



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**Mesane Kanseri Hastalarında Evrelemede Tümörün Lamina Propria Geçişinin
İncelenmesinde SMAD-2 ve MMP-9 Moleküllerinin
Serum Değerleri ve Prognostik Önemi**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Yasin Yitgin

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Faruk Özcan

İstanbul-2018



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

Mesane Kanseri Hastalarında Evrelemede Tümörün Lamina Propria Geçişinin
İncelenmesinde SMAD-2 ve MMP-9 Moleküllerinin
Serum Değerleri ve Prognostik Önemi

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Yasin Yitgin

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Faruk Özcan

İstanbul-2018

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimin süresince bilgi ve deneyimlerini aktarmaktan çekinmeyen başta Üroloji Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım sayın [REDACTED]’a, tez çalışmamın laboratuvar deneylerinde desteğini aldığım [REDACTED] ve [REDACTED]’e ve [REDACTED]’e;

Üroloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım [REDACTED] at
[REDACTED] Ş
[REDACTED],
[REDACTED],

Birlikte çalışmaktan her zaman zevk aldığım ve onur duyduğum değerli asistan arkadaşlarıma başta [REDACTED], Üroloji Anabilim Dalı hemşirelerine başta [REDACTED] ve [REDACTED]'a, sekreter arkadaşlarıma başta [REDACTED] olmak üzere personel ve tüm çalışanlarına;

Anesteziyoloji kürsü başkanı [Redacted]
ve tüm Anabilim Dalı çalışanlarına;

Ve bugünlere gelmemde büyük emeğe sahip, hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen çok sevdiğim [REDACTED]
[REDACTED]

Hayatımın anlamı sevgili [REDACTED] ve [REDACTED]
[REDACTED]'ye teşekkürü borç bilirim.

Son olarak bu teze vermiş oldukları destek nedeniyle İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Dr. Yasin Yitgin

İstanbul, 2018

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje kodu: TTU-2018-30735

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMA LİSTESİ.....	iv
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GENEL BİLGİLER.....	4
3.1. Mesanenin Morfolojisi	4
3.1.1. Anatomi.....	4
3.1.2. Embriyoloji	6
3.2 Mesane Kanseri	6
3.2.1. Epidemiyoloji.....	7
3.2.2. Etyoloji ve Risk Faktörleri	8
3.2.3. Tanı	9
3.2.3.1. Bulgu ve semptomlar.....	9
3.2.3.2. Değerlendirme ve tanı	10
3.2.3.3. Evrelendirme ve prognoz	11
3.2.3.4. Rekürrens ve progresyon.....	13
3.2.4. Sınıflandırma.....	14
3.2.4.1. Tümör, Nod, Metastaz Sınıflaması (TNM).....	14
3.2.4.2. Histolojik Derecelendirme	15
3.2.5. Tedavi.....	16
3.2.5.1. Kasa İnvaziv Olmayan Mesane Kanseri (KİOMK) Tedavi	16
3.2.5.2. Kasa İnvaziv Mesane Kanseri (KİMK) Tedavi.....	17
3.2.5.3. Metastatik Hastalık.....	18
3.2.5.4. Multimodal (Trimodal) Yaklaşım	18
3.3.1. Mesane Tümörü Belirteçleri	19
3.3.1.1. İdrar Sitolojisi	19
3.3.1.2. Diğer Tümör Belirteçleri	20
3.3.1.3. MMP-9 ve SMAD-2 moleküllerinin mesane kanserindeki yeri	22
4. GEREÇ VE YÖNTEM	24
4.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler	24

4.2. Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi.....	25
4.2.1. RNA İzolasyonu.....	25
4.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	26
4.2.3. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	27
4.2.4. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
4.3. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	29
4.3.1. ELISA Yöntemi	29
4.4. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler	30
4.4.1. MMP-9 Düzeylerinin Belirlenmesi.....	30
4.4.2. SMAD-2 Düzeylerinin Belirlenmesi.....	31
4.5. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	32
5. BULGULAR	33
6. TARTIŞMA	40
7. SONUÇ	43
8. KAYNAKLAR:	44
9. GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU	50
10. GÖNÜLLÜ ONAY FORMU	52
11. ÖZGEÇMİŞ:	53

KISALTMA LİSTESİ

BCG:	Bacillus Calmette Guerin
BT:	Bilgisayarlı Tomografi
BTA:	Mesane tümör antijeni (Bladder Tumor Antigen)
cDNA:	Komplenmenter DNA
CIS:	Karsinoma in situ
DEHK:	Değişici Epitel Hücreli Kanser
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
EAU:	Avrupa Üroloji Derneği (European Association of Urology)
EDTA:	Etilendiamin Tetraasetik Asit Dihidrat
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMT:	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
EORTC:	Avrupa Kanser Araştırmaları ve Tedavi Organizasyonu (European Organization for Research and Treatment of Cancer)
ISUP:	Uluslararası Ürolojik Patoloji Cemiyeti
KIMK:	Kasa İnvaziv Mesane Kanseri
KIOMK:	Kasa İnvaziv Olmayan Mesane Kanseri
MMP:	Matiks Metalloproteinaz
MR:	Manyetik Rezonans
NMP:	Nükleer Matriks Proteini
PPM1a:	Protein Fosfataz, Mg ²⁺ + / Mn ²⁺ + bağımlı 1A
RNA:	Ribo Nükleik Asit
ROC:	Receiver Operating Characteristic
RS:	Radikal Sistektomi
RT-PCR:	Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT:	Radyoterapi
SCC:	Skuamöz Hücreli Karsinom
TIMP:	Metalloproteinazların Doku İnhibitörü
TGFβ:	Transforming Growth Factor β
TNM:	Tümör Nod Metastaz
TURT:	Transüretal Tümör Rezeksiyonu
USG:	Ultrasonografi
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

1. ÖZET

Giriş: Mesane tümörlerinin prognozunda lamina proprianın tümör tarafından geçilmesi ile tümör evresi bir ileri safhaya geçmiş olur. Tümörün lamina propriayı geçip geçmediği ancak transuretral rezeksiyon sonrası anlaşılmaktadır. Çalışmamızda ameliyat yapılmadan tümörün lamina propriayı geçerken yaptığı hasarın moleküler düzeyde belirlenmesi amacıyla lamina proprianın geçilmesi sırasında oluşan yıkım ürünleri tespit edilerek ameliyat öncesi bu evrenin belirlenmesi amaçlandı. Bu yıkımda rol alan MMP-9 ve SMAD-2'nin mRNA ekspresyon ve protein düzeyleri incelenerek lamina proprianın geçişini anlamak istedik.

Hastalar ve Yöntem: Anabilim Dalımızda değişik epitel hücreli mesane tümörü tanısı alan 57 hastanın transuretral tümör rezeksiyonu öncesi kan serum örnekleri çalışma grubu olarak tanımlandı. 20 sağlıklı kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Hastalardan alınan kanlar 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Hettich Universal 32) edildikten sonra, ayrılan serumlar test sayısı tamamlanıncaya kadar -80°C'de saklandı. Hastaların patolojik T evreleri belirlendi. Buna göre, Ta ve T1 evreleri kasa invaze olmayan mesane kanseri; T2 ve ileri evre olanlar ise kasa invaze mesane kanseri olarak gruplandırıldı. MMP-9 ve SMAD-2 moleküllerinin mRNA ekspresyon ve protein düzeyleri sırasıyla Real time PCR ve ELISA yöntemleri ile analiz edildi.

Bulgular: Kontrol ve çalışma grubu arasında yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı. Mesane tümörlü hastalarda MMP-9 ve SMAD-2 protein düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı (MMP-9 için $p=0.0001$, SMAD-2 için $p=0.0001$) bulunmuştur.

Yukarıda bahsedilen iki grup arasında protein düzeylerinden farklı olarak gen ekspresyon ürünü olan mRNA düzeylerinin arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını saptadık. (MMP-9 için $p=0.89$, SMAD-2 için $p=0.99$) Hastaların patolojik T

evreleri arasında olan incelemede MMP-9 protein düzeyinin pT1 hastalarda pTa ve pT2 hastalara göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (sırasıyla $p=0.018$, $p=0.02$). SMAD-2 protein düzeyinde ise bu gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır. Gen ekspresyon ürünü olan mRNA düzeyleri arasındaise MMP-9 ve SMAD-2 için gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Sonuç: MMP-9 ve SMAD-2 protein düzeylerinde mesane tümörlü hastalarda kontrol grubuna göre artmaktadır. MMP-9 protein düzeyi lamina proprianın invazyonunu gösteren pT1 evresini saptamada fayda sağlayacaktır.

2. ABSTRACT

Introduction: In the prognosis of bladder tumors, the tumor stage upgrades when the lamina propria passes through the tumor. The tumors passing the lamina propria is understood after transurethral resection. In our study, mRNA expression and protein levels of the molecule SMAD-2 which is involved in the adhesion of the cells and molecule MMP-9 involved in the destruction of lamina propria in the basal membrane were investigated in order to determine the molecular damage of the tumor as it passed through the lamina propria.

Patients and Methods: Blood samples of 57 patients with diagnosis of a changing epithelial cell bladder tumor before transurethral tumor resection were defined as the study group. 20 healthy control groups were included in the study. After blood collection from patients they were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes (Hettich Universal 32), the separated serum were stored at -80°C until the number of tests was completed. Pathologic T stages of the patients were determined. Accordingly, Ta and T1 stages are non-muscle invasive bladder cancer; T2 and advanced stage were grouped as muscle invasive bladder

cancer. mRNA expression and protein levels of MMP-9 and SMAD-2 molecules were analyzed by Real time PCR and ELISA methods, respectively.

Results: No significant difference was found between the control and study groups in terms of age, gender and smoking status. MMP-9 and SMAD-2 protein levels were found to be significantly increased in patients with bladder tumors compared to the control group. ($p = 0.0001$ for MMP-9, $p = 0.0001$ for SMAD-2).

We found that the difference between the levels of mRNA, which is a gene expression product, is not statistically significant. ($p = 0.89$ for MMP-9, $p = 0.99$ for SMAD-2) MMP-9 protein level was found to be significantly increased in pT1 patients compared to pTa and pT2 patients. ($p = 0.018$, $p = 0.02$ respectively) Difference between SMAD-2 protein levels were not statistically significant. There was no significant difference between mRNA levels for MMP-9 and SMAD-2.

Conclusion: MMP-9 and SMAD-2 protein levels increase in patients with bladder tumors compared to the control group. The level of MMP-9 protein would be useful in detecting the pT1 phase, showing the invasion of lamina propria.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Mesanenin Morfolojisi

3.1.1. Anatomi

Mesane, pelvistepubis kemiklerin hemen arkasında yer alan içi boş, kas yapısında duvarı olan bir organdır. Boş mesane erişkinlerde simfizispubisin arkasında yer alırken, yeni doğan ve çocuklarda desensus tamamlanmadığı için daha yukarı konumdadır. Dolu iken pubisin üstüne yükselir ve kolaylıkla ele gelebilir.(1) Mesanenin en üst noktasını oluşturan apeks, simfizispubisin hemen yukarısında karın ön duvarına doğru uzanır ve embriyolojik dönemdeki urakusun bir artığı olan fibröz bantla (urakus) göbeğe bağlanır. Urakus; mesane duvarından kaynaklanan longitudinal düz kas liflerini içermektedir. Umblikusun yanında fibröz bir yapıya dönüşmüş ve oblitereumblikal arterlerden biri ile iştirak halindedir. Urakusun mesaneye bağlandığı noktada mesane duvar kası diğer kısımlara göre daha zayıftır. Urakusepitel ile döşeli lümeni devamlılık gösterir ve çok nadir olarak agresiv seyir gösterebilen urakaladenokanser oluşumuna neden olur.(2)

Mesane, kadında uterus ve vajinanın önünde, erkekte prostatın süperiorunda vesikula seminalislerin anterosüperiorunda bulunur. Süperior yüzey pelvikparietal peritonlaörtülüdür. Posterior yüzey taban olarak da bilinir, inferior ve posterior yüzleresahiptir. Trigon mesanenin tabanında olup, mesane boynu ile devamlılık göstererek üretraya açılır. Mesanenin üretraya açıldığı yere ostium üretra internum denir. Mesane boynu erkeklerde rektum, kadınlarda vajina üzerindedir. Mesanenin posterior anatomik komşulukları klinik olarak çok önemlidir.

Çünkü posterior duvardan kaynaklanan tümörler, invazyonla bitişik yumuşak dokuya ve komşu organlara yayılabilirler.(3)(4)(5).

Mesanenin süperior yüzeyi (kubbesi) pariyetal periton ile örtülüdür. Anteriorda periton karın ön duvarına doğru kıvrılıp uzanır. Mesane doluyken pelvisten dışarı doğru çıkmakta ve peritonu karın ön duvarından ayırmaktadır. Posteriora erkeklerde periton seminal vezikül seviyesinden geçer ve anterior rektumda sonlanır.(2) Kadınlarda ise posterioryüzey, uterus serviksine vajina üst kısmı ile komşuluk gösterir. Kadında superior yüzeyde periton uterus üzerine doğru refleksiyon gösterir ve böylece uterovezikal alanı, uterusunposterioruna doğru ilerleyerek de rektouterin alanı oluşturmaktadır.(2)Posterior yüzeyin anatomik ilişkileri mesane tümörlerinde bu anatomik yapıların tutulumu prognozu etkilediğinden dolayı klinik öneme sahiptir.Trigon mesane tabanına lokalizedir ve mesane boynunun arkasına uzanır. Üreterlertrigonda mesaneye oblik olarak girerler. Mesanenin en distal kısmı olan mesane boynu pelvikfasya ile sabitlenmiş haldedir ve erkeklerde prostat ile birleşip devamlılık gösterir.(2)(6)(7)

Mesane duvarı dört tabakadan oluşmaktadır epitel (ürotelyum), laminapropria, muskularis propria ve adventisya. Mesane iç yüzeyi değişici epitelyum ile kaplıdır. Bu yüzey hücre katmanlarından oluşmakta ve ince bir bazal membran üzerinde yer almaktadır. Bu yüzeyin derininde lamina propria tabakası yer almakta ve yoğun kan damarları ile ince bir mükölaris mukozayı içermektedir. Mesane duvarı düz kas tabakası ise lamina proprianın hemen altında yer almaktadır. Kas tabakası içte ve dışta longitudinal ortada ise sirküler şekilde sıralanmaktadır. Bu sıralama mesane üst kısmında tam seçilememekte ve kas lifleri birbirini içine girmektedir.(2)

Mesane, internal iliak arterden çıkan superior ve inferior vezikal arterler ile obturator ve gluteal arterlerin küçük dallarıyla beslenir. Kanlanması iyi bir organ olup damarlar arasında zengin anastomozlar vardır. Çevresi ve adventisyası altında çok zengin

venpleksusları bulunur. Bu pleksuslar, mesane ve prostatın ön, yan ve arka yüzlerini kuşatan geniş vezikal ve prostatikvenözpleksuslara, ön taraftan penisin dorsalvenini de alıp v.iliaca internaya açılırlar. Lenfatikleri ise sırasıyla vezikal, eksternal ve internaliliak ve ana iliak lenf nodüllerine boşalır. (8)

Mesanenin sempatik lifleri, torakal 11-12. ve lomber 1-2. segmentlerden gelir ve sonlanmaları alfa veya beta adrenerjiktir. Mesane tabanı ve proksimal üretrada alfa adrenerjik reseptörler, mesane kubbesi ve yan duvarlarda beta adrenerjik reseptörler daha yoğun olarak bulunur. Parasempatik lifler ise sakral 2-4. segmentlerden gelirler ve afferent ve efferent motor ve duyu liflerini taşırlar. (9)

3.1.2. Embriyoloji

Mesane ürogenital sinüs ve onu çevreleyen mezenşimden gelişir. 4.haftada kloaka mezoderminden gelişmeye başlar, ön primitif ürogenital sinüsten gelişimini sürdürür. Böbreklerin pelvisden çıkışı esnasında, 6-9.haftada da üreter alt ucu ilebirleşir. Kloaka dördüncü ve yedinci haftalar arasında ürorektal septum tarafından anorektal kanal ve ürogenital sinüs diye adlandırılan iki ayrı boşluğa bölünür. Ürogenital sinüsün en büyük parçası ürogenital sinüsün yukarı kesiminde yer alanmesanedir. Önceleri allantoisle bağlantılı olan mesanenin bu bağlantısı onbeşinci ve yirmiikinci haftalar arasında oblitere olur ve urakus adı verilen fibröz yapı halini alır. Mesane büyüdükçe mezonefrik kanallar emilir ve üreterler kendi açıklıklarına sahip olur.(10)

3.2 Mesane Kanseri

Mesane kanseri dünya genelinde tüm kanserler içinde erkeklerde dördüncü, kadınlarda sekizinci sıklıktadır.(11) Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı 2008 istatistiklerine göre erkeklerde üçüncü kadınlarda onbirinci sırada yer almaktadır.(12)2006 yılında ülkemizde yaşa bağlı

insidansta erkeklerde 9,6/100.000, kadınlarda 2,5/100.000 olarak bildirilmiştir.(13) Erkeklerde kadınlara göre 3-4 kat daha fazla görülmektedir. Mesane kanseri olgularının yaklaşık %90-95'i değişici epitel hücreli kanserdir. Yeni tanı alan mesane kanserli hastaların yaklaşık %75'i KİOMK iken, %25'i KİMK veya metastatik hastalıktır.(14)(15) Mesanede DEHK dışında skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom, undiferansiye karsinom, mikstkarsinom (değişici, glandular, skuamöz ya da undiferansiye) görülmektedir.

Mesane tümörü insidansı yaşla birlikte artar ve 60 yaşından sonra en yüksek orana ulaşır. şüphesiz ki mesane tümörü görölme sıklığı yaş, cinsiyet, ırk gibi genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir.(16)

3.2.1. Epidemiyoloji

Mesane kanseri dünya genelinde tüm kanserler içinde erkeklerde dördüncü, kadınlarda sekizinci sıklıktadır. 2006 yılında ölkemizde yaşa bağlı insidansta erkeklerde 9,6/100.000, kadınlarda 2,5/100.000 olarak bildirilmiştir.(13) Makroskopik hematüri mesane kanserinin en sık (%78.3) semptomudur.(17) Yeni tanı alan mesane kanserli hastaların yaklaşık %75'inde KİOMK, %25'inde ise KİMK veya metastatik hastalık görülmektedir.(14)(15) Kas invazyonu olan veya metastatik hastaların yaklaşık % 60'ı 5 yıl içinde ölmektedir.(18)

Mesane kanseri tedavi boyunca bilinen en pahalı maliyete sahiptir ve Türk sağlık ekonomisi üzerinde ciddi bir yüke sahiptir.(19) Mesane tümörleri sıklıkla 50 yaş üstünde görölür ancak genç erişkin ve çocuklarda da görülmektedir. Gençlerde göröldüğünde genellikle daha düşük dereceli ve daha iyi prognoz gösterme eğiliminde olmakla birlikte, aşırı agresiv tümörlerde buyaş grubunda rapor edilmiştir.(4) Otuz yaşın altındaki kişilerde tümörlerin daha iyi prognoza sahip oldukları ancak 31-40 yaş arasındakilerin daha yaşlı bireylerden prognoz aısından bir farkı olmadığı düşünölmektedir.(20)

Sağkalım oranları erkeklerde daha yüksek iken kadınlarda mesane kanserine bağlı ölüm riski erkeklerden %30 daha fazla olduğu saptanmıştır. Mesane kanseri insidansı son elli yılda %50 artmıştır.(17) Bu süre zarfında mesane kanseri mortalite oranı ise yaklaşık %30 azalmıştır.(21)

3.2.2. Etyoloji ve Risk Faktörleri

Mesane kanseri gelişiminde birçok etyolojik faktör vardır.

Sigara: Sigara içimi mesane kanseri gelişiminde en önemli risk faktörüdür. Erkeklerde mesane kanserlerinin %50-66'sının ve kadınlarda %25'inin sigaranın etkisiyle oluştuğuna inanılmaktadır.(20) Genel popülasyona göre risk 2-4 kat artmaktadır.(7)(22) Sigaranın miktarına ve kullanım miktarına bağlı olarak risk artar. Artmış riskten sorumlu tutulan en olası faktör sigaranın içerdiği aromatik aminlerdir.(23)(20) Sigara içimi ile sadece ürotelyalkarsinom değil aynı zamanda skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinomda da artmış risk söz konusudur. Sigaranın bırakılmasıyla mesane kanser riski azalır. Bu azalma 15 yıllık sürede içmeyenlerle eşitlenir.(23)

Mesleki kimyasallarla maruziyetin mesane kanserlerinin %5-25'inde rol oynadığı düşünülmektedir.(24) 1895 yılında Rehn tarafından boya endüstrisinde çalışanlar arasında mesane kanser insidansının yükseldiğini gösterilmiştir. Bu boyaların içerdiği anilin dışında, 2-naftilamin, 4-aminobifenil, 4-nitrobifenil 4-4 diaminobifenil 2-amino-1-naftol ve bazı yanıcı gazların karsinojen oldukları gösterilmiştir.(3)(25)

Meyve ve sebzeden fakir diyet ve kentsel hayat artmış mesane kanseri riski ile ilişkili bulunmuştur.(26)(27)

Bir analjezik olan fenasetinin aktif metaboliti asetaminofen yapı olarak anilin boyasına benzemekte, renal pelvis ve mesane transizyonel hücreli karsinomuyla ilişkilendirilmektedir.(28)

Birinci derece akrabalarda mesane kanseri olması riski 2 kat arttırmaktadır. Bu artmış riski açıklayacak net bir mendeliyan geçiş paterni bulunamamıştır.(29)

RB1 ve CDC91L1 yüksek penetranslı genlerin ürotelyalkarsinomlarla ilişkili olabileceği belirtilmektedir.(30)(31)

Mesane taşı ve kalıcı kateterizasyona bağlı kronik sistitte skuamöz hücreli kanser için risk bulunmaktadır. Şistozoma hematobiyum sistiti de Skuamöz hücreli kanser (SCC) için risk faktörüdür. Mısır'da endemik olan şistozomiazise bağlı olarak en sık görülen mesane kanseri SCC'dir. Şistozomiazis aynı zamanda mesane üroepitel karsinom riskini de artırmaktadır. Sistite bağlı karsinogeneizde mesanede nitrit ve N-nitrozo bileşikleri formasyonunun etkili olduğu düşünülmektedir.(18)(32)Kadınlarda jinekolojik malignite, erkeklerde prostat kanseri nedeniyle pelvik radyoterapi alan hastalarda mesane kanseri riski 2-4 kat artmıştır.(33)(34)(35) Kemoterapötik ajan olarak kullanılan siklofosamid süre ve doz bağımlı olarak mesane kanserine sebep olabilmektedir. Sorumlu metabolit olarak akrolein gösterilmektedir.(36)

3.2.3. Tanı

3.2.3.1. Bulgu ve semptomlar

Mesane kanserinde en sık görülen semptom ağrısız makroskopik pıhtılı hematüri olmakla beraber hastaların tamamına yakınında en azından mikroskopik hematüri bulgu olarak rastlanmaktadır.(37)Tekrarlayan hematüri varlığında mesane kanseri ön tanısı mutlaka düşünülmeli ve ileri tetkik yapılmalıdır. Bunun dışında sık idrara çıkma, disüri, urgency gibi irritatifsemptomlar görülebilir.(38)

Üreteralorifis tutulumunda yan ağrısı, kitle etkisine bağlı alt ekstremité ödemi ve pelvik kitle gözlemlenebilmektedir. Daha nadir olmakla birlikte hastalar ilerlemiş hastalık belirtisi olarak kilo kaybı, abdominal ağrı veya kemik ağrısı ile başvurabilirler.(21)

Mesane tümörlü hastalarda genellikle tipik bir fizik muayene bulgusu yoktur. Fakat anestezi altında boş mesane ile yapılacak bimanuel muayenede varsa pelvik kitle ve fiksasyon belirlenebilir. Metastatik hastalık düşünülen olgularda hepatomegali, supraklavikular veya inguinalenfadenopati yönünden hastalar incelenmelidir.

3.2.3.2. Değerlendirme ve tanı

Mesane kanseri açısından hasta değerlendirilirken iyi bir anamnez alınmalı, sigara, mesleki maruziyet, aile öyküsü ve alt üriner sistem semptomları iyi sorgulanmalıdır. İlk olarak tam idrar tahlili, idrar sitolojisi istenmeli ve radyolojik olarak üriner sistem değerlendirilmelidir. Yüzeyel tümörleri saptamada görüntüleme yöntemleri yetersiz kalabilmektedir. 19.yüzyılın sonlarında uygulanmaya başlayan sistoskopiye temel amaç tümörü gözle görmektir. (39)En iyi tanı yöntemidir. Sistoskopi eşliğinde yapılan biopsi ile tanı kesin olarak konur. Ancak yüzeyel veya karsinoma in situ (CIS) gibi lezyonlar klasik sistoskopi sırasındaatlanabilir. Bu tip tümörleri saptayabilmek için 5 – aminolevulinik asit (5 – ALA) ileyapılan flüoresan sistoskopi geliştirilmiştir. Güncel veriler incelendiğinde sistoskopinin yerini alabilecek, sistoskopiden daha duyarlı ve daha özgül olan üriner kaynaklı tümör belirteçleri bulunmamaktadır.(40)(41) İdrar sitolojisi mesane yüzeyinden dökülmüş hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesidir. Dökülen hücreler arasında normal veya neoplazik hücreler olabilir. Yüksek gradeli tümörlerde duyarlılığı daha yüksek olup %80'ler civarındadır.

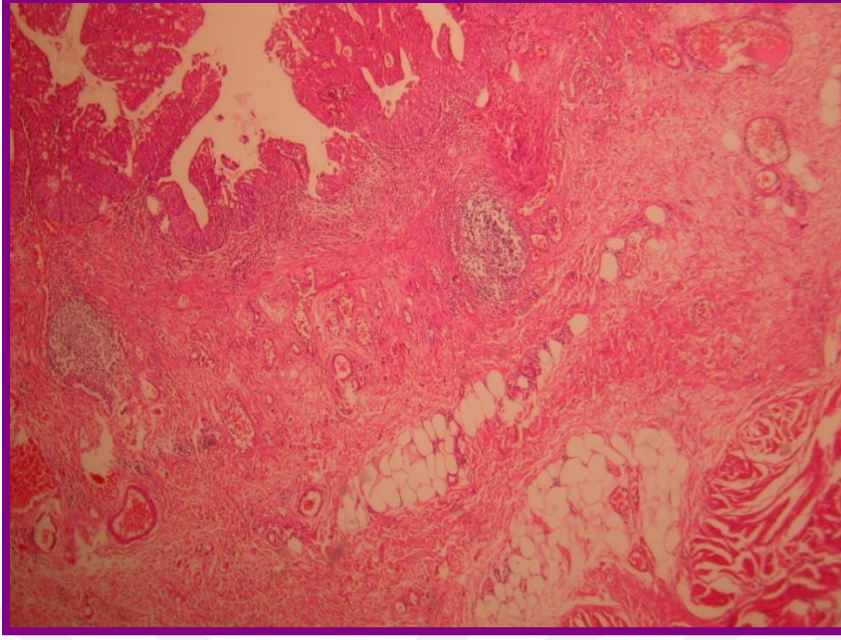
Noninvaziv ve ucuz olması, yüksek gradeli tümörlerde ve özellikle karsinomainsituda duyarlılığının yüksek olması bu testi tanı ve takiplerde vazgeçilmez yapmaktadır.

Mesane kanseri şüphesi olan veya mesane kanseri tanılı hastalara üst üriner sistem değerlendirmesi için USG, BT ürografi veya MR ürografi yapılmalıdır. Senkronize üst üriner sistem tümörü düşük oranda da olsa çıkabilmektedir. Mesane kanseri ve üst üriner sistem taramasında USG yeterli olduğu savunulmakla birlikte BT ve MR ürografi ile tanının doğruluğunun desteklenebileceği belirtilmiştir.(42)(43) Kasa invaze mesane kanseri tanılı hastalarda evrelendirme ve uzak yayılımı değerlendirmek için BT görüntüleme yapılması gerekir.(42)

Bilgisayarlı tomografi (BT) tümörün yaygınlığını, derinliğini göstermede, uzak metastazları ve lenf nodu metastazı değerlendirilmesinde oldukça etkili bir yöntemdir. Manyetik rezonans görüntülemenin BT'ye çok üstünlüğü yoktur. Kemik veya karaciğer metastazı varlığında BT'nin yetersiz kaldığı durumlarda üstünlüğü vardır. Ayrıca kontrast alerjisi olanlarda tercih edilebilir.

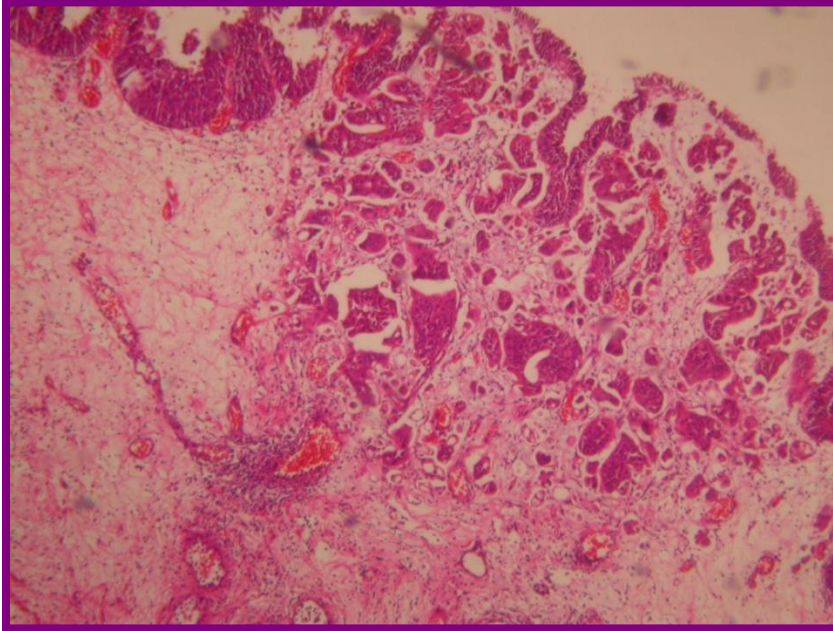
3.2.3.3. Evrelendirme ve prognoz

Evrelendirme mesane karsinomlarında tedavi ve prognozun değerlendirilmesinde önemli bir faktördür.(44)(45) Rezeksiyon tümör boyutuna göre değişebilmektedir, komplet veya inkomplet olabilir. Rezeksiyon kas dokusu içermelidir ve rezeksiyon sırasında koterizasyondan kaçınılmalıdır.(42) Tümör (T), nod (N), metastaz (M) sınıflama sistemine göre mukozayı tutan, lamina propria invazyonu yapmayan tümör Ta, lamina propria invazyonu yapan tümör T1, detrusorü invaze eden tümörler T2 olarak bilinmektedir. Evrelendirme sistemi 1973 ile 2004 yılları arasındaki sınıflandırmalar sonrası 2016 yılında güncellenmiştir ve bu yeni güncelleme açık tanımlamayı ve standart terminolojiyi olağan kılmaktadır.(46)(47)



Şekil 1-1 Normal mesane mukoza, lamina propria ve muskularis propria

(İ.Ü. İ.T.F Patoloji A.D. Prof. Dr. Işın KILIÇASLAN'nın izniyle)



Şekil 1-2 Mesane kanseri lamina propria invazyonu

(İ.Ü. İ.T.F Patoloji A.D. Prof. Dr. Işın KILIÇASLAN'nın izniyle)

3.2.3.4. Rekürrens ve progresyon

Kasa invaze olmayan mesane tümörü, Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Organizasyonu (European Organization for Research and Treatment of Cancer-EORTC) tarafından rekürrens ve progresyon açısından düşük, orta ve yüksek risk olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Bu skora sistemi klinik ve patolojik faktörler göz önüne alınarak geliştirilmiştir. Bunlar; tümör sayısı, tümör çapı, rekürrens sayısı, T kategorisi, eşzamanlı CIS varlığı ve histolojik grade'dir.

Tablo 1: Rekürrens ve progresyon skor hesaplaması:

FAKTÖR	REKÜRRENS	PROGRESYON
TÜMÖR SAYISI		
TEK	0	0
2-7	3	3
≥ 8	6	3
TÜMÖR ÇAPI		
< 3 cm	0	0
≥ 3 cm	3	3
ÖNCEKİ REKÜRRENS SAYISI		
PRİMER	0	0
≤ 1 REKÜRRENS/YIL	2	2
> 1 REKÜRRENS/YIL	4	2
KATEGORİ		
Ta	0	0
T1	1	4
KONKOMİTAN CIS		
HAYIR	0	0
EVET	1	6
Grade (1973 WHO)		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
TOPLAM SKOR	0-17	0-23

CIS = Karsinoma in situ

Tablo 2. .EORTC Rekürrens ve Progresyon Skoru Değerlendirme Tablosu

Rekürrens Skoru	1 yıldarekürrens olasılığı (%95 CI)	5 yıldarekürrens olasılığı (%95 CI)	Rekürrens risk grubu
0	%15 (%10, %19)	%31 (%24, %37)	Düşük risk
1-4	%24 (%21, %26)	%46 (%42, %49)	Orta risk
5-9	%38 (%35, %41)	%62 (%58, %65)	Orta risk
10-17	%61 (%55, %67)	%78 (%73, %84)	Yüksek risk
Progresyon Skoru	1 yıldaprogresyon olasılığı (%95 CI)	5 yıldaprogresyon olasılığı (%95 CI)	Progresyon risk grubu
0	%0,2 (%0, %0.7)	%0.8 (%0, %1,7)	Düşük risk
2-6	%1 (%0.4, %1,6)	%6 (%5, %8.0)	Orta risk
7-13	%5 (%4.0, % 7.0)	%17 (%14, %20)	Yüksek risk
14-23	%17 (%10, %24)	%45 (%35, %55)	Yüksek risk

3.2.4. Sınıflandırma

3.2.4.1. Tümör, Nod, Metastaz Sınıflaması (TNM)

2017 TNM klasifikasyonu yaygın kabul gören sınıflama sistemidir.

T PRİMER TÜMÖR

Tx =>Primer tümör değerlendirilememiş

T0 => Tümöre ait kanıt yok

Ta =>Noninvazivpapillerkarsinom

Tis =>Karsinomainsitu

T1 =>Laminapropriainvazyonu

T2 => Kas dokusu invazyonu

- T2a =>Yüzeyel kas dokusu (kasın iç yarısı)

- T2b =>Derin kas dokusu (dış yarısı)
- T3 =>Perivezikal yayılım
- T3a=>Mikroskopik
- T3b =>Makroskopik (ekstravezikal kitle mevcut)
- T4 =>Ekstravezikal komşu organ tutulumu
- T4a =>Prostat, uterus veya vajina invaze
- T4b =>Pelvis duvarı veya karın duvarıinvaze

LENF NODU İNVAZYONU

Nx=> Lenf nodu değerlendirilemiyor

N0=>İnvazyon yok

N1=> Gerçek pelviste tek lenf nodu metastazı

N2=> Gerçek pelvistemultiple lenf nodu metastazı (hipogastrik, obturator, eksternaliliak, presakral)

N3=> Ana iliak lenf nodu metastazı

METASTAZ

M0=> Uzak metastaz yok

M1=> Uzak metastaz var

-M1a=> Bölgesel lenf düğümleri dışında lenf düğümlerine metastaz

-M1b=> Diğer uzak metastazlar

3.2.4.2. Histolojik Derecelendirme

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Ürolojik Patoloji Cemiyeti (ISUP) tarafından yeni derecelendirme sistemi hazırlanarak 2004 yılında yayınlanmış ve 2016 yılında güncellenmiştir. Önceki derecelendirme sistemine göre daha detaylı histolojik tanımlar kullanılmıştır.

1973 WHO derecelendirme sistemi:

Üretelyalpapilloma

Grade 1: İyi differansiye

Grade 2: Orta differansiye

Grade 3: Kötü differansiye

2004-2016 WHO/ISUP derecelendirme sistemi:

Ürotelyalpapilloma

Düşük malign potansiyelli papillerürotelyalneoplazm

Düşük gradelikarsinom

Yüksek gradelikarsinom

3.2.5. Tedavi

Mesane kanserinde uygulanacak tedavi şekli tümörün derecesi, evresi ve davranışına göre farklılıklar göstermektedir. Tedavide altın standart olarak tümörün transuretral rezeksiyonu (TUR-T) ile başlanır. Mesaneyi tam olarak görmek ve uygun evrelendirme için kas dokusu içerecek şekilde rezeksiyon yapmak için gereklidir. Daha sonra tümör evresine göre tedavi planı yapılır. Bu doğrultuda; yüzeysel (kasa invaziv olmayan (Ta, T1, Tcis)), kasa invaziv (T2, T3a, T3b, T4a) ve metastatik (T4b, N+, M+) mesane kanseri olarak üç gruba ayrılabilir.

Genel olarak klavuzlarda KİOMK olgularında endoskopik rezeksiyon ve risk gruplarına bağlı olarak intravezikal tedavi önerilirken, KİMK olgularında kemoterapili veya kemoterapisiz sistektomi önerilmektedir.

3.2.5.1. KİOMK Tedavi

Tanı anında hastalığın %70-80'ini oluşturan bu gruba kasa invaze olmayan mesane kanseri tanımı son zamanlarda kullanılmaktadır.

Burada ilk tedavi yaklaşımı yüzeyel kas tabakasını da içerecek şekilde TUR-T uygulanmasıdır. Rezidü tümör hücrelerine yönelik intravezikal tedaviler de uygulanmaktadır.(48)

İntravezikaladjuvan tedavi orta ve yüksek riskli hastalarda önerilmektedir. Tüberküloza karşı kullanılan bir aşı olan BacillusCalmetteGuérin (BCG)'nin mesane tümöründe hem rekürrensi azalttığı hem de progresyonu geciktirdiği ve kemoterapiden daha üstün olduğu birçok randomize kontrollü çalışmada ve metaanalizde bildirilmiştir.(49)(50)

BCG tedavisi için birçok protokol bildirilmiştir. İdame BCG tedavisi; orta riskli hasta grubunda 1 yıl, yüksek riskli hasta grubunda tolere edilebilirse 3 yıl tam doz olacak şekilde uygulanmalıdır. İdame BCG tedavisi uygulanan hasta grubunda uygulanmayanlara göre %37 azalmış progresyon riski bildirilmiştir.(51)(52)

BCG başarısız ve tedaviyi tolere edemeyen hastalara radikal sistektomi (RS) önerilmelidir.

İntravezikal kemoterapötik ajanlar (mitomisin, doksorubisin, epirubisin ve pirarubican) TURT sonrası ilk 24 saatte uygulanmalıdır. İntravezikalkemoterapi düşük riskli hastalarda önerilmektedir. Hemen uygulanan intravezikal kemoterapi sonrası ilk 1 yılda %40, 5 yılda %15 oranında rekürrens riskinde azalma bildirilmiştir.(53)(54)

İntravezikal kemoterapi artmış komplikasyon riski nedeniyle TURT sırasında perforasyon veya KİMK şüphesi varsa uygulanmamalıdır.

3.2.5.2. KİMK Tedavi

Lokalize kas invaziv mesane kanserinde amaç tam kür sağlamaktır, altın standart yaklaşım radikal sistektomidir. Ancak seçilmiş hastalarda parsiyelsistektomi gibi mesane koruyucu yaklaşımlar uygulanabilmektedir. Bunlara ilave olarak saptanamayan mikrometastazlar için kemoterapi ve radyoterapi verilebilir.(55)

Sistektomi öncesi verilen neoadjuvan veya sonrasında verilen adjuvan kemoterapinin sağ kalımı arttırdığı düşünülmektedir.(56)

Transüretral rezeksiyonuyla da tek başına kanser kontrolü sağlanabilmektedir. Yapılan iyi rezeksiyon sonrası %78 re-TUR gerektirirken %26 hasta radikal sistektomi ihtiyacı duymamaktadır.(57) Yakın ve iyi takip edilebilen uygun hastalarda tek başına TUR yeterli tedavi olabilmektedir.(58)

Radyoterapinin primer mesane kanseri tedavisinde tek başına etkinliği tartışmalıdır, yeterli çalışma yoktur. Mesane koruyucu yaklaşımlar yaşlı, sistemik sorunları olan, uzun süreli anestezi alamayacak veya sistektomi istemeyen hastalarda tercih edilebilir.

3.2.5.3. Metastatik Hastalık

Metastatik hastalıkta standart tedavi sisplatin içeren kemoterapi kombinasyonlarıdır. MVAC (metotreksat, vinbastin, doksorubisin, sisplatin) ve GC (gemzar, sisplatin) tedavilerinin birbirine üstünlüğü gösterilememiştir.(59) PCG (paclitaxel, cisplatin and gemcitabine) protokolü de yeni seçeneklerden olup ilaca yanıt iyi olsa da MVAC veya GC protokollerine ortalama sağkalım süresinde üstünlük sağlamamaktadır.(55)

3.2.5.4. Multimodal (Trimodal) Yaklaşım

KİMK'ne yönelik güncel mesane koruyucu tedavi yaklaşımı TUR, radyoterapi ve kemoterapinin kombinasyonu şeklindedir. Bu protokolde, maksimal TUR ve radyoterapi ile hastalığın lokal olarak kontrolü amaçlanırken, sistemik kemoterapi ile var olan mikrometastazlar tedavi edilmeye çalışılır. İndüksiyon radyoterapisi ve yapılan kemoterapi sonrasıTURT ile yapılan ara değerlendirmede veya tedavinin tümü tamamlandıktan sonra 3 ay içerisinde yapılan değerlendirmede tedavi başarısızlığı saptanırsa, hastaya RS önerilmelidir. Multimodal tedavide indüksiyon radyoterapisi 40 Gy'dır.Bununla birlikte birçok protokolde

doz 65 Gy'e tamamlanmaktadır. Multimodal tedavide kemoterapi rejiminin temelini sisplatin oluşturmaktadır.

Yapılan bir çalışmada 331 multimodal tedavi hastası ile 142 maksimal TUR + RT hastası karşılaştırılmış ve multimodal tedavinin daha fazla sağkalım avantajı (70'e karşı, 28.5 ay, $p < 0.001$) sağladığı bildirilmiştir.(60)

3.3.3.Mesane Tümörü Belirteçleri

Mesane tümörü tanısında ve takibinde altın standart sistoskopi olsa da invaziv ve pahalı bir işlem olduğundan dolayı kullanımı kolay, ucuz ve noninvaziv yöntemler araştırılmaktadır. Yüksek prevelans ve rekürrens oranlarından dolayı sık girişimsel işlemlere yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir moleküler belirtecin varlığı hem klinisyene kolaylık sağlar hem de hastanın hayat kalitesini yükseltebilir. Bunlar aşağıda sıralanmıştır.

3.3.1.1. İdrar Sitolojisi

Malign ürotelyal hücrelerin idrarda veya mesane yıkama sıvısında mikroskopik olarak görülme esasına dayanır. Bu hücreler büyük, irregüler nükleusu olup nükleus/sitoplazma oranı artmıştır. İyi diferansiye tümör hücrelerinin daha iyi tutunması nedeniyle iyi farklılaşmış, düşük gradeli tümörlerde duyarlılığı düşmektedir. Yapılan çalışmalarda yüksek gradeli tümörlerde %38-65 arasında pozitif olarak saptanmıştır. Bu oran G3 tümör rekürrensinde %33-95, evre T2 üstü tümörlerde %37-100 olarak raporlanmıştır.(61) Deneyimli sitolojistler tarafından yapıldığında iyi sonuçlar vermekte olsa da düşük gradeli tümörlerde %4-31'lere varan düşük duyarlılık nedeniyle tek başına yeterli değildir. Sistoskopinin tamamlayıcısı olarak düşünülmelidir.(61) Sonuçlanması 1 hafta gibi süre alması dezavantajlarından.

İnflamasyon, ürotelyalatipi, kemoterapi veya radyoterapiye bağlı değişiklikler nedeniyle %1-12 yanlış pozitif sonuç vermektedir.(62) Özgüllüğü en yüksek belirteç olarak belirtilebilir.

3.3.1.2. Diğer Tümör Belirteçleri

Tümör belirteçlerinin mantığı idrarda çözünen maddeleri veya dökülen hücreleri inceleme esasına dayanır. BTA Stat (BladderTumorAntigen) ve BTA TRAK, mesane kanserli hastanın idrarında insan kompleman faktör H ilişkili proteini saptamaya yönelik immunokromatografik bir testtir.(63) %73 duyarlılığı ve %83 özgüllüğü saptanmaktadır ve grade yükseldikçe sensitivitenin de arttığı raporlanmıştır.(64) İntravezikal tedavi, enfeksiyon ve taş yanlış pozitif sonuca neden olabilir. BTA TRAK kantitatif bir yöntemdir ve alt sınır 14U /ml olarak kabul edilir.(65)

Nükleer matriks proteinleri (NMP) hücre çekirdeğinin yapı taşlarıdır ve çekirdeğin şeklinin korunmasını sağlarlar. Bu protein ailesinden NMP-22 üroepitelyal hücrelerde daha sık izlenmektedir. Armış apoptozis ile birlikte NMP-22 idrara daha çok salınır, idrarda sağlıklı kişilere göre daha fazla izlenir. Yapılan çalışmalarda duyarlılığı % 47-100, özgüllüğü %60-90 olarak bulunmuştur.(66) İnflamatuvar ve enfeksiyöz durumlarda, üriner taş, diğer genitoüriner kanserler gibi hücre yıkımının arttığı durumlarda yalancı pozitifliğe neden olabilmektedir. Pozitif değer olarak 10 U/ml üstü kabul edilmektedir.(67)

UBC (UrinaryBladderCancer) idrarda sitokeratin 8 ve 18'in saptanmasına yönelik bir testtir. Sitokeratinler hücre içi proteinlerdir ve hücre ölümüyle birlikte idrarda yüksek saptanabilir. Sınır değeri 9,7µg/l kabul edildiğinde duyarlılığı ve özgünlüğü %87 olarak bildirilmiştir.(68) Ancak çeşitli çalışmalarda sınır değer 0,16µg/l ile 15µg/l arasında değerlendirildiğinden ve metaanaliz yapılamadığından klinik kullanım için henüz elverişli değildir.

Mikrosatellit analizi son yıllarda insan genomundaki mutasyonları saptamaya yönelik yapılmaktadır. En sık görülen kromozom 9'daki heterojenite kaybıdır. Bunun dışında

kromozom 4p, 8p, 9p, 11p ve 17p 'deki heterojenite kaybı sık görülmektedir. Yapılan sınırlı çalışmalarda en yüksek duyarlılık ve özgünlüğe rağmen maliyetinin yüksek olması ve eğitimli personel gerektirmesi dezavantajlarıdır.(69)

Urovysion, kromozom 3, 7 ve 17'deki anöpoidi ve bunun yanında P16 tümör süpressör gen üzerindeki 9p21 lokusunun kaybını saptamaya yönelik hibridizasyon yöntemidir. Sitolojiden daha iyi sonuçları olmasına rağmen yüksek yalancı pozitif sonuçlar saptanmaktadır. Ancak yapılan bir çalışmada yanlış pozitif olarak değerlendirilen hastaların %89'unun 12 ay içinde tümör geliştirdiği ve rekürrens gelişen hastaların %85'inde pozitif saptandığı görülmüştür.(70)

Bu belirteçler dışında birçok belirteç araştırılmış ve ideal belirteçi bulabilmek adına araştırılmaya devam etmektedir. Bunlardan bazıları;

BLCA-4 ve BLCA-1 (BladderCancerSpecificNuclearMatrix Protein), çekirdek transkripsiyonunda görev alan nükleer matriks proteinleridir. BLCA-4 normal dokularda bulunmaz,(71) mesane kanserinde idrarda bulunmaktadır.

Survivin, normalde fetal dokulardan salgılanan apoptozis inhibitörü bir proteindir. Çeşitli kanserlerde yükseliyor olması potansiyel bir tümör belirteçi olabileceğini düşündürmektedir.(71)

Sitokeratin-20, hücre iskeletini oluşturan proteinlerdir ve PCR ile mRNA ekspresyonu saptanır.(71)

CYFRA 21-1 (cytokeratinfragments), hücre iskeletini oluşturan sitokeratin-19'un çözünebilir parçasını idrarda saptamaya yönelik testtir.(71)

HA-HAase testi, hyaluronik asit tümör metastazında rol oynadığı düşünülen bir glikozaminoglikandır. Hyaluronidaz ise bu molekülü parçalar. Testin pozitif kabul edilebilmesi için ikisinin de referans değerlerinin üzerinde olması gerekmektedir.(71)

Telomeraz; telomerlerökaryotik hücre kromozomlarının sonunda bulunan tekrarlayan serilerdir(ör. TTAGGG). Bu telomerlerin yıkımıyla hücre yaşlanması sağlanır ve apoptozis gerçekleşir. Telomeraz kanserli hücrelerden salınan bir ribonükleoproteindir ve kromozomların sonuna telomer ekleyerek hücreyi ölümsüzleştirir.(71)

DD-23, normal dokulara bağlanmayan, kansere özgü bir protein dimerini tanıyan monoklonal bir antikordur.(71)

Quanticit Nükleer Karyometride hücre çekirdeğinin özellikleri (şekil, DNA yapısı vs.) ışık mikroskopisi aracılığıyla bilgisayara aktarılır. Bu çekirdek yapısı özel programlarla analiz edilerek mesane kanseri riski tayin edilir.(71)

Levis-X antijeni hücre yüzeylerinde bulunan kan grubu antijenidir. Normal mesanede sadece şemsiye hücrelerinde bulunur. Transizyonel hücreli karsinomda evre ve gradeden bağımsız olarak epiteldeeksperese edilir.(71)

3.3.1.3. MMP-9 ve SMAD-2 moleküllerinin mesane kanserindeki yeri

➤ MMP-9

Hücre matriks etkileşimleri, ekstrasellüler matriks (ESM) bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan MMP-9'un da içinde bulunduğu proteolitik enzimler tarafından düzenlenir. Bu enzimler ESM yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin denetlenmesi, hücre çoğalması, farklılaşması ve hücre ölümünde de temel rol oynar. Bu enzim sistemlerinin içinde Matriks Metalloproteinazlar (MMP) önemli bir yer tutar. MMP'ler, ESM bileşenlerini yıkıma uğratan Zn^{++} ve Ca^{++} bağımlı endopeptidaz ailesidir. Türlerine göre; endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, damar düz kas hücreleri, T lenfositler, trombositler, kondrositler, keratinositler, epitel hücreleri mezenşimal hücreler, nötrofiller, trofoblastlar ve osteoblastlar gibi çok çeşitli hücre tipleri tarafından üretilirler.(72)MMP' ler doku yeniden yapılanması, morfogenezis, yara

iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar. MMP'lerin ekspresyon düzeyleri sağlıklı yetişkinlerde genel olarak düşüktür. MMP gen ekspresyonu TNF- α , TGF- β , İL-6 İL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve hormonlar ile uyarılır. Artrit, kanser, ateroskleroz, ülser, fibrozis ve anevrizma gibi patolojilerde MMP ekspresyonunda artış görülmektedir.(73)

MMP enzim ailesi, kollojenazlar (MMP-1, -8, -13, -18), stromelizinler (MMP-3, -7, -10, -11, -12), jelatinazlar (MMP-2, -9) ve membran tip MMP'ler (MT-MMP-14, -15, -16, -17) olmak üzere 4 farklı gruptan oluşmaktadır. Ayrıca yeni tanımlanan MMP-4, -5, -6, -19 ve -20 bu grupların içerisinde değerlendirilmemektedir.(73)

Tip IV kollajen, bazal membranların ana bileşenidir ve bazal membran toplam proteininin %40-65'ini oluşturur. Tip IV kollajenin parçalanmasında görevli ana enzim jelatinaz B(MMP-9) dir.(74)(75)

➤ **SMAD-2**

Karsinogenezde TGF- β 'nın antitümoral immun cevabı baskılanır. TGF- β bir onkogen gibi davranmaya başlar. PPM1A ((protein fosfataz, Mg²⁺ + / Mn²⁺ + bağımlı 1A); serine / threonine protein fosfatazlarının PP2C ailesinin bir üyesi); TGF- β ile fosforile edilmiş SMAD-2-3'ü defosforilleyerek aktif SMAD kompleksinin miktarını ve nükleustan salınımını artırır. Böylece TGF- β nın hücre/hücre etkileşimi üzerindeki kontrol mekanizması bozulur ve TGF- β nın etkisi ile hücre/hücre adezyon reseptörü olan E-cadherin sentezi baskılanır. Hücreler arasında adezyonun bozulması ile birlikte hücreler hareketlilik kazanır, epitelyal - mezenkimal geçişin uyarılmasıyla kanser hücresi motilitesi, invazivliği ve metastazı artmış olur.(76)(77)(78)(79)

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Çalışmaya 2017-2018 yılları arasında İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda takipli; klinik, radyolojik ve patolojik olarak mesane kanseri tanısı alan 57 hasta ve 20 sağlıklı kontroldahiledilmiştir. Çalışmaya dahil olan mesane kanseri tanılı hastalar öncesinde değerlendirilmiş olup başka primer malignitelerinin olmadığı, çalışma sırasında idrar yolları enfeksiyonu olmadıkları ve serum MMP-9 ve SMAD-2 değerlerini yükseltebilecek patolojilerinin bulunmadığı teyit edilmiştir. Mesane kanserli hastaların yaş ortalaması 68 (46-81) olarak belirlendi. 57 mesane kanserli hastanın 44'si KİOMK, 13'ü KİMK olarak tanımlanmıştır. 44 KİOMK hastanın 28'i pTa, 16'sı pT1 ve 13'ü pT2 olarak sınıflandırılmıştır. Mesane kanserli hastaların özellikleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Hastalardan alınan kanlar 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Hettich Universal 32) edildikten sonra, ayrılan serumlar test sayısı tamamlanıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Tablo 4-1: Mesane kanserli hastaların özellikleri

	N(%)
Hasta sayısı	57(100)
Yaş ortalaması (yıl) 68 (46-81)	28(49)
Cinsiyet E/K	53/4(93/7)
Sınıflandırma • kiOMK • kiMK	44(77) 13(23)
Patoloji (pT) pTa pT1 pT2	28(49) 16(28) 13(23)

4.2. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

4.2.1. RNA İzolasyonu

1.5 ml ependorf tüplere 200 µl serum üzerine 800 µl Trizol eklenerek homojenize edildi. 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüplere 200 µl kloroform eklenerek 5 dk. oda

sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12000x g' de 15 dk santrifüj edildi. Fazlara ayrılan homojenattan üst sıvı alınarak yeni 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. 550 µl izopropanol eklenerek 5-10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. 12000x g' de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak peletin üzerine 1 ml %75'lik soğuk etanol eklenerek vortekslendi. 7500xg' de 5 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak elde edilen RNA RNaz içermeyen su içerisinde çözüldü.

4.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Yukarıda anlatılan protokolle elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için ticari olarak temin edilen kit kullanıldı. cDNA sentezi için, 0,5 ml'lik PCR tüplerine 6 µl total RNA, 0,5 µl random hekzamer primeri ve 6 µl dH₂O eklendi. Daha sonra, Tablo 4-2'de gösterilen reaksiyon bileşenleri sırasıyla karıştırılarak konvansiyonel PCR'ayerleştirildi. cDNA sentezinin reaksiyon koşulları Tablo 4-3'de verilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 4-2: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek
SCRIPT RT Reaksiyon Tamponu	4 µl
10 mM Deoksinükleotid Karışımı	1 µl
DTT stok solüsyonu	1 µl
RNaz inhibitörü	1 µl
SCRIPT Reverse Transkriptaz	0,5 µl

Tablo 4-3: cDNA sentezinin gerçekleştirildiği reaksiyon koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre
42	10 dk.
50	60 dk.
70	10 dk.

Tablo 4-4: Kullanılan primerler

Gen Adı	İleri yönlü primer F (5'-3')	Ters yönlü primer R (3'-5')
MMP-9	AACCAATCTCACCGACAGG	CGACTCTCCACGCATCTC
SMAD-2	CTTTGTGCAGAGCCCCAATT	CTTGTTACCGTCTGCCTTCG

4.2.3. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

MMP-9 ve SMAD-2 moleküllerinin ekspresyon düzeyleri SYBR GreenMaster PCR Kit (Jena Bioscience) kullanılarak LightCycler 480 (Roche) cihazında gerçek zamanlı PCR ile analiz edildi. mRNA ekspresyonu normalizasyon işlemi GAPDH ile gerçekleştirildi. RT-PCR koşulları GreenMaster PCR protokolüne göre seçildi.

RT-PCR konumunu takiben, “erime eğrisi analizi” (melting curve analysis) gerçekleştirildi. Bunun amacı oluşan RT-PCR ürünlerinin istenilen gerçek ürünler olup olmadığının teyit edilmesidir ve özgül olmayan ürünler ile primer dimerleri gibi ikincil yapıların dışlanmasıdır. Bu yöntem RT-PCR ürünlerinin erime sıcaklıkları (T_m) analiz edilerek yapılmaktadır. Bunun için örnekler, 55 °C’den 95 °C’ye kadar saniyede 0.2 °C’de artan bir ısı yükselmesine tabi tutulur. Bu süreçte, RT-PCR ürünün bileşenine bağlı olarak, yaklaşık 75-80 °C aralığında erime eğrileri ortaya çıkmaktadır.

RT-PCR reaksiyonunda, floresan düzeyinin cihaz tarafından ölçülebilen eşik değeri aştığı döngü Ct (cycle treshold) olarak adlandırılır. Elde edilen Ct değerine göre, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak gen ifadeleri hesaplandı ve değerlendirildi.

$$\Delta\Delta Ct = (C_{thedef} - C_{treferans})_{örnek} - (C_{thedef} - C_{treferans})_{kontrol}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(C_{thedef} - C_{treferans})_{örnek} - (C_{thedef} - C_{treferans})_{kontrol}]}$$

Tablo 4-5: Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon Koşulları

Polimeraz Aktivasyonu	95	2 dak.
Denatürasyon	95	15 sn
Bağlanma	55	20 sn
Sentez	72	30 sn

Tablo 4-6: Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon Bileşenleri

RT-PCR reaksiyon bileşenleri	Örnek
Qpcr GreenMaster	10 µl
Primer F	0.6 µl
Primer R	0.6 µl
cDNA	3 µl
d H₂O	5.8 µl
TOPLAM	20 µl

4.2.4. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- cDNA Kit (Jena Bioscience GmbH ,Germany)

4.3. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

4.3.1. ELISA Yöntemi

ELISA terimi “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” sözünün baş harflerinden oluşur. Ayrıca EIA Enzyme Immunoassay olarak da bilinmektedir. Bu yöntem, kantitatif olarak protein miktarını belirlemek için kullanılan yöntemlerden biridir. ELISA yönteminde protein miktarını belirlemek için yapılan işaretleme radyoaktif maddelerle değil, enzim aracılığıyla yapılmaktadır.

Bu yöntemin temelinde bileşenlerinden biri solid faza kaplanmıştır. Bu solid faz küçük kürecikler veya mikrotiter plaklar olabilir. Bu özellik serbest veya bağlanmış işaretli moleküllerin ayrılmasına yardımcı olur. Bilinen miktarda antijen ihtiva eden standartlar ve örnekler kuyucuklara eklenip bunların antikor kaplı yüzeye bağlanması sağlanır. Bağlanmayan antijenin yıkama işlemi ile uzaklaştırılmasından sonra bağlanan antikordan farklı enzim işaretli ikinci bir antikor ortama ilave edilir. Bu şekilde oluşan komplekse Antikor- Antijen- Antikor “enzim solid faz sandviç kompleksi” denir. Bağlanmamış durumdaki sekonder antikorlar yıkama işlemi ile uzaklaştırılır ve sonraki aşamada renk ile miktar ölçümü için enzimin substratı ortama eklenir. Enzim substratı ile etkileştiğinde örnekteki antijen miktarı ile doğru orantılı renk reaksiyonu oluşur. Bu renk reaksiyonun absorbansı spektrofotometrede belli dalga boyunda okunur ve konsantrasyonu bilinen standartlarla çizilen standart eğri yardımıyla örneklerle ait konsantrasyonlar belirlenir.

4.4.Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- MMP-9 Elisa Kit (YH Biosearch Laboratory, Co.,Ltd ,Abbkin Inc China)
- SMAD-2 Elisa Kit (YH Biosearch Laboratory, Co.,Ltd , Abbkin Inc China)

❖ Testlerin Yapılışı

Hastaların serum MMP-9 ve SMAD-2 (Yehua Biological Technology Co.,Ltd , Abbkin Inc China) protein düzeyleri 450nm'de absorbans ve otomatik konsantrasyon okunması ELISA okuyucusunda (ChroMate 4300 Microplate Reader,USA), gen ekspresyon seviyeleri (Jena Bioscience GmbH,Germany) RT-PCR ile gerçekleştirildi.

Serum örnekleri -80°C'den çıkartılarak oda sıcaklığına getirildi.

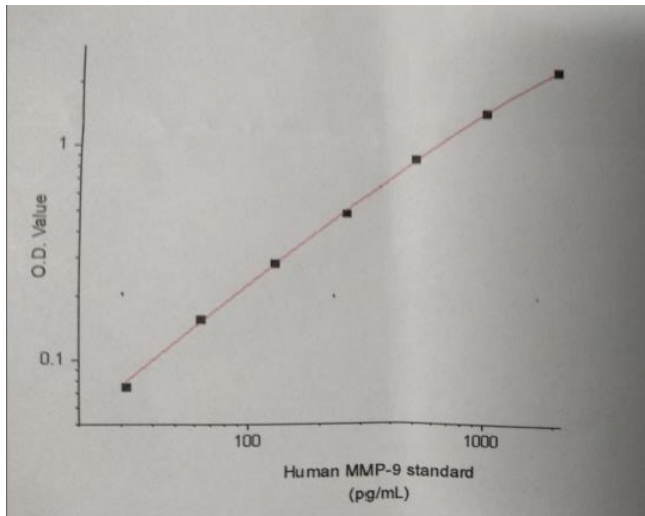
4.4.1. MMP-9 Düzeylerinin Belirlenmesi

MMP-9 düzeylerini belirlemek için kullanılacak 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml ve 31.25 pg/ml değerlerinde standartlar 2000 pg/ml stok standarttan Standard Diluent Buffer kullanılarak hazırlandı.

Tüm antikor kaplı kuyucuklara 100 µL serum örnekleri ve 100 µL MMP-9 antikoruna otomatik pipet yardımıyla uygulandı. 37°C sıcaklıkta 2 saat inkübasyon uygulandı. 3 kez yıkama işlemi yapıldı. 100 µL MMP-9 antikoruna otomatik pipet yardımıyla uygulandı. 37°C sıcaklıkta 1 saat inkübasyon ve sonrasında 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

Tüm mikrokuyucuklara 100 µL streptavidin-HRP eklendi. Antikor- antijen-antikor kompleksinin oluşması için mikrokuyucuklar 37°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. 300 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıp iyice kurutulduktan sonra 100 µL durdurma solüsyonu ilavesiyle durduruldu. 15 dakika boyunca 37°C

sıcaklıkta ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 50 µL durdurma solüsyonu ilavesiyle 450 nm’de ELISA okuyucuda (ChroMate 4300 Microplate Reader) örneklerin absorbansları ve konsantrasyonları ayrı ayrı okundu. Absorbansları okunan ve değerleri bilinen standartlar yardımıyla çizilen standart eğriden hesaplanan konsantrasyon değerleri otomatik olarak okunan konsantrasyonlarla karşılaştırıldı.



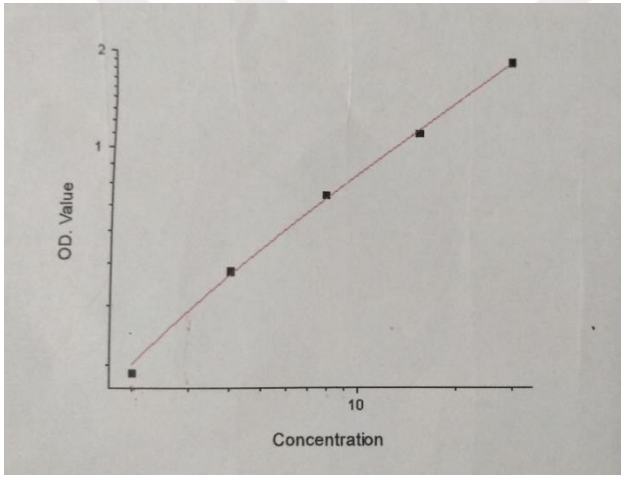
Şekil 4-1: MMP-9’un Çizilen Standart Grafiği

4.4.2. SMAD-2 Düzeylerinin Belirlenmesi

SMAD-2 düzeylerini belirlemek için kullanılacak 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8 ng/ml, 4 ng/ml ve 2 ng/ml değerlerinde standartlar 64 ng/ml stok standarttan Standard Diluent Buffer kullanılarak hazırlandı.

Tüm antikor kaplı kuyucuklara 40 µL serum örnekleri ve 10 µL SMAD-2 antikorunu otomatik pipet yardımıyla uygulandı. Diğer kuyucuklara 50 µL hazırlanan standartlar konuldu. Tüm mikrokuyucuklara 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Antikor- antijen-antikor

kompleksinin oluşması için mikrokuyucuklar 37°C’de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 300 µL yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkama yapıp iyice kurutulduktan sonra ilk önce 50 µL kromogen reagent A, daha sonra 50 µL kromogen reagent B eklenip, 10 dakika boyunca 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Oluşan renk reaksiyonu 50 µL durdurma solüsyonu ilavesiyle durduruldu. 450 nm’de ELISA okuyucuda (ChroMate 4300 Microplate Reader; Palm City, FL, USA) örneklerin absorbansları ve konsantrasyonları ayrı ayrı okundu. Absorbansları okunan ve değerleri bilinen standartlar yardımıyla çizilen standart eğriden hesaplanan konsantrasyon değerleri otomatik olarak okunan konsantrasyonlarla karşılaştırıldı.



Şekil 4-2: SMAD-2’nin Çizilen Standart Grafiği

4.5.Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Sıklık tabloları ve istatistiksel analizler SPSS Software (SPSS 16, Chicago, IL, USA) kullanılarak yapılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile incelendi. Parametreler arasındaki istatistiksel anlamlılığın Mann-Whitney U testi ile belirlenmesine karar verildi. Anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Medyan değerlerini gösteren boxplot tipi grafikler çizildi. Korelasyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılıklar pearson testi ile hesaplandı. Duyarlılık ve özgüllük testleri ROC eğrisi kullanılarak hesaplandı. (80)

5. BULGULAR

Çalışmamızda yer alan mesane kanserli hastalarda ve sağlıklı kontrollerde MMP-9 ve SMAD-2 protein seviyelerinin aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd) ve medyan (m) değerleri tablo 5.1 de gösterilmiştir.

Mesane kanserli hastalarda serum MMP-9 ve SMAD-2 protein düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (MMP-9 için $p=0.0001$, SMAD-2 için $p=0.0001$)(Tablo 5.2).

Mesane kanserli hastalarda ve sağlıklı kontrollerde MMP-9 ve SMAD-2 mRNA gen ekspresyon düzeylerinin aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd) ve medyan (m) tablo 5.3 te gösterilmiştir.

Mesane kanserli hastalarda MMP-9 ve SMAD-2 gen ekspresyon düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş olup istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamamıştır. (MMP-9 için $p=0.98$, SMAD-2 için $p=0.99$) (Tablo 5.4).

Çalışmamızdaki mesane kanserli pTa, pT1 ve pT2 hastalarının MMP-9 ve SMAD-2 protein düzeylerinin standart sapma (sd), minimum (min) ve maksimum değerleri (max) tablo 5.5 te gösterilmiştir.

Mesane kanserli pTa, pT1 ve pT2 hastalarının MMP-9 ve SMAD-2 mRNA gen ekspresyon düzeylerinin standart sapma (sd), minimum (min) ve maksimum değerleri (max) tablo 5.6 da gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki mesane kanserli hastaları histolojik olarak yüksek ($n=38$) ve düşük ($n=20$) dereceli olarak sınıflandırdığımızda MMP-9 ve SMAD-2 protein düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır.

Tablo5-1: Mesane kanserli hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında protein düzeyleri

Protein Düzeyleri	Mesane kanseri (n=57)				Kontrol (n=20)			
	x	sd	m	min-max	x	sd	m	min-max
MMP-9 (pg/ml)	2414.84	441.71	2448	800-2960	639.15	76.41	637.5	540-780
SMAD-2 (ng/ml)	3.88	6.85	2.14	1.5-35.04	1.65	0.16	1.61	1.42-2.1

Tablo 5-2: Mesane kanserli hastalar ile sağlıklı kontroller gruplarında protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlılıkları (p değeri)

PROTEİN	MMP-9	SMAD-2
Mesane Kanseri/Kontrol	p=0.0001	p=0.0001

Tablo 5-3: Mesane kanserli hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında gen ekspresyon düzeyleri

Gen Ekspresyon Düzeyleri	Mesane kanseri (n=57)				Kontrol (n=20)			
	X	sd	m	min-max	X	sd	m	min-max
MMP-9	0.00002	0.00001	0.00002	0.00001-0.00009	0.00002	0.00001	0.00002	0.00001-0.00003
SMAD-2	0.00002	0.00001	0.00002	0.00001-0.00004	0.00002	0.00001	0.00002	0.00001-0.00003

Tablo 5-4: Mesane kanserli hastalar ile sağlıklı kontroller gruplarında gen ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlılıkları (p değeri)

GEN	MMP-9	SMAD-2
Mesane kanseri/Kontrol	p=0.98	p=0.99

Tablo 5-5: Mesane kanserli hastaların patolojik T evre sınıflamasına göre protein düzeyleri

Protein Düzeyleri	pTa (n=28)		pT1(n=16)		pT2(n=13)	
	sd	min-max	Sd	min-max	sd	min-max
MMP-9 (pg/ml)	496.01	800-2945	320.322	1940-2960	362.25	1800-2960
SMAD-2 (ng/ml)	2.65	1.50-15.7	9.45	1.58-29.77	9.12	1.53-35.04

Tablo 5-6: Mesane kanserli hastaların patolojik T evre sınıflamasına göre gen ekspresyon düzeylerine ait standart sapma (sd), minimum (min) ve maksimum değeri(max)

Gen Ekspresyon Düzeyleri	pTa (n=28)		pT1(n=16)		pT2(n=13)	
	sd	min-max	Sd	min-max	sd	min-max
MMP-9	0.00001	0.00001-0.00003	0.00001	0.00001-0.000082	0.00002	0.00001-0.000085
SMAD-2	0.00001	0.00001-0.00003	0.00001	0.00001-0.00003	0.00001	0.00001-0.00004

Mesane kanserli pT1 hastalarında serum protein MMP-9 düzeyleri pTa grubuna göre yüksek bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.018$). Mesane kanserli pT1 hastalarında serum protein SMAD-2 düzeyleri pTa grubuna göre yüksek bulunmuş olup istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamamıştır. ($p=0.464$). (Tablo 5.7).

Tablo 5-7: Mesane kanserli hastalarda pT1 ile pTa gruplarında protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlılıkları (p değerleri)

PROTEİN	MMP-9	SMAD-2
pT1/pTa	$p=0.018$	$p=0.464$

Mesane kanserli pT2 hastalarında serum protein MMP-9 düzeyleri pTa grubuna göre yüksek bulunmuş olup istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamamıştır ($p=0.793$). Mesane kanserli pT2 hastalarında serum protein SMAD-2 düzeyleri pTa grubuna göre yüksek bulunmuş olup istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamamıştır. ($p=0.353$). (Tablo 5.8).

Tablo 5-8: Mesane kanserli hastalarda pT2 ile pTa gruplarında protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlılıkları (p değerleri)

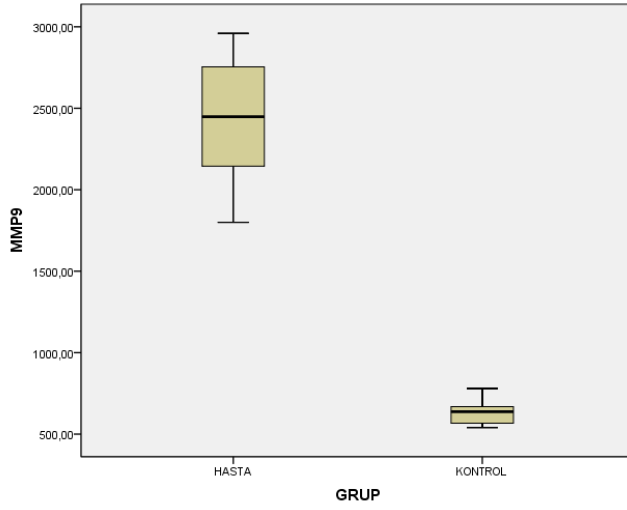
PROTEİN	MMP-9	SMAD-2
pT2/pTa	p=0.793	p=0.353

Mesane kanserli pT1 hastalarında serum protein MMP-9 düzeyleri pT2 grubuna göre yüksek bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0.020). Mesane kanserli pT1 hastalarında serum protein SMAD-2 düzeyleri pT2 grubuna göre yüksek bulunmuş olup istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamamıştır (p=0.650). (Tablo 5.9).

Tablo 5-9: Mesane kanserli hastalarda pT1 ile pT2 gruplarında protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlılıkları (p değerleri)

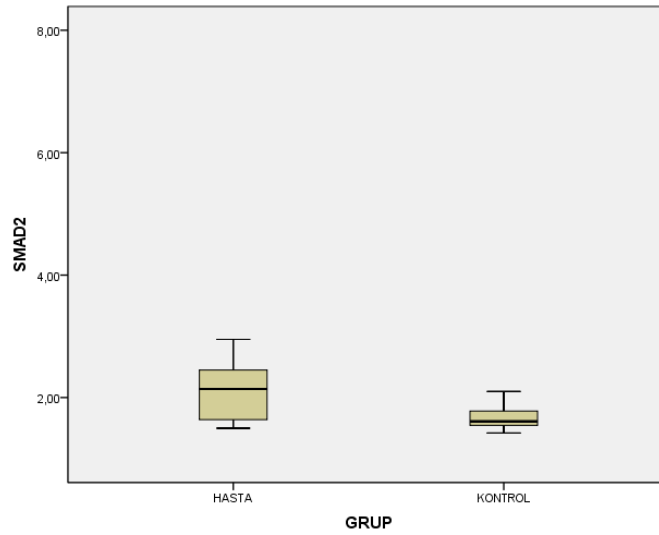
PROTEİN	MMP-9	SMAD-2
pT1/pT2	p=0.020	p=0.650

Mesane kanserli hastalarında serum MMP-9 ve SMAD-2 gen düzeyleri patolojik invazyon derinliğine göre sınıflandırılmış gruplar arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamamıştır.



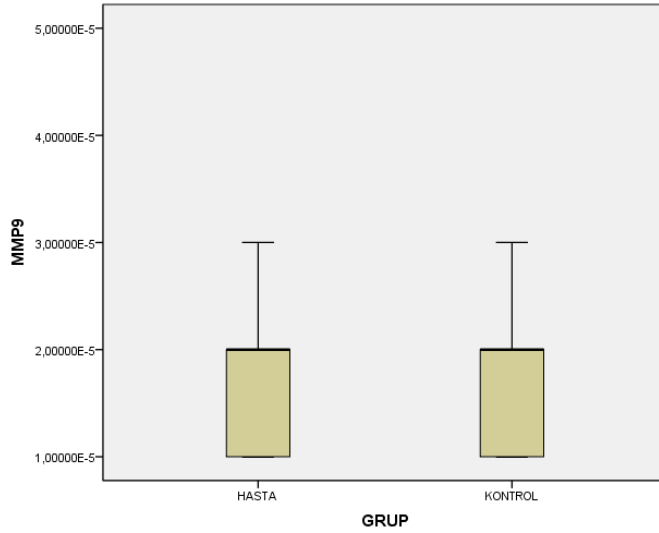
Şekil 5-1: MMP-9 Protein Düzeyleri Dağılım Grafiği (p=0.0001)

Şekil 5.1’de görüldüğü gibi MMP-9 protein düzeyleri mesane kanserli hastalara ait medyan değerinin (m=2448pg/ml) üzerinde bir dağılım göstermekte olup sağlıklı kontrol grubunda medyan değerinin (m=637.5pg/mL) biraz üzerinde bir dağılım göstermektedir.

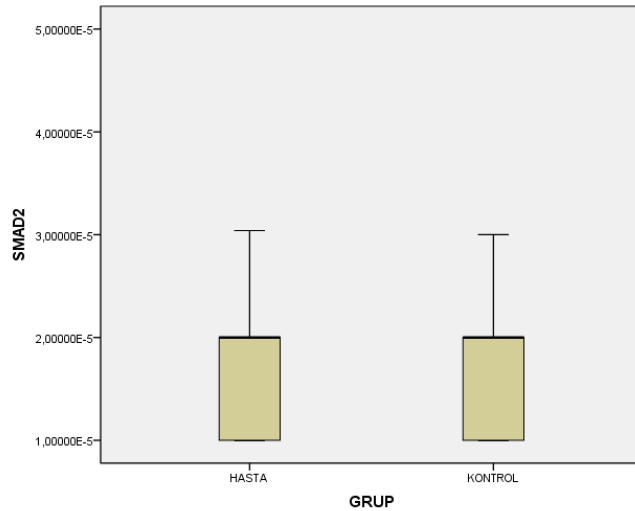


Şekil 5-2: SMAD-2 Protein Düzeyleri Dağılım Grafiği (p=0.0001)

Şekil 5.2’de görüldüğü gibi SMAD-2 protein düzeyleri mesane kanserli hastalara ait medyan değerinin ($m=2.14\text{ng/L}$) üzerinde bir dağılım göstermekte olup sağlıklı kontrol grubunda medyan değerinin ($m=1.61\text{ng/mL}$) biraz üzerinde bir dağılım göstermektedir.



Şekil 5-3: Mesane kanserli hastaların ve sağlıklı kontrollerin MMP-9 gen ekspresyon değerleri ($p=0.98$)



Şekil 5-4: Mesane kanserli hastaların ve sağlıklı kontrollerin SMAD-2 gen ekspresyon değerleri($p=0.98$)

6. TARTIŞMA

Mesane kanseri, invaziv büyüme ve hızlı nüks özellikleri taşır ve aynı anda birden fazla yerde ortaya çıkma eğilimi gösterir. Karmaşık progresyon mekanizması nedeniyle, patogenezinin spesifik moleküler mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır.(81) Mesane kanserini teşhis ve tedavi etmek için onaylanmış benzeri moleküler hedefli maddeler olmadığından, örneğin trozin kinaz inhibitörleri, Kanser Genom Atlası (TCGA) projesi, bu hastalık için potansiyel terapötik hedeflerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.(82) Moleküler biyoloji, genomik, biyoinformatik ve immünolojideki gelişmelerin bu hastalığı tedavi etmede terapötik gelişmeler için sağlam bir temel sağlayabileceği gerçeğini destekleyen kanıtlar vardır.(83) Bu nedenle çalışmadaki amacımız mesane kanserli hastalarda kanserininvazyon göstergesi olarak düşünülen serum MMP-9 ve SMAD-2 değerlerini inceleyerek yeni biyobelirteçlerin bulunmasını hedeflemektir.Bu tür araştırmaların, mesane kanseri evreleme ve tedavis için yeni moleküler ve terapötik hedeflerin araştırılması için teorik bir temel sağlayabileceğini ummaktayız.

Tümörün lokal invazyonunbilinen en klasik yolu spesifik proteolitik enzimlerle ekstrasellülmatriks (ECM) degradasyonudur. Bu nedenle, ECM'nin bütünlüğünü ve bileşimini düzenleyen çinko bağımlı endopeptidazlar ailesi olan matriksmetalloproteinazlar (MMP'ler) ailesi, mesane kanserinin biyobelirteçleri olarak kabul edilen en iyi adaylardır.(84)

Grignon ve diğ. MMP-9'un immünohistokimyasal ekspresyonunun (IHC) mesane kanserinde prognostik bir rol oynadığını vurgulamıştır.(85)

Bizim çalışmamızda mesane kanserli hastalarda serum MMP-9 protein düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0.0001).

Çalışmamızda sptadığımız önemli bir bulgu olarak serum MMP-9 protein düzeyinin 800pg/ml üzeri saptanması (bknz. Tablo 5.1) çalışmamıza göre mesane tümörü riski olan kişilerde tanıya yönelikleri tetkik yapılması konusunda yönlendirici olacaktır, örneğin sigara içen populasyonlarda olduğu gibi.

Çalışmamız ile uyumlu olan 2015 yılında yapılan bir meta-analizde mesane tümörlü hastaların ve sağlıklı kontrol bireylerin serum MMP-9 protein ekspresyon oranları karşılaştırılmış olup hastalarda sağlıklı kontrol bireylerine göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. (86)

Rekürren yüzeysel mesane tümörlü hasta grubunda yapılan bir çalışmada idrarda MMP-9 protein seviyeleri bakılmış. idrarda bakılan bu belirtecin evre ve tümör büyüklüğü ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. (87) Bizim çalışmamızda, bu çalışmadan farklı olarak bu belirteç srumda bakıldı. hastaların serum protein düzeyleri ile patolojik T evreleri arasında ilişkiye bakıldığında, MMP-9 protein düzeyinin pT1 hastalarda pTa ve pT2 hastalara göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. (sırasıyla $p=0.018$, $p=0.02$) Ancak mesane kanserli pT2 hastalarda serum MMP-9 protein düzeyleri pTa grubuna göre yüksek bulunmuş olup istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamamıştır ($p=0.793$). pT1 hastalarda lamina propria invazyonu ile yıkım ürünlerinin artışı sonucu MMP-9 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış meydana gelmiştir. Bu nedenle MMP 9 değerinin yüksek olması tümörün lamina propria içinde olduğunun göstergesidir (Tablo 5.1).

Ancak pT2 hastalarda MMP-9 serum protein değerinin yüksek pTa grubuna göre yüksek olup pT1 grubuna göre düşük olmasını lamina proprianın tamamen yıkılmış olmasına ve dolayısıyla ortada yıkılacak ürün kalmamasına bağlıyoruz.

MMP-9 ve MMP-2 serum protein düzeylerinin ileri evre mesane tümörlü hastalarda daha yüksek seviyelere sahip olduğu ve tanıda metastatik hastalarda TIMP-2 seviyeleri arttığı

gösterilmiş. Bu sonuçların aynı hastalardan periferal kan mononükleer hücrelerinde MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 mRNA'ları saptanarak desteklemişlerdir. (88)

Bizim çalışmamızda yapılan RT-PCR incelemesinde mesane kanserli hastalarda serum MMP-9 mRNA gen ekspresyon düzeyleri serum protein düzeylerinin aksine hastalık ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Protein düzeyleri yüksek olduğunda eş zamanlı mRNA düzeylerinin yüksek olması gerekmediği, ortamda mRNA varlığı protein sentezini artırarak düzeyini yükseltebileceği de bilinmektedir. Bu nedenle hasta ve sağlıklı gruplar arasında olduğu gibi patolojik T evreye göre sınıflandırılmış (pT1-pTa, pT2-pTa, pT2-pT1) gruplar arasında yapılan serum MMP-9 mRNA incelenmesinde istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamamıştır.

Bir çalışmada mesane tümörlü hastaların alınan patoloji dokularında histolojik G1-G2 derecesinde MMP-9 ekspresyon oranlarının G3 derecesine kıyasla önemli ölçüde azaldığı bulunmuş.(86)

Bizim çalışmamızda yukarıdaki dokudan bakılan çalışmadan farklı olarak biz serum MMP-9 protein düzeylerine baktığımızda, düşük-yüksek histolojik grade grupları arasında anlamlı farklılık bulamadık.

SMAD2/3 proteinleri mesane tümörü dokularında sağlıklı dokulara kıyasla belirgin olarak artmış olup yüksek SMAD2/3 molekülleri hastaların klinikopatolojik özellikleri ile istatistiksel olarak ilişkili bulunmamış. (89) Çalışmamızda mesane kanserli hastalarda serum protein SMAD-2 düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.0001$). MMP-9 da olduğu gibi mesane kanseri için risk faktörü olan kişilerde tanıya yönelik ileri tetkik yapılması konusunda yönlendirici olacaktır.

TGF- β /Smad sinyal yolunun kanser hücresi motilitesini, invazivliğini ve metastazını arttırarak ve epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) indükleyerek karsinom gelişimine katkıda

bulunduğuna inanılmaktadır. (76)(77) SMAD sinyal yolu, nükleustaki genlerin transkripsiyonunu etkileyerek TGF- β 'in reseptörünün aktivasyonu ile EMT'nin başlatmasının altında yatan ana mekanizma olduğu vurgulanmıştır.(90) EMT ile E-kaderin'den N-kaderin'e geçiş, hücrelerin bir malign ve invaziv kanser hücresinedönüşümüne nedenolduğu gösterilmiştir.(91)(92)

Bizim çalışmamızda sonuçlar yukarıda bahsedilen EMT teorisi ile orantılı olmamıştır. Çalışmamızın özelliği olarak diğer çalışmaların aksine SMAD-2 protein ve mRNA düzeyleri dokuda bakılmayıp serumda bakılmış olmasıdır.

Yüz kırkbeş hastalık bir kohortta mesane tümörü doku örneklerinde, PPM1A'nın tümör hücre göçünü, invazyonu ve EMT gelişimini baskıladığı ve bu etkinin TGF- β / SMAD sinyaline bağımlı olduğu belirtilmiş. PPM1A'nınmesane tümörü doku örneklerinde ekspresyon kaybının yüksek p-SMAD 2/3 ekspresyonu ve düşük E-kaderin ekspresyonu ile korele olduğu ve kas invazyonu arasında anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlenmiş (p = 0.029). Mesane tümöründe PPM1A kaybı ve yüksek SMAD kompleksinin kötü diferansiye tümörlerle anlamlı şekilde ilişkili olduğu belirtilmiş. (78)

Bizim çalışmamızda serum SMAD-2 protein düzeylerinin grade gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Bu durum yukarıda belirtmiş olduğumuz gibi, yukarıdaki çalışmalarda belirteçlerin dokuda bakılıp bizim çalışmamızda ise serumda bakılmasının buna neden olabileceği dışında açıklanamamaktadır.

7. SONUÇ

Bu bulgulara göre, serum MMP-9 ve SMAD-2 protein düzeyinleri mesane tümöründe artış göstermektedir. Bununla birlikte MMP-9 protein düzeyi lamina proprianın invazyonunu gösteren pT1 evresini saptamada fayda sağlayacaktır. Sonuç olarak, tümör invazyonuna bağlı olan MMP-9 ve SMAD-2 gibimoleküllerin protein ekspresyonunun incelenmesinin gelecekte

mesane kanseri hastalığının tanısı, operasyon öncesi klinik T evre göstergesi ve kişiye özgü tedavisi için önemli olduğunu ileri sürebiliriz.

Mesane tümörü tanı ve evrelemesinde kritik önemi olan lamina proprianın invazyonunu predikte etmede serum biyobelirteçlerinin geliştirilmesinde örneklem sayısının fazla olduğuyeni çalışmalar re-TUR-T gibi tekrarlayan ameliyat gereksinimi azaltılabilir ve risk grubundaki popülasyonda tarama testi olarak kullanılabilir.

8. KAYNAKÇA

1. Tanagho EA, Smith DR. The anatomy and function of the bladder neck. *BrJ Urol.* 1966; 38(1): 54-71.1.
2. Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In PC Walsh et al. eds. *Campbell's Urology*, 9th Ed 2007; 1:41-80.
3. Sternberg S.S. *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology* 4th ed. Vol 3. Philadelphia, LippincottWilliams&Wilkins2004;2035-2081.
4. Rosai J. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology Bladder and Male Urethra*.St.Louis Mosby ,2004,9th ed.pp 1317-1359.
5. Zhonghua Wai Ke Za Zhi. Inverted urothelial papilloma: report of 151 cases.2005 Jan 15;43(2):105-7.
6. Başaklar A.C, Skandalakis Cerrahi Anatomi Modern Cerrahinin Embriyolojik ve Anatomik Temelleri II, Bölüm: 24, Palme Yayıncılık, Ankara, 2008:1345-1377.
7. Reuter VE., Urinary Bladder,Ureter,and Renal Pelvis In: Stacey E.M., ed. *Histology for Pathologists*. 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2007;909-921.
8. Juenemann KP, Lue TF, Schmidt RA, Tanagho EA. Clinical significance of sacral and pudendal nerve anatomy. *J Urol.* 1988;139(1): 74-80.
9. Andersson KE. Neurotransmitters and neuroreceptors in the lower urinary tract. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1996; 8(5): 361-365.
10. Marshall FF. Embryology of the lower genitourinary tract. *Urol Clin North Am.* 1978; 5(1): 3-15.
11. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. *CancerStatistics*, 2006. *CA Cancer J clin.* 2006;56(2):106-130.
12. <http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html>.
13. Eser S, Yakut C, Özdemir R, Karakilinç H, Özalan S, Marshall SF, Karaoğlanoğlu O, Anbarcioğlu Z, Üçüncü N, Akin Ü, Özen E, Özgül N, Anton-Culver H, Tuncer M. *Cancer incidences rates in Turkey in 2006: A detailed registry b.*

14. Smith, A. B. et al. Muscle-invasive bladder cancer: evaluating treatment and survival in the National Cancer Data Base. *BJU Int.* 114, 719–726 (2014). .
15. Burger, M. et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur. Urol.* 63, 234–241 (2013).
16. Bozkırlı İ. *Urogenital sistem tümörleri: Yeni Üroloji, 2.baskı. Türk Hava Kurumu Basımevi, Ankara, 1999, S:411-427.*
17. Ramirez, D. et al. Microscopic haematuria at time of diagnosis is associated with lower disease stage in patients with newly diagnosed bladder cancer. *BJU Int.* 117, 783–786 (2016).
18. E.M. Messing, *Etiology and Risk Factors.* In PC Walsh et al. eds. *Campbell's Urology, 9th Ed* 2007.
19. Svatek RS, Hollenbeck BK, Holmang S, Lee R, Kim SP, Stenzl A, et al. The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease. *European urology.* 2014 Aug;66(2):253-62. PubMed PMID: 24472711. Epub 2014/01/30. Eng.
20. Pashos LC, Botteman MF, Laskin LB, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract,* 2002;10:311-22.
21. David P, Wood J. Urothelial tumors of the bladder. *Campbell Walsh Urology.* 10th ed. 2012.
22. Negri E, La Vecchia C. Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev,* 2001;10:7-14.
23. Johansson SL, Cohen SM, *Epidemiology and Etiology of Bladder Cancer. Semin Surg Oncol,* 1997;13:291-298.
24. Olfert SM, Felknor SA, Delclos GL. An updated review of the literature: risk factors for bladder cancer with focus on occupational exposures. *South Med J.* 2006 Nov; 99(11): 1256-63.
25. *Campel Üroloji 8.Baskı Patrick C.Walsh, Alan B.Retik, E.Darracott Vaughan, Alan J.Wein* 2005 Saunders Company Cilt4.
26. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncol.* 1, 505–527 (2015). .
27. Smith, N. D. et al. Bladder cancer mortality in the United States: a geographic and temporal analysis of socioeconomic and environmental factors. *J. Urol.* 195, 290–296 (2016).
28. Piper JM, Tonascia J, Matanoski GM. Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N Engl J Med.* 1985 Aug 1;313(5):292-5.
29. Kiemeny LA. Hereditary bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2008 Sep;(218):110-5. doi: 10.1080/03008880802283755.
30. Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto J. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Mar 3;96(5):357-63.

31. Guo Z, Linn JF, Wu G, Anzick SL, Eisenberger CF, Halachmi S, Cohen Y, et al. CDC91L1 (PIG-U) is a newly discovered oncogene in human bladder cancer. *Nat Med.* 2004 Apr;10(4):374-81.
32. Parkin, D. M. The global burden of urinary bladder cancer. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 42, 12–20 (2008).
33. Duncan RE, Bennett DW, Evans AT, et al: Radiation-induced bladder tumors. *J Urol* 1977; 118:43.
34. Cancer Brenner DJ, Curtis RE, Hall EJ, Ron E. Second malignancies in prostate carcinoma patients after radiotherapy compared with surgery 2000 Jan 15;88(2):398-406.
35. Neugut AI, Ahsan H, Robinson E, Ennis RD. Bladder carcinoma and other second malignancies after radiotherapy for prostate carcinoma. *Cancer.* 1997 Apr 15;79(8):1600-4.
36. Travis LB, Curtis RE, Glimelius B et al. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 524-530.
37. Messing EM, and Vaillancourt A: Hematuria screening for bladder cancer. *J Occup Med* 32: 838–845, 1990.
38. Jewett HJ: Cancer of the bladder: diagnosis and staging. *Cancer* 32: 1072–1074, 1973.
39. [Cystoscopy (1879-1979) (centennial of a transcendental invention)]. Picatoste y Patiño J, Martín García B, Hernández Rodríguez R, Portillo Martín JA. *Arch Esp Urol.* 1980 Jan-Feb;33(1):1-18.
40. Van der Aa, M. N. M. et al. Cystoscopy revisited as the gold standard for detecting bladder cancer recurrence: diagnostic review bias in the randomized, prospective CEFUB trial. *J. Urol.* 183, 76–80 (2010).
41. Passoni, N. M. et al. Concordance in biomarker status between bladder tumors at time of transurethral resection and subsequent radical cystectomy: results of a 5-year prospective study. *Bladder Cancer* 2, 91–99 (2016).
42. Babjuk, M. et al. EAU guidelines on non-muscleinvasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016. *Eur. Urol.* 71, 447–461 (2016).
43. Palou, J. et al. Multivariate analysis of clinical parameters of synchronous primary superficial bladder cancer and upper urinary tract tumor. *J. Urol.* 174, 859–861 (2005).
44. E. Victor, The pathology of Bladder Cancer. *Urology*, 2006; (67): 11-18.
45. Bostwick GD, Cheng L. *Urologic Surgical Pathology* 2 nd Ed. Chapter 6, Mosby Elsevier, China, 2008: 216-227, 274-275, 287-296.
46. Van Rhijn, B. W. G. et al. Pathological stage review is indicated in primary pT1 bladder cancer. *BJU Int.* 106, 206–211 (2010).
47. May, M. et al. Prognostic accuracy of individual uropathologists in noninvasive urinary bladder carcinoma: a multicentre study comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation classifications. *Eur. Urol.* 57, 850–858 (2010).

48. Nocks BN, Nieh PT, Prout GR JR. *A longitudinal study of patients with superficial bladder carcinoma successfully treated with weekly intravesical thio-tepa. J Urol* 1979; 122: 27.
49. Böhle, A., Jocham, D. & Bock, P. R. *Intravesical bacillus Calmette–Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. J. Urol.* 169, 90–95 (2003).
50. Sylvester, R. et al. *Long-term efficacy results of EORTC genito-urinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, Bacillus Calmette–Guérin, and Bacillus Calmette–Guérin plus isoniazid in patients with interm.*
51. Lamm, D. L. et al. *Maintenance bacillus Calmette–Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. J. Urol.* 163, 1124–1129 (2000). *A landmark study of.*
52. Sylvester, R. J., van der Meijden, A. P. M. & Lamm, D. L. *Intravesical bacillus Calmette–Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. J. Urol.* 1.
53. Sylvester, R. J., Oosterlinck, W. & van der Meijden, A. P. M. *A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of random.*
54. Perlis, N. et al. *Immediate post-transurethral resection of bladder tumor intravesical chemotherapy prevents non-muscle-invasive bladder cancer recurrences: an updated meta-analysis on 2548 patients and quality-of-evidence review. Eur. Urol.* 64, 421–430 .
55. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, et al. *Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. Cancer* 1989 Dec;64(12):2448-58.
56. Sherif A, Rintala E, Mestad O, et al. *Neoadjuvant cisplatin-methotrexate chemotherapy for invasive bladder cancer-Nordic cystectomy trial 2. Scand J Urol Nephrol.* 2002;36:419-425.
57. Herr HW. *The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors. J Urol.* 1999;162:74-76.
58. Kassouf W, Swanson D, Kamat AM, et al. *Partial cystectomy for muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder: a contemporary review of the M. D. Anderson Cancer Center experience. J Urol.* 2006;175:2058-2062.
59. Montie JE, Clark PE, Eisenberger MA, et al. *Bladder cancer. J Natl Compr Canc Netw.* 2009;7:8-39.
60. Krause FS, Walter B, Ott OJ, et al. *15-year survival rates after transurethral resection and radiochemotherapy or radiation in bladder cancer treatment. Anticancer Res* 2011 Mar;31(3):985-90.

61. Bellmunt J, von der Maase H, Mead GM, et al. Randomized phase III study comparing paclitaxel/ cisplatin/gemcitabine and gemcitabine/cisplatin in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer without prior systemic therapy: EORTC Intergrou.
62. Chade DC, Shariat SF, Godoy G, Meryn S, Dalbagni G. Critical review of biomarkers for early detection and surveillance of bladder cancer. *JMH* 2009 Dec; 6(4): 368-382.
63. Buchardt M, Buchardt T, SHabsigh A, De La Taille A, Benson MC, Sawczuk I: Current consepts in biomarker technology for bladder cancer. *Clin Chem* 2000; 46(5): 595-605.
64. Saad A, Hanbury DC, McNicholas TA, Boustead GB, Woodman AC. The early detection and diagnosisof bladder cancer:a critical review of the options. *Eur Urol* 2001;39:619-33.
65. Gutterrez BJJ, Rebollo RMH, Antolin JGM, Garcia BM. Usefulness of the bta stat test for diagnosis of bladder cancer. *Urology*2001;57 :685-9.
66. Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: Results of a comprehensive Literature review and meta-analyses. *Uology*,2003;61: 109-118.
67. Thomas L, Leyh H, Marberger M et al. Multicenter trial of the quantitative bta trak assay in the detection of bladder cancer. *Clin Chem* 1999;45:472-7.
68. Landman J, Chang Y, Kavalier E et al. Sensitivity and specificity of NP-22, telomerase and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology* 1999;162:53-7.
69. Sumi S, Arai K, Kitahara S, Yoshida KI. Preliminary report of the clinical performance of a new urinary bladder cancer antigen test: comparison to voided urine .
70. Simon MA, Lokeshwar VB, soloway MS. Current bladder cancer tests: unnecessary or beneficial? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2003;47:91-107.
71. Gofrit ON, Zorn KC, Silvestre J, Shalhav AL, Zagaja GP, Msezane LP, Steinberg GD. The predictive value of multi-targeted fluorescent in-situ hybridization in patients with history of bladder cancer. *Urol Oncol.* 2008 May-Jun;26(3):246-9. doi: 10.1016/j.uro.
72. Stankovic S, Konjevic G, Gopcevic K, Jovic V, Inic M, Jurisic V. Activity of MMP-2 and MMP-9 in sera of breast cancer patients. *Pathol Res Pract.* 2010;206:241---7.
73. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42:121---31.
74. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases:they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.*2011;13:534---40.
75. Vandooren J, Van den Steen PE and Opdenakker G: Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48: 222-272, 2013.
76. Akhurst RJ and Derynck R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 2001;11(11):S44--51.

77. Derynck R, Akhurst RJ and Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 2001; 29(2):117–129.
78. Geng j., Fan J., Ouyang Q. :Loss of PPM1A expression enhances invasion and the epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer by activating the TGF- β /Smad signaling pathway, May 19, 2014.
79. Lin X, Duan X, Liang YY, Su Y, Wrighton KH, Long J, Hu M, Davis CM, Wang J, Brunicardi FC, Shi Y, Chen YG, Meng A and Feng XH. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGF β signaling *Cell.* 2006; 125(5):915–928.
80. Hayran M, Hayran M. *Sağlık Araştırmaları için Temel İstatistik*, Mayıs 2011.
81. Willis DL, Fernandez MI, Dickstein RJ, et al. Clinical outcomes of cT1 micropapillary bladder cancer. *JUrol.* 2015; 193: 1129–34.
82. Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature.* 2014; 507: 315–22.
83. Grivas PD, Melas M, Papavassiliou AG. The biological complexity of urothelial carcinoma: insights into carcinogenesis, targets and biomarkers of response to therapeutic approaches. *Semin Cancer Biol.* 2015; 35: 125–32.
84. Rodriguez-Faba O, Palou-Redorta J, Fernández-Gómez JM, Algaba F, Eiró N, Villavicencio H, et al. Matrix metalloproteinases and bladder cancer: What is new? *ISRN Urol.* 2012;2012:581539.
85. Grignon DJ, Sakr W, Toth M, Ravery V, Angulo J, Shamsa F, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 1996;56:165.
86. Zeng F., Cen S., Tang Z. and Kang X. :elevated matrix metalloproteinase-9 expression may contribute to the pathogenesis of bladder cancer; Accepted December 14, 2015.
87. Durkan GC, Nutt JE, Marsh C, Rajjayabun PH, Robinson MC, Neal DE, et al. Alteration in urinary matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio predicts recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer.
88. Angulo JC, Ferruelo A, Rodríguez-Barbero JM, Núñez C, Ramón de Fata F, González J. Detección y estadificación molecular del cáncer vesical mediante RT-PCR a tiempo real para gelatinasas (MMP-2 MMP-9) y TIMP-2 en sangre perif.
89. X. Wang, E. Chen, M. Tang: The SMAD2/3 pathway is involved in hepaCAM-induced apoptosis by inhibiting the nuclear translocation of SMAD2/3 in bladder cancer cells, 12 February 2016.
90. Gomes LR, Terra LF, Sogayar MC, et al. Epithelial-mesenchymal transition: implications in cancer progression and metastasis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011; 12: 1881–96.
91. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* 1998; 392: 190–3. 52.

92. Nalla AK, Estes N, Patel J, et al. N-cadherin mediates angiogenesis by regulating monocyte chemoattractant protein-1 expression via PI3K/Akt signaling in prostate cancer cells. Exp Cell Res. 2011; 317: 2512–21.

9. GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Bu çalışmaya gönüllü olmaya karar verirsiniz bu bilgilendirilmiş olur (onay) formunu imzalamanız gerekecektir. Sadece kendi rızanız ile hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, tanı ve tedaviniz esnasında tarafınızdan alınacak 7-10 cc.'lik kan örneğiniz ile bu bilimsel çalışmaya katılmış olacaksınız. Çalışma ilerlerken eğer gerekli görülürse ayrılan kan örneklerinizde başta belirtilen parametrelerin dışında başka biyokimyasal testler de çalışılacaktır. Kan alma sırasında kan alınan bölgede acı, morarma, kanama ya da diğer rahatsızlıklar meydana gelebilir, fakat bu güçlüklerin en aza indirilmesi için önlemler alınacaktır. Etik kurullar inceleme amacıyla medikal kayıtlardaki kişisel medikal bilgilerinize ve bu çalışmadan elde edilen bilgilere erişebilirler. Medikal bilgilerinize erişim çalışma için gereken verilerin toplanması ve işlenmesi ile sınırlı olacaktır.

Araştırma amaçlı bu çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılarda ya da yayınlarda sunulabilir, ancak bu sunumlarda sizin kimliğiniz açıklanmayacaktır. Ayrıca sizden araştırma ile ilgili olarak herhangi bir maddi talepte bulunulmayacak ve size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Katılmaya karar verdikten sonra da herhangi bir zamanda bu çalışmaya katılma için olurunuzu geri çekebilir ve çalışmadan çıkabilirsiniz. Bu karar medikal tedavinizi etkilemeyecektir. Ayrıca bu araştırmaya katılmaya karar verdiğiniz takdirde ileriye dönük olarak hastalığınız hakkında elde edilecek bilgilerle bilim dünyasını konuyla ilgili olarak önemli derecede katkı sağlayacağınız kesindir. Gönüllü olmaya karar verdiğiniz ve bu bilgilendirilmiş gönüllü onay ve rıza formunu imzaladığınız takdirde yukarıda yazılanları

okuyup kabul ettiğinizi ve hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın ailenizin bilgisi dahilindesadece kendi rızanız ile karar verdiğinizi onaylamış olacaksınız.

Sayın Dr. Yasin Yitgin tarafından İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ve Üroloji anabilim dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütölmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağına bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Yasin Yitgin (D),4142000/31832, İstanbul Tıp Fakóltesi Üroloji Anabili Dalından arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi

sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım.

Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

10. GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi