: Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology* 1995; 27:169–174
28. Harnden P, Mahmood N, and Southgate J: Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder. *Lancet* 1999; 353:974–977
29. Hattori N, Komine M, Yano *et al*. Interferon- γ , a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 403-10
30. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6:986-94
31. Hoffee PA, *Medical Molecular Genetics*, Fence Creek Publishing, Madison Connecticut, 1998
32. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7276-80
33. <http://www.bartleby.com/107/255.html#i1141>

34. http://www.bladder-cancer-course.org/sites/04_03_04.html
35. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S036505962004000200002&script=sci_arttext&tlng=en
36. <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect06.htm>
37. <https://isobm.org/Slides.htm>
38. Inoue T, Nakanishi H, Inada KI, *et al*: Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction of urinary cytokeratin 20 detects transitional cell carcinoma cells. *J Urol* 2001; 166: 2134–2141
39. Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Lizuka H. Lessons from disorders of epidermal differentiation-associated keratins. *Histol Histopathol* 2002; 17: 331-8
40. Kiemeny LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek AL, Debruyne FM. Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. *J Urol*. 1993; 150:60-4
41. Klein A, Zemer R, Buchumensky V, Klaper R, Nissenkorn I. Expression of cytokeratin 20 in urinary cytology of patients with bladder carcinoma. *Cancer*. 1998; 82:349-54
42. Klug, WS.; Cummings MC., Third Ed., *Essentials of Genetics*, Prentice-Hall Int., London, 1999
43. Knowles MA, Elder PA, Williamson M, Cairns JP, Shaw ME, Law MG. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res*. 1994; 15;54:531-8
44. Konety BR, Metro MJ, Melham MF, Salup RR. Diagnostic value of voided urine and bladder barbotage cytology in detecting transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Urol Int*. 1999; 62:26-30
45. Konety BR, Williams RD. Superficial transitional (Ta/T1/CIS) cell carcinoma of the bladder. *BJU Int*. 2004; 94:18-21
46. Koss LG, Tiamson EM, Robbins MA. Mapping cancerous and precancerous bladder changes. A study of the urothelium in ten surgically removed bladders. *JAMA*. 1974; 227:281-6
47. Landman J, Chang Y, Kavalier E, Droller MJ, Liu BC. Sensitivity and specificity of NMP-22, telomerase, and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology*. 1998; 52:398-402.

48. Langbein L, Rogers MA, Winter H *et al.* The catalog of human hair keratins I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem* 1999; 274: 19.874-84
49. Lee R, Droller MJ. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy.1: *Urol Clin North Am.* 2000; 27:1-13
50. Leyh H, Marberger M, Conort P, Sternberg C, Pansadoro V, Pagano F, Bassi P, Boccon-Gibod L, Ravery V, Treiber U, Ishak L. Comparison of the BTA stat test with voided urine cytology and bladder wash cytology in the diagnosis and monitoring of bladder cancer. *Eur Urol.* 1999; 35:52-6
51. Liu BC, Loughlin KR. Telomerase in human bladder cancer. *Urol Clin North Am.* 2000; 27:115-23
52. Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonukleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nukleik acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4:357-62
53. Lodish, H. Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E., *WH Molecular Cell Biology.* 4th. ed. Freeman and Co., New York, 1999
54. Lynch CF, Cohen MB. *Cancer.* 1995; 75:316–29
55. Ma L, Xu J, Coulombe PA, Wirtz D. Keratin filament suspension show unique micromechanical properties. *J Biol Chem* 1999; 274: 19.145-51. 4. Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 110-22
56. Melicow MM. Histological study of vesical urothelium intervening between gross neoplasms in total cystectomy. *J Urol.* 1952; 68:261-79
57. Messing EM. *Urothelial Tumors of the Urinary Tract.* Campell's Urology 8th edition. Elsevier Science, New York (USA), 2002; 2732-2784
58. Morris T, Robertson B, Gallagher M. Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2933-6

59. Murphy WM, Soloway MS, Jukkola AF, Crabtree WN, Ford KS. Urinary cytology and bladder cancer. The cellular features of transitional cell neoplasms. *Cancer*. 1984; 53:1555-65
60. Papanicolaou GN, Marshall VF. Urine sediment smears as a diagnostic procedure in cancers of the urinary tract. *Science* 1945; 101:519-520
61. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin*. 1997; 47:5-27
62. Passarge E., *Color Atlas of Genetics ? Thieme Medical Publishers, New York, 1995*
63. Pode D, Shapiro A, Wald M, Nativ O, Laufer M, Kaver I. Noninvasive detection of bladder cancer with the BTA stat test. *J Urol*. 1999; 161:443-6
64. Principle of the PCR,
<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>, 2005
65. Prout GR Jr, Barton BA, Griffin PP, Friedell GH. Treated history of non-invasive grade 1 transitional cell carcinoma. The National Bladder Cancer Group. *J Urol*. 1992; 148:1413-9
66. Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, Roberts SG, Wollan PC, Blute ML, O'Kane DJ. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer.1: *J Urol*. 1999; 161:388-94
67. Rotem D, Cassel A, Lindenfeld N, *et al*: Urinary cytokeratin 20 as a marker for transitional cell carcinoma. *Eur Urol* 2000; 37: 601–604
68. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst*. 1993; 85:53-9
69. Schulz Wa. *Molecular Biology of Human Cancers. An Advanced Student's Textbook*. Springer press: 2006; 289-306
70. Smith FJD. The molecular genetics of keratin disorders. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4: 347-364
71. Southgate J, and Harnden P: Cytokeratin 20: a new marker for early detection of bladder cell carcinoma. *J Urol* 1999; 162: 501–502

72. Takashi M, Schenck U, Kissel K, Leyh H, Treiber U. Use of diagnostic categories in urinary cytology in comparison with the bladder tumour antigen (BTA) test in bladder cancer patients. *Int Urol Nephrol.* 1999; 31:189-96
73. TNM atlas, 3rd edition, 2nd revision
74. Walker L, Liston TGL, Loyd-Davies RW. Does Flexible Cystoscopy Miss More Tumours Than Rod-lens Examination? *Br J Urol.* 1993; 72:449-450
75. Wiener HG, Mian C, Haitel A, Pycha A, Schatzl G, Marberger M. Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer? *J Urol.* 1998; 159:1876-80

7.2. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Söke' de doğdum. İlköğrenimimi Kocagözoğlu İlkokulu' nda, orta öğrenimimi ise Söke Hilmi Fırat Anadolu Lisesi' nde tamamladım. 1999 – 2000 öğretim yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü- ne başladım ve 2004 yılında mezun oldum. 2004 yılında, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü' nün açtığı Tıbbi Biyoloji lisansüstü eğitim progra- mında yüksek lisansa başladım. Yabancı dilim İngilizce' dir.