



T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**RENAL HÜCRELİ KARSİNOMDA SUBSTANCE P DÜZEYİ İLE
SUBSTANCE P'Yİ PARÇALAYAN ENZİMLERİN
AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMİN KANSERİN FENOTİPİ VE
PROGNOZU İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tümay İPEKÇİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Mehmet BAYKARA

“ Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir ”

ANTALYA, 2011

**“Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
Tarafından 2009.01.0103.005 Proje No ile desteklenmiştir.”**

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Kliniğinde uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatını bulduğum başta Üroloji A. B. D. başkanı sayın Prof. Dr. Erol Güntekin ve diğer öğretim üyelerine, tez danışmanım Prof.Dr.Mehmet Baykara'ya, tez çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Nuray Erin ve Prof.Dr.Bahar Kılıçaslan Akkaya'ya,uzmanlık eğitimim boyunca güzel dostluklarını paylaşan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve ileride çok daha iyi mertebelerde beraber olacağımıza inandığım değerli asistan arkadaşlarıma, rotasyonunu yaptığım Genel Cerrahi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon , Nefroloji A. B. D. 'nın değerli hocalarına teşekkür ederim.

Uzmanlık tez çalışmalarım sırasında gösterdikleri ilgi ve yardımları için Üroloji ameliyathane hemşireleri ve personeline, tıp hayatına girdiğim günden beri maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili babam Aziz İPEKÇİ , annem Burçin İPEKÇİ'ye, kardeşim Nihan İPEKÇİ'ye, her zaman yanımda olan sevgili eşim Öncel İPEKÇİ ve canım oğlum Ozan İPEKÇİ'ye şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa :</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iii
Şekiller Dizini	iv
Tablolar Dizini	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnsidans	4
2.2. Risk Faktörleri	4
2.3. Patoloji	5
2.4. Evreleme	6
2.5. Semptomlar	8
2.6. Radyolojik Görüntüleme	9
2.7. Renal Hücreli Kanser İçin Prognostik Faktörler	10
2.7.1. Anatomik prognostik faktörler	12
2.7.2. Histolojik prognostik faktörler	14
2.7.3. Klinik prognostik faktörler	15
2.8. Tedavi	15
2.8.1. Lokal hastalık	15
2.8.1.1. Radikal nefrektomi	15
2.8.1.2. Nefron koruyucu cerrahi	16
2.8.1.3. Nefron koruyucu doku ablasyon teknikleri	18
2.8.2. Metastatik hastalık	18
2.8.2.1. Cerrahi tedavi	18
2.8.2.2. Kemoterapi, immunoterapi ve diğer tedaviler	19
2.9. Substans P	21
2.10. Vazoaktif İntestinal Peptit (VIP)	26
2.11. CGRP {Calcitonin Gen Related Peptid}	29
2.12. Neutral Endopeptidaz	31
2.13. ADAM-10	34

2.14. ADAM-9	35
2.15. ADAM-17	36
3. MATERYAL ve METOD	39
3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması	40
3.2. Örneklerin Alınması, Saklanması ve Ölçümlerin Yapılması	43
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	47
5. SONUÇLAR	48
6. TARTIŞMA	58
7. ÖZET	64
8. ABSTRACT	66
9. KAYNAKLAR	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADAM	A disintegrin A metalloproteaz
A-Sec	Alfa sekretaz
Dk	Dakika
CALLA	Common acute lymphoblastic leukemia antigen
CD	Cluster designating
CLR	Kalsitonin reseptör benzeri reseptör
CGRP	Calcitonin gen related peptid
EGF	Epidermal growth factor
EIA	Enzim immunoassay
IRS	Immunreaktivite skoru
NEP	Neprilisin
NK-1R	Neurokinin 1 reseptörü
NK-2	Neurokinin 2 reseptörü
NK-3	Neurokinin 3 reseptörü
NKC	Nefron koruyucu cerrahi
RHK	Renal hücreli karsinom
SP	Substans P
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
VHL	Von Hippel Lindau
VIP	Vazoaktif intestinal peptit

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Böbrek tümörlerinde modifiye Robson evrelendirmesi	7
3.1. Sıvı nitrojeni taşımakta kullandığımız termos	43
3.2. Dokuları tartmakta kullanılan hassas tartı	43
3.3. Dokulara asetik asit ekleyerek ve ısıtılarak ekstraksiyonları elde ettiğimiz cihaz	44
3.4. Speed VAC cihazı	44
3.5. EIA yöntemi ile ölçümlerin yapıldığı bilgisayar destekli cihaz	45
3.6. EIA yönteminin yapılışı Thermo Labsystem Multiskan Spectrum (Spektrofotometri- VIP, SP, CGRP ölçümleri)	45
3.7. BioTek Flx800 Fluorescence (Neprilisin ve Alfa secretase fluorometric ölçüm)	46
3.8. Bandelin UW-2070 (Sonikatör- Dokuların parçalanması homojen hale getirilmesi)	46
5.1. Papiller tip renal hücreli karsinomu olan 9 hastanın NEP ve alfa-sekretaz 53 aktivitelerinin karşılaştırılması	49
5.2. Kromofob tip renal hücreli karsinomu olan 6 hastanın NEP ve alfa-sekretaz 53 aktivitelerinin karşılaştırılması	49
5.3. Berrak hücreli tip renal hücreli karsinomu olan 25 hastanın NEP ve alfa-sekretaz 54 aktivitelerinin karşılaştırılması	49
5.4. Dokuların Western-Blot analizi	50
5.5. Tümör dokusu ve komşu sağlam dokuda CGRP ölçümleri	51
5.6. Tümör dokusu ve komşu normal böbrek dokusunda VIP ölçümleri	52
5.7. Tümör dokusunda ve tümörsüz dokuda CD10 immunboyanması	57
5.8. Tümör dokusunda ve tümörsüz dokuda ADAM 10 immunboyanması	57
5.9. Tümör dokusunda ve tümörsüz böbrek dokusunda ADAM 9 immunboyanması	58
5.10. Tümör dokusunda ve tümörsüz böbrek dokusunda ADAM 17 immunboyanması	58

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. 2010 TNM RHK sınıflaması	7
2.2. 2010 TNM RHK evrelemesi	8
2.3. RHK'da anatomik, histolojik, klinik prognostik faktörler ve moleküler prognostik belirteçler	11
2.4. Fuhrman nükleer sınıflandırması	14
2.5. Metastatik Renal Hücreli Karsinomun birinci ve ikinci basamak sistemik tedavisinde kanıta dayalı algoritma	20
2.6. Metastatik berrak hücreli renal hücreli karsinomun sistemik tedavisinde son kılavuzlar	21
2.7. Epidermal, dermal ve immün hücrelerdeki nöropeptitler	29
2.8. Derideki duysal nöronlardan elde edilen nöropeptitler	30
2.9. ADAM'lar ve insan dokularında major ekspresyon alanları	37
2.10. ADAM'ların insan hastalıklarıyla ilişkisi	38
3.1. Hasta ad-soyadı, yaşı, cinsiyeti, operasyon türü, ek hastalıklar, tümör boyutu, tümör tipi, Fuhrmann nükleer derecesi, TNM sınıflaması	30
5.1. Hastaların demografik verileri	48
5.2. Tüm tiplerde renal hücreli karsinom hastalarında tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda CD10, ADAM9, ADAM17, ADAM10 düzeyleri	53
5.3. Berrak hücreli tip renal hücreli karsinom hastalarında tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda CD10, ADAM9, ADAM17, ADAM10 düzeyleri	54
5.4. Papiller tip renal hücreli karsinom hastalarında tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda CD10, ADAM9, ADAM17, ADAM10 düzeyleri	54
5.5. Kromofob tip renal hücreli karsinom hastalarında tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda CD10, ADAM9, ADAM17, ADAM10 düzeyleri	55
5.6. Diğer tiplerdeki renal hücreli karsinom hastalarında tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda CD10, ADAM9, ADAM17, ADAM10 düzeyleri	55

1. GİRİŞ VE AMAÇ

- Renal hücreli karsinom renal epitelden kaynaklanan, genotipik ve fenotipik olarak değişiklik gösteren, farklı tümörlerin oluşturduğu bir hastalıktır. Hastalığın insidansı gittikçe artmakta olup, geç teşhis edilmesi ve ancak sınırlı bir grup hasta için etkin tedavilerin bulunması, bu konudaki bilgi açığımızın derecesini ortaya koymaktadır. Yeni tedavi yöntemleri için etyolojisinde ve tanısında önemli olan moleküllerin bulunması gerekmektedir (1).
- Nöropeptitler ve nöropeptitlerin hidrolizinden sorumlu olan enzimlerin kanser patogeneziindeki rolü yakın dönemde anlaşılmaya başlanmış olup (2), renal hücreli karsinomdaki önemi tam olarak bilinmemektedir. Substans P (SP), 11 aminoasitlik bir nöropeptittir ve hem nöronal hem de nöron dışı hücrelerde bulunur. Duyusal sinir sonlanmalarında SP, Kalsitonin geni ile ilişkili peptit (CGRP) ya da Vazoaktif intestinal peptit (VIP) ile birlikte yer almaktadır (3,4).
- SP'nin kanser gelişimi ve prognozu üzerine etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Bir takım çalışmalarda SP'nin mitojenik etkisinin kanser gelişiminde rol oynadığı öne sürülmüştür. Örneğin SP Neurokinin 1 reseptörlerini aktive ederek melanom hücrelerinin çoğalma hızının artmasına neden olduğu gösterilmiştir (5). Diğer taraftan ise duysal sinirlerdeki SP'nin boşaltılmasının meme kanseri metastazını arttırdığı gösterilmiştir (6,7). Ayrıca SP ya da analogları ile tedavinin melanom, küçük hücreli akciğer karsinomu, kolon kanseri ve prostat kanserinde büyümeyi yavaşlattığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (8-10). Bulgulardaki bu farklılıklar ek faktörlerin, SP'nin etkisini değiştirebileceğini düşündürmektedir. SP'yi biyoaktif fragmanlarına parçalayan enzimler bu faktörlerden biri olabilir. Yaptığımız bir ön çalışmada, SP'nin Neprilisin (Cluster Designating tabanlı tümör belirteci - CD10) ile hidrolizi sonucu ortaya çıkan fragmanların meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını yavaşlattığı gözlemlendi (yayınlanmamış bulgular). Dolayısıyla SP düzeyi yanında SP'yi parçalayan peptidazların aktivitesindeki değişim patolojide ve prognozda rol oynayabilir.
- SP hidrolizinden sorumlulu olan en önemli peptidaz CD10'dur. CD10'un kanser gelişimindeki rolünü inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin akciğer kanserinde, CD10 aktif olduğu membranda değil de inaktif durumda olduğu

sitoplazmada lokalize olması kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (11). Renal hücreli karsinomda CD10 ile yapılan ve düzey artışından bahseden pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda düzey artışı kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmalar daha yakından irdelendiğinde ise bahsedilen artışın sitoplazmada olduğu ve hücre zarının üzerindeki ekspresyonunun kaybolduğu gözlenmektedir (12). Araştırmacılar bu nokta üzerinde durmamış ve aktivite testleri yapmamıştır. Düzey artışı yanlış olarak fonksiyon artışı olarak değerlendirilmiştir. Bu noktanın açıklığa kavuşturulması tedavi ve prognoz açısından çok önemlidir. Hipotezimiz CD10 aktivitesindeki kaybın SP'nin de içinde olduğu mitojenik peptitlerin hidroliz edilememesine neden olduğu ve tümör gelişimini tetiklediğidir. Bu amaçla CD10 lokalizasyonu ve aktivitesindeki değişikliklerle SP düzeyi arasındaki ilişki renal hücreli karsinomda çalışılmıştır.

- Çalışmada üzerinde durulan ikinci enzim bir disintegrin ve metaloproteaz olan ADAM10'dur. Yakın dönemde ADAM10'unda CD10 gibi SP'yi ve bazı mitojenik peptitleri parçaladığı bulunmuştur (7). Dolayısıyla ADAM10'daki fonksiyon kaybı malign transformasyona neden olabilir. Bu çalışmada bu bağlantı araştırılmıştır. ADAM ailesinin 50'den fazla üyesi olduğu bulunmuştur ve her bir üyenin kendine özgü fonksiyonları vardır (13). Bu aileden ADAM ADAM-8, -17, -19, -28, ADAM-TS1 ve ADAM-TS2'nin varlığı ve prognozla ilişkisi mRNA düzeyinde renal hücreli karsinomlarda çalışılmıştır (14). ADAM10 ile ilgili olarak renal hücreli kanser hücre dizilerinde yapılmış bir çalışmaya rastlanmıştır ve bu çalışmada ADAM10'un sitoplazmaya lokalize olduğu gösterilmiştir (15). Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, ADAM10 protein düzeyini ve aktivitesini renal hücreli karsinomlarda inceleyen ilk çalışmalardan biridir. ADAM10'un SP'yi anti-tümoral etkili bioaktif fragmanlarına hidroliz ediyor olmasından yola çıkarak, renal hücreli kanserlerde hücre zarındaki ADAM10 ekspresyonun azalmasının ve aktivite kaybının patoloji ve prognozla ilişkili olduğu öne sürülmüştür.
- Çalışmada nefrektomi sonrası taze tümör dokusu ve normal böbrek dokusundan alınan örnekler sıvı nitrojen içine dondurularak -80 derecede saklanmıştır. Enzim ve peptit düzey tayini için iki ayrı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.
- Enzim aktivitesinin tayini için dokular önce %1 deterjan eklenmiş (Triton-X) Anaspec Alpha secretaz assay solüsyonunda sonikatör kullanarak buz içinde

homojenize edilmiş ve 2 saat buzda bekletilmiştir. Çöktürüldükten sonra süpernatantları alınarak enzim aktivitesi için kullanılmıştır. Bu protokol daha önce mide dokularında denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. ADAM10 aktivitesini ölçmek için alfa sekretaz aktivitesini ölçen kitin protokolü kullanılmıştır. CD10 aktivitesi için florometrik substratın kullanıldığı daha önce tanımlanmış ve bizim de kullandığımız yöntem kullanılmıştır (16).

- Çalışmada SP düzeyindeki değişimin SP'ye özgül olup olmadığının belirlenmesi için, SP ile birlikte bulunan diğer peptitlerin düzeyindeki değişimlerin incelenmesi de amaçlanmıştır. Bu peptitlerden en yaygın olanı CGRP ve VIP düzeyindeki değişiklikler de çalışılmıştır. Ayrıca bu peptitlerin renal hücreli karsinomda düzeyini gösteren çalışmalar bulunmamaktadır ve bizim çalışmamızla bu konudaki bilgiler genişlemiştir.
- Enzimlerin lokalizasyonunu belirlemek için parafine alınan dokularda Patoloji Anabilim Dalı'nda immunohistokimya ile boyama yapılmıştır. Alfa-sekretaz aktivitesi gösteren ADAM ailesine ait ADAM9 ve ADAM17 bulunmaktadır. Ölçtüğümüz aktivitenin ADAM10'a ait olup olmadığını gösterebilmek için bu enzimlerin varlığı da immünohistokimya kullanılarak araştırılmıştır. Toplam 60 vakadan tümör örnekleri incelenmiştir. Her vakadan 3 blok (tümörlü alan, tümör-kenar kavşağı ve 2 cm uzaklığındaki normal görünümlü böbrek dokusu) ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda, çalışılan parametrelerdeki değişikliklerin, renal hücreli karsinomun histolojik derece ve alttipi ile ilişkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsidans

Renal hücreli kanser erkeklerde 7. kadınlarda ise 9. en sık gözlenen tümördür. Tüm kanserlerin erkeklerde %4 kadınlarda %3'ünü oluşturmaktadır. Erkek/Kadın görülme oranı 1.6'dır (17). İnsidansı 7. dekada en üst düzeye ulaşır (18,19). Avrupa'nın batı, doğu ve kuzeyinde, Kuzey Amerika ve Avustralya'da daha sık görülmektedir. Japonya hariç Pasifik bölgeleri ve Afrika'da insidansı düşüktür (20). Görüntüleme yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte dünya çapında insidansı yıllık olarak beyaz erkeklerde %2.3, kadınlarda %3.1; siyah erkeklerde %4.3 kadınlarda %3.9 artış göstermektedir (21). GLOBOCAN verilerine göre 2002 yılında tüm dünyada 208.000 böbrek kanserli yeni hasta ve bu hastalık nedeniyle 102.000 ölüm bildirilmiştir (20). Böbrek tümörleri %40'tan fazla ölüm oranıyla ürolojik tümörlerin en letal olanıdır (17). Renal hücreli kanser tüm renal kanserlerin %85'ini oluşturmaktadır (22). İlk tanıda yaklaşık olarak hastaların %20-30'u metastatik iken klinik lokalize renal hücreli kanser nedeniyle nefrektomi uygulanan hastaların %20-40'ında daha sonra metastaz gelişmektedir (23). Renal hücreli kanser çocukluk çağındaki tüm böbrek tümörlerinin %2.3-6.6'sını oluşturmaktadır. Çocuklarda ortalama görülme yaşı 8-9'dur. Erkek ve kız çocuklarda eşit oranda görülür. Evrelemelerine göre değerlendirildiğinde çocuklar erişkinlere oranla tedaviye daha iyi yanıt verirler (24-27).

2.2. Risk Faktörleri

Sigara kullanımı renal hücreli kanser için kesin risk faktörüdür (18,19). Sigara içenlerde içmeyenlere göre 1.6-2.3 kat daha fazla renal hücreli kanser gelişmektedir (28). Göreceli olarak risk sigara içme süresi ile ilişkilidir ve sigara bırakıldıktan sonra azalmaktadır (29-31). Sigara içilen ortamlarda sigara dumanına maruz kalanlarda aynı risk mevcuttur (28). RHK için en önemli koruyucu önlem sigara kullanımının sonlandırılmasıdır (32).

Vücut kitle indeksi yüksek olanlarda RHK görülme riski 2 kat artmaktadır. Obezitenin ciddiyetiyle doğru orantılı olan bu ilişkili kadınlarda daha belirgindir (19).

Hipertansiyon etyolojik faktörler arasında etkindir (18,19). RHK'ya bağlı mortalite hipertansiyonun eşlik ettiği hastalarda daha yüksek orandadır (33).

Protein ve yağdan zengin beslenme RHK riskini yaklaşık 1.5 kat arttırmaktayken meyve ve sebze tüketimi RHK riskini azaltmaktadır (34).

Sedanter tip hayat diğer bir risk faktörüdür (35).

Asbest, kadmiyum, petrol ürünleri, organik çözücüler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlarla çalışan meslek grupları risk altındadır (36).

Kronik böbrek yetmezliği nedeniyle hemodiyaliz uygulanan hastalarda RHK insidansı daha yüksektir (37).

İyonize radyasyona maruziyet ikincil böbrek kanserlerine yol açabilmektedir (38). Von Hippel Lindau ve tuberoz skleroz RHK riskini arttıran gen mutasyonlarıdır (39). Özellikle 3. ve 11. kromozomlarda spesifik translokasyonlar etyolojide yer alır (40).

2.3. Patoloji

RHK genel olarak infiltratif görünümde yuvarlak ya da ovaloid yapıdadır. Çevresine yaptığı baskı nedeniyle komprese olmuş parankim ya da fibrotik doku ile birlikte gözlenebilir (31). Kesitlerinde içerisinde hemorajik, nekrotik ya da fibrotik alanların eşlik ettiği sarı-kahverengi tümör dokusu gözlenir. Ayrıca kesitlerde linear veya plak şeklinde kalsifikasyonlar, kistik dejenerasyonlar da gözlebilir. Son yıllarda immünohistokimya, sitogenetik ve moleküler genetik çalışmaların getirdiği bilgi birikimi sonucu RHK sınıflamasında hızlı gelişmeler ortaya çıkmıştır. Geleneksel olarak 4 gruba ayrılan RHK'da sarkomatoid lezyonlar ayrı bir türden çok diğer histolojik tiplerin derivesi olan kötü differansiye elemanı olarak kabul edilmiştir. Histolojik özellikleri esas alınmak suretiyle gruplanmış olan RHK'nın 2004 yılında Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre sınıflaması şu şekildedir :

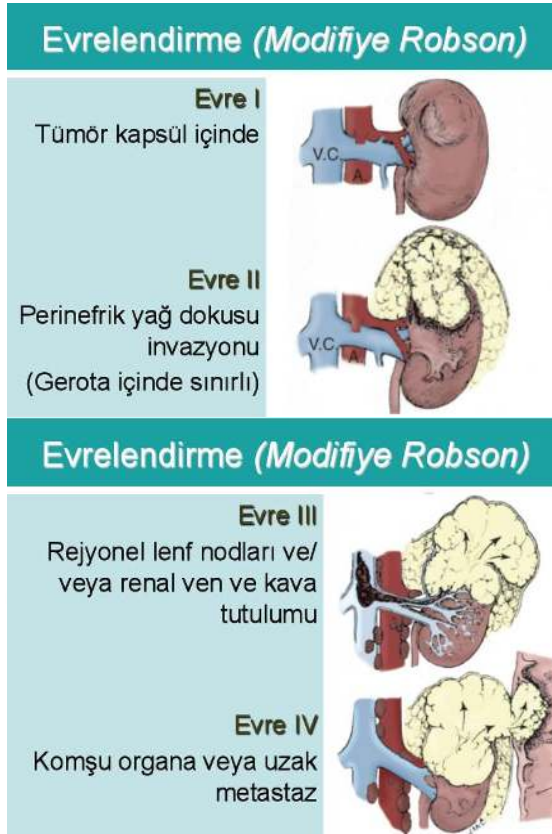
- Şeffaf hücreli renal hücreli karsinom
- Multiloküler şeffaf hücreli renal hücreli karsinom
- Papiller renal hücreli karsinom
- Kromofob renal hücreli karsinom
- Bellini'nin toplayıcı kanal karsinomu
- Renal medüller karsinom

- Xp11 translokasyon karsinomları
- Nöroblastom ile beraberlik gösteren renal karsinom
- Müsinöz tübüler ve içsi hücreli karsinom
- Renal hücreli karsinom, sınıflandırılmayan
- Papiller adenom
- Onkositom

RHK sıklıkla unilateral ve sporadik olarak görülmekle birlikte olguların %3-25'i sporadik multifokal olarak görülmektedir (41-43). Çeşitli kalıtsal kanser sendromlarında böbrekler de tutulmaktadır (%1-2) ve tutulum genellikle bilateral çok sayıda tümör odakları halinde izlenmektedir (44). Satellit lezyonlar genellikle küçük olup ameliyat öncesi incelemede ve inspeksiyonla görülmeleri oldukça zordur. Satellit lezyonlar nefron koruyucu cerrahi (NKC) sonrası lokal rekürrense neden olan en önemli faktördür (45).

2.4. Evreleme

İlk RHK sınıflaması Flocks ve Kadesky (46) tarafından tümörün anatomik uzanımlarına göre hazırlanmıştır. Bu sınıflamada tümörün renal kapsülle sınırlı olması evre 1, renal pedikül ve/veya renal yağ tutulumu evre 2, reyonel lenf nodu tutulumu evre 3 ve uzak metastazlar evre 4 olarak değerlendirilmiştir. Robson ve ark. (47) tüm lokalize RHK'ları tek bir grupta toplayan ve evre 1 olarak değerlendiren yeni bir sınıflandırma hazırladılar (Şekil 2.1). Bu sınıflandırmada perirenal yağ doku tutulumu evre 2, renal ven veya inferior vena kava tutulumu evre 3A, lenf nodu tutulumu evre 3B, gerota fasyasını aşması evre 4A, uzak metastaz evre 4B olarak değerlendirilmiştir. Geniş kullanım alanı bulan bu sınıflandırma 1990'ların başında yerini American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union International Contra le Cancer (UICC) tarafından hazırlanan TNM sistemine bırakmıştır (48). Hastaları çok daha iyi bir şekilde sınıflandırarak değişen prognozlara göre etkili bir şekilde alt gruplar oluşturan TNM sınıflaması 2010 versiyonu Tablo 2.1'de, evrelemesi Tablo 2.2'de verilmiştir (49-51).



Şekil 2.1. Böbrek tümörlerinde modifiye Robson evrelendirmesi.

Tablo 2.1. 2010 TNM RHK sınıflaması.

- **T:Primer tümör**
- **Tx** Primer tümör saptamak için veriler yeterli değildir.
- **T0** Primer tümöre ait kanıt yok
- **T1** Tümör en büyük boyutu ≤ 7 cm , böbrek içinde sınırlı
 - **T1a** Tümör büyük çapı ≤ 4 cm
 - **T1b** Tümör büyük çapı >4 cm ama ≤ 7 cm
- **T2** Tümör en büyük boyutu >7 cm , böbrek içinde sınırlı
 - T2a** tümör boyutu 7-10 cm , böbrek içinde sınırlı
 - T2b** tümör boyutu >10 cm , böbrek içinde sınırlı
- **T3** Tümör major venlere yayılmış veya perinefrik dokuları tutmuş ancak ipsilateral sürrenal bezi tutmamıştır ve gerota fasyasını aşmamıştır.
 - **T3a** Tümör perinefrik dokuları , renal sinüs veya renal veni tutmuş.
 - **T3b** Tümör V. Kava'yı diafragma altında gros olarak tutmuştur.
 - **T3c** Tümör V. Kava'yı diafragma üstünde gros olarak tutmuştur.
- **T4** Tümör gerota fasyasını aşmıştır veya direkt adrenal bez içine invazyon yapmıştır.
- **N:Bölgesel Lenf Nodları**
- **Nx** Bölgesel lenf nodlarını saptamak için veriler yeterli değildir.

- **N0** Bölgesel lenf nodlarında metastaz yok.
- **N1** Tek veya birden fazla lenf nodunda metastaz vardır.
- **M:Uzak Metastaz**
- **Mx** Uzak metastazı saptamak için veriler yeterli değildir.
- **M0** Uzak metastaz yok.
- **M1** Uzak metastaz var.



Tablo 2.2. 2010 TNM RHK evrelemesi.

Hastalık karakteri	Skor			Evre
	Tümör	Lenf Nodu	Metastaz	
Renal kapsüle sınırlı				
≤4 cm	1a	0	0	I
>4 cm - <7 cm	1b	0	0	I
>7 cm	2	0	0	II
Renal kapsülü aşmış; Gerato fasyası ile sınırlı	3a	0	0	III
Renal ven veya V.Cava tutulumu	3b/c	0	0	III
Lenf nodu tutulumu	1-3a	1	0	III
Direkt organ invazyonu	4	Herhangi N	0	IV
Metastatik	Herhangi T	Herhangi N	1	IV

2.5. Semptomlar

RHK böbreklerin retroperitoneal yerleşimi nedeniyle sıklıkla hastalığın doğal seyrinin ileri dönemlerine kadar palpe edilemez ve asemptomatik kalır (52). RHK’de semptomlar kitlenin kendisine, paraneoplastik sendromlara ya da metastazlara bağlı olarak ortaya çıkabilir. Spesifik olmayan çeşitli semptom komplekslerinin değerlendirilmesi esnasında kullanılan invazif olmayan radyolojik görüntüleme yöntemleri sayesinde RHK’lerin %50’den fazlası insidental olarak teşhis edilir (52). Klasik triad olan ağrı, makroskobik hematüri ve palpe edilebilen abdominal kitle hastaların ancak %6-10’unda gözlenir (53,54).

Hematüri en sık başvuru semptomudur. RHK hastalarının %50’sinden fazlasında görülür ve ancak toplayıcı sistem tutulmuşsa bu bulgu vardır. Mikroskopik hematüri ise %63 hastada saptanabilmektedir. Pıhtı gelişen hastalar kolik tarzı ağrı ile başvurabilirler. Yan ağrısı kanamaya, ileri hastalık ya da çevre dokulara invazyona bağlı olabilir.

Fizik muayenenin RHK teşhisinde rolü kısıtlıdır. Abdominal kitle veya servikal lenfadenomegali palpe edilebilir. Venöz tutulum veya kitle etkisine bağlı olarak bilateral alt ekstremitte ödemi veya varikozel izlenebilir. Semptomatik RHK’lerin yaklaşık %30’unda paraneoplastik sendromlar bulunur. Paraneoplastik sendromlara ait, izlenen en sık semptomlar hipertansiyon, kilo kaybı, gece terlemeleri, nöromiyopati, amiloidoz, artmış sedimentasyon hızı, anemi, polisitemi, anormal

karaciğer fonksiyonları, hiperglisemi, kanama bozuklukları, hiperkalsemi ve buna bağlı olarak gelişebilen bulantı, letarji, derin tendon refleksi artışıdır (55,56).

Makroskobik veya mikroskobik hematüri özellikle sigara tüketimi olan 40 yaş üzeri hastalarda daha ayrıntılı incelenmelidir (57). Hastaların %20'si metastatik hastalığa bağlı oluşan kemik ağrısı, persistan öksürük gibi direkt semptomlarla teşhis edilir (52).

2.6. Radyolojik Görüntüleme

RHK'nın tanı, evreleme ve takibinde radyolojik görüntülemeler günümüzde artık hayati önemde rol almaktadır. Renal kitlelerin %60'dan fazlası çeşitli nedenlerle uygulanan abdominal görüntülemeler esnasında insidental olarak saptanmaktadır (58). RHK daha sıklıkla küçük boyutlu, metastaz yapma olasılığı düşük kitle olarak karşımıza çıkmakta bu sebeple adrenal bez koruyucu radikal nefrektomi, nefron koruyucu cerrahi gibi birçok tedavi seçeneği de kullanılabilir hale gelmektedir (59,60). Geçmişte kullanılmakta olan konvansiyonel yöntemler yerlerini ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT) ve magnetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi yöntemlere terk etmişlerdir. Bu görüntüleme teknikleri sayesinde böbrek ve toplayıcı sistemin benign-malign lezyonları ayırımında çok önemli bilgiler elde edilebilmektedir.

USG invazif olmaması, diğer görüntüleme yöntemlerine göre daha ucuz olması nedeniyle hematüri şikayeti ile başvuran hastalarda sıklıkla ilk tercih edilen görüntülemedir. RHK'lerin büyük çoğunluğu USG'de solid lezyonlar olarak görüntülenirler. Lezyonların büyük kısmı izoekoik (%86) karakterdedir. Hipoekoik (%10) ve hiperekoik (%4) karakterler daha nadir görüntülenir (61). USG ayrıca NKC uygulanması esnasında intra operatif de kullanılabilir. Kitle sınırlarını ve multifokaliteyi göstermede oldukça duyarlıdır (62).

Spiral BT ve hemen ardından çok hızlı ve volümetrik tarama yapabilen çok kanallı BT (ÇKBT) teknolojisinin ortaya çıkmasıyla küçük böbrek kitleleri bile karakterizasyon yapılarak görüntülenebilmektedir (63). Primer tümörün ekstrarenal uzanımları, venöz tutulumlar, bölgesel lenf nodları ve adrenal bez ile aynı zamanda kontrateral böbreğin morfoloji ve fonksiyonu da değerlendirilebilir (64).

BT ve MRG'nin solid renal lezyon saptamadaki başarıları birbirine oldukça yakındır (65,66). MRG kontrast allerjisi ya da renal yetmezliği bulunan hastalarda öncelikle tercih edilmelidir (67). İyotlu kontrast madde kullanılmıyor olması ve iyonizan radyasyonun olumsuz etkilerinden sakınılıyor olması büyük avantaj sağlamakta, multiplanar görüntülemesi ile hem renal lezyonları hem de vasküler invazyonu çok iyi gösterebilmektedir (68-71).

Renal arteriyografi, inferior venakavografinin klinik kullanımdaki yerleri seçilmiş vakalarla sınırlıdır.

2.7. Renal Hücreli Kanser İçin Prognostik Faktörler

Prognostik faktörler anatomik, histolojik, klinik ve moleküler olarak sıralanabilir (23).

RHK'in klasifikasyonu, prognostik ve prediktif bilgilerin elde edilmesi ve kişiye özel kanser tedavisine olanak sağlamak için yeni moleküler belirteçler üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

Anatomik faktörler tümör boyutu, yağ doku tutulumu (72), adrenal invazyon venöz invazyon, lenfatik invazyon, uzak metastaz varlığı veya yokluğunu içerecek şekilde TNM sınıflamasında açıkça belirtilmiştir (73, 74).

Histolojik prognostik faktörler Fuhrman nükleer derecelendirmesi, histolojik tip (75), sarkomatoid karakter, histolojik nekroz ve toplayıcı sistem invazyonunu içerir (76,77).

Klinik değerlendirmede hastanın genel sağlık durumu ile ilgili performans (78), lokal semptomlar, kaşeksi ve trombosit sayımı (79) prognostik faktörlerdir.

Moleküler prognostik belirteçler hipoksi indüklenebilir yolak, proliferasyon, hücre siklusu, hücre adezyonu ve diğerleri başlıkları altında toplanabilir.

RHK'de anatomik, histolojik ve klinik prognostik faktörler, moleküler prognostik belirteçler Lam ve ark. tarafından 2005 yılında şöyle uyarlanmıştır (Tablo 2.3) (23):

Tablo 2.3. RHK’da anatomik, histolojik, klinik prognostik faktörler ve moleküler prognostik beliteçler.

Anatomik Prognostik Faktörler

Tümör boyutu
Venöz tutulum
Tümörün çevre dokulara yayılımı
Lenf nodu tutulumu
Adrenal bez tutulumu
Uzak metastaz

Histolojik Prognostik Faktörler

Tümör derecesi
Histolojik nekroz
Histolojik tip
Toplayıcı sistem invazyonu
Sarkomatoid komponent varlığı

Klinik Prognostik Faktörler

Performans durumu
Kaşeksi
Lokal semptomlar
Trombosit sayısı

Moleküler Prognostik Belirteçler

-Hipoksi indüklenebilir yolak

CA IX, CA XII, CXCR4, VEGF, IGF-1

-Proliferasyon

Ki-67

-Hücre siklusu

P53, Bcl-2, PTEN, Cyclin A, p27

-Hücre adezyonu

EpCAM, EMA, E-cadherin, X-catenin, Cadherin-6

-Diğerleri

Gelsolin, Vimentin, Ca 125, CD44, ADAM-10, Androjen resptörleri, Caveolin-1, VEGFR, CXCL 16, B7-H1, Ki-67, Survivin, GLUT-1, Endoglin, ABCBI ve ABCCI

Lokalize hastalığı olan hastalarda nefrektomiye takiben yüksek relaps oranları cerrahi sırasında belirlenemeyen mikrometastazların varlığını gösterir (158). Esas olan hangi hastaların yüksek rekürrens riskine sahip olduğunu belirlemektir. Her evreden RHK hastalarında prognozu tahmin etmede bir kaç sınıflandırma şeması vardır. Bu şemalar lokalize RHK'da ameliyattan sonraki sonuçları öngörmek için, metastatik hastalıkta genel sağkalımı tahmin etmek için kullanılırlar (159). RHK'yı moleküler düzeyde çözümleme çabaları ve yeni belirteçlerin keşfedilmesi hastalığın prognozu göstermede yardımcı olacak evreleme sisteminin kullanımına olanak sağlayacaktır. Hastaliksız sağkalım ile bağımsız olarak ilişkili 5 belirteç vardır; Ki-67, p53, epitelyal ve endotelyal VEGFR-1 ve epitelyal VEGFD (160).

Günümüzde RHK'nın moleküler haritası mevcut verilerle çizilmeye başlanmıştır. RHK için doğru tanı ve tedavide potansiyeli en önemli iki biyolojik belirteç CAIX ve VEGF dir. Yeni belirteçlerin validasyonlarının yapılmasına rağmen hala en iyi bilinen yol berrak hücreli RHK ile VHL arasındaki ilişkidir.

2.7.1. Anatomik prognostik faktörler

Patolojik evre RHK için en önemli prognostik belirteçtir. Lokalize hastalıkta 5 yıllık sebep-spesifik sağkalım evre 1'de %90-100 ve evre 2'de %74-95'dir (23,80). Hastalık-spesifik 5 yıllık ve 10 yıllık sağkalımlar pT1a tümörler için sırasıyla %95.3 ve %91.4, pT1b tümörler için %81.6 ve %75.2 olarak bulunmuştur (81). Evre 3 RHK hastaların sebep-spesifik 5 yıllık sağkalımları %60-70 aralığındadır (80,82). Özellikle perinefrik veya renal sinüs yağ doku invazyonu organ sınırlı tümörlerle kıyaslandığında %15-20 oranında sağkalımda gerileme gözlenmektedir. Bu gruptaki hastaların 5 yıllık kanser-spesifik sağkalımları %51-68'e düşmektedir (82). Sinüs yağ doku invazyonu (5 yıllık kanser-spesifik sağkalım %25.9) perinefrik yağ doku invazyonundan (5 yıllık kanser-spesifik sağkalım %50.9) daha agresif seyirlidir (83).

Yağ doku tutulumu sıklıkla renal kapsül aracılığıyla (perirenal yağ doku, sadece perinefrik %79) nadiren de renal sinüs aracılığıyla (sinüs yağ doku; sadece sinüs yağ doku %7.8; sinüs ve perinefrik yağ doku %13.2) gerçekleşir (84). Büyüme esnasında tümör kendini bir psödokapsülle kapladığı için renal kapsülden kesin invazyonun belirlenmesinde sıklıkla zorluklar yaşanmaktadır. Yağ dokusuna uzanan gerçek bir invazyon ve penetrasyonun ayırımındaki güçlük nedeniyle tümör çapının

renal kapsül invazyonundan daha önemli prediktif değeri olduğunu belirten yayınlar mevcuttur (85,86).

Adrenal bez tutulumu ile yüksek tümör derecesi, lenf nodu tutulumu ve metastatik hastalık arasında ilişki gözlenmişse de adrenal bez tutulumunun tek başına bağımsız bir prognostik faktör olduğu belirtilmiştir (87). İpsilateral adrenal beze komşuluk yoluyla invazyon yaklaşık %2.5 oranında görülür. TNM 2002 sınıflamasında pT3a olarak belirtilmekle birlikte prognozu perinefrik yağ doku invazyonundan daha kötü olarak belirtilmiştir (23). İpsilateral adrenal bez invazyonunu doğrudan pT4 olarak sınıflandırılmasını öneren çalışmalar mevcuttur (88).

RHK'nin renal vene yayılımı %10-20, inferior vena kavaya yayılımı %4-10 oranlarında gözlenir. Venöz yayılım hastaların büyük bölümünde perirenal yağ doku veya adrenal bez invazyonu ve reyonel lenf nodu tutulumu ile birliktelik göstermektedir (80,89). Venöz duvarın neoplastik trombüs tarafından infiltrasyonu negatif prognostik faktör olarak değerlendirilir. Bu hasta grubunun 5 yıllık kanser-spesifik sağkalımı %25'ten daha azdır (82). Trombüsün tam olarak çıkartılabildiği hastalarda tümör trombüsünün vena kavadaki seviyesi uzun dönem sağkalımı etkilememektedir (90). Renal ven trombüsü olmayan lokal hastalığa sahip hastalarda 5 yıllık sağkalım %72 iken trombüsün tam olarak çıkartıldığı hastalarda bu oran benzer şekilde %68'dir (91). Klinik metastatik olmayan RHK'lerde mikroskobik mikrovasküler invazyon bulunan hastalarda %29-29.2 oranında progresyon beklenirken invazyon bulunmayanlarda bu oran %6.2-17'dir (92,93). Renal sinüs venlerinde tutulum organa sınırlı hastalıkta metastaz riskini göstermektedir (94).

Reyonel lenf noduna yayılım daha önce anlatılmış olan anatomik prognostik faktörlere oranla sağkalımı daha fazla etkilemektedir. Lenf nodu tutulumu olan hastalarda kanser-spesifik sağkalım sadece %8-32 oranlarındadır (23,95). Lenf nodu tutulumu olan hastalarda metastatik hastalık bulunma olasılığı 3-4 kat fazladır (96,97). İncelenen lenf nodu sayısının ($13 >$; $13 <$) metastaz tespitine etkisi olabilmektedir (98). Lenf nodu tutulumunda immunoterapiye cevabın lenf nodu disseksiyonu yapılan hastalarda daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (96,97).

Hastalığın metastatik yayılımı en kötü prognostik faktör olarak kabul edilir. Kanser-spesifik 5 yıllık sağkalım %5-10 oranında 10 yıllık sağkalım ise %0-7 oranında beklenir. Tek metastaza sahip hastaların uzun dönem prognozları daha iyidir (99).

2.7.2. Histolojik prognostik faktörler

RHK'nin nükleer özellikleri oldukça değişkendir. Çekirdeğin büyüklüğüne, pleomorfizmine ve nükleolus belirginliğine bakılarak oluşturulan Fuhrman nükleer derecelendirme sistemi RHK için bağımsız prognostik faktör olarak kabul edilmekte olup bu sınıflandırma sistemi Tablo 2.4'de verilmiştir (76).

Tablo 2.4. Fuhrman nükleer sınıflandırması.

Grade	Nükleer çap	Nükleer çeper	Nükleolus
1	10 µm	Yuvarlak, uniform	Yok ya da silik
2	15 µm	Düzensiz	Küçük (X 400 büyütmede görülür)
3	20 µm	Düzensiz	Belirgin
4	>20 µm	Multilobule	Belirgin, yoğun kromatin demetleri

2004 DSÖ RHK histolojik alt tip sınıflaması değişik prognoza sahip belirli histolojik alt tipleri diğerlerinden açıkça ayırmıştır. En sık gözlenen tipler (berrak hücreli, papiller, kromofob) arasındaki bu farklılıklar tek yönlü çalışmalarda istatistiksel anlamlı (100,101) ancak evre ve derece ile standardize edilmiş çok yönlü çalışmalarda bağımsız olarak istatistiksel anlamlı bulunamamıştır (102). Buna rağmen bazı hücre tipleri değişik karsinogenez yollarıyla bağlantılı görülmekte (103) ve gelecekte uygulanacak olan terapilere cevaplarının değişik olacağı düşünülmektedir (104).

RHK'nin alt tiplerinden en sık gözlenen berrak hücreli karsinomdur. Papiller renal hücreli kanser daha az malignant olan tip 1 ve daha agresif özellik gösteren tip 2 olarak 2'ye ayrılır (105). Tip 2 varlığı bağımsız bir kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilir (106). Kromofob tip prognoz en iyi olduğu renal hücreli kanser olarak kabul edilir (100,107). Renal medüller karsinom çok kötü prognoz gösteren ve genç siyahlarda görülen histolojik alt tiptir (82). Bellini'nin toplayıcı kanal karsinomu da kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilen histolojik alt tiptir (108). RHK'de bağımsız kötü prognoz göstergesi olan sarkomatoid elemanlar histolojik bir alt tip olarak kabul edilmemekte ve her histolojik tipe birliktelik gösterebilmektedir (109,110). Histolojik nekroz lokalize hastalıkta bağımsız kötü prognostik faktör olarak 3 kat daha fazla ölüm oranına sahiptir (100) ancak metastatik hastalıkta prognostik

önemi yoktur (111). Toplayıcı sistem invazyonu da lokalize hastalıkta kötü prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (112).

2.7.3. Klinik prognostik faktörler

RHK teşhisi esnasında asemptomatik olan hastaların tümör evresi, derecesi ve metastaz riski daha düşük olup sağkalımları da tanı anında semptomatik olan hastalardan daha uzundur (113,114). Genel sağlık durumundaki bozukluk, %10'dan fazla kilo kaybı, kaşeksi, kemik ağrıları kötü prognoz göstergesidir (115-117). Trombositoz güçlü bir prognostik faktör olarak değerlendirilir ve varlığında 5 yıllık sağkalım oranı %38'e geriler (118). Stauffer's sendromu (nefrojenik hepatik disfonksiyon, Block-Stauffer-Rothmand's sendromu) hepatosplenomegalinin gözlendiği laboratuvar incelemelerinde trombositoz, hipoalbüminemi, protrombin zamanında uzama ve fibrin yıkım ürünlerinin artmasının eşlik ettiği metastatik olmayan hepatik disfonksiyon olarak tanımlanır (119). Ayrıca bu sendroma gama-globulin, alkalen fosfataz (ALP) ve gama glutamil transferaz (GGT) serum düzeylerinde yükselme eşlik eder. Karaciğerde nonspesifik nötrofil, lökosit, monosit ve granülom infiltrasyonları izlenebilir. Bu bulgular nefrektomi sonrası düzelir. Ameliyat sonrası dönemde bulguların ortadan kalkmaması kötü prognonoz işaretidir (120).

2.8. Tedavi

2.8.1. Lokal hastalık

Cerrahi rezeksiyon RHK'nın tedavisinin köşetaşını oluşturur. Lokalize RHK olgularının çoğunda nefrektomi küratif olurken ilerlemiş bazı RHK olgularında sistemik terapi öncesi yapılan nefrektomiden fayda görmektedir. RHK standart kemoterapötik ajanlara yanıt vermeyen bir kanser türüdür. İmmunoterapiye olguların ancak %10-15'i yanıt vermekte, bu olguların da çok az bir kısmında kalıcı kür sağlanabilmektedir (121).

2.8.1.1. Radikal nefrektomi

Radikal nefrektomi (RN) ilk defa Robson tarafından 1963 yılında tanımlanmıştır. 1969 yılında ise evre 1 ve evre 2 hastalarda sırasıyla %66 ve %64 sağkalım elde eden Robson ve ark. bu cerrahi tekniği 'Altın standart' olarak kabul

etmişlerdir. Radikal nefrektomide klasik olarak öncelikle renal arter ve ven bağlanarak kesilmekte; tümörlü böbrek Gerota fasyası, ipsilateral adrenal bez ve proksimal üreter ile birlikte çıkartılmaktadır. Bölgesel lenfadenektomi de uygulanarak ameliyat tamamlanmaktadır (122). Günümüzde RN büyük boyutlarda tümörü olan; nefron koruyucu cerrahi için uygun olmayan olgularda; vena kavaya

uzanım gösteren komplike tümör trombusu varlığında; birlikte başka cerrahi girişimlerin de gerektiği (örneğin renal arter stenozu gibi) ya da tek organ metastazının olduğu ve metastazektomi de yapılması planlanan olgularda yapılmaktadır (123). RHK'de adrenal bez tutulumu %1.2-10 oranında bildirilmiştir (124). Adrenal bez, gerota fasyası içinde perirenal yağ dokusundan fibröz bir septum ile ayrılır. Tümörün hematojen yayılımı dışında doğrudan invazyonu da adrenal bez tutulumuna sebep olabilmektedir. Tümörün evresi ve lokalizasyonu adrenal tutulumunu etkilemektedir. Özellikle böbreğin üst polünden kaynaklanan RHK'de tutulum artmaktadır (125,126). Robson tarafından önerilen nefrektomiyle birlikte uygulanan adrenaletomi günümüzde küçük tümörlerin tedavisinde artık standart olarak kabul edilmemektedir. Ameliyat öncesi incelenen bilgisayarlı tomografi görüntülerinde adrenalın izlenmemesi, itilmiş ya da büyümüş olarak saptanması durumunda veya böbreğin üst polünden köken almış tümörlerde adrenaletomi uygulanması önerilmektedir (127-129).

Genişletilmiş lenfadenektominin hastanın uzun dönem sağkalımına etkisi olmadığı gözlemlendiğinden lenfadenektominin sadece evreleme amacıyla perihiler dokuda sınırlandırılması önerilmektedir (127,128).

Radyolojik olarak saptanan veya palpe edilen lenf nodu bulunan olgularda lenfadenektomi yapılması önerilmektedir.

2.8.1.2. Nefron koruyucu cerrahi

Küçük boyutlu renal kitlelerin saptanma sıklığının giderek artması, böbreğin radyolojik görüntülenmesinde meydana gelen gelişmeler, cerrahi tekniğin ve böbrekte meydana gelebilecek iskemik hasarın önlenmesi amacıyla kullanılan yöntemlerin gelişmesi, renal replasman tedavisini de içeren ameliyat sonrası iyi bir bakım ve uzun süreli kansersiz sağkalıma ait veriler NKC'nin kullanımının yaygınlaşmasına neden olmuştur. Zaman içerisinde 10 yıl ve daha uzun süreli veriler elde edildikçe NKC'nin düşük morbidite ve yüksek hasta memnuniyeti elde edilen güvenli bir yöntem

olmasının yanısıra son derece iyi onkolojik sonuçlar ve renal fonksiyonlar sağladığı gözlenmiştir (131-133).

NKC'nin kesin endikasyonları nefrektomi sonrası hastayı diyaliz bağımlı hale getirecek olan durumlardır. Rölatif endikasyonlar ise renal fonksiyonu risk altına alan ya da gelecekte risk altına alabilecek olan durumlardır. NKC endikasyonları şunlardır:

□ **Kesin Endikasyonlar**

- Soliter böbrekteki tümörler
- Bilateral tümörler
- Şiddetli böbrek yetmezliği

□ **Rölatif Endikasyonlar**

- Karşı böbrekte hastalık olması
- ◆ Nefrolitiazis
- ◆ Geçirilmiş rekürren piyelonefrit
- ◆ Vezikoüreteral reflü
- ◆ Üreteropelvik bileşke darlığı
- ◆ Hafif-Orta dereceli böbrek yetmezliği
- Böbrek yetmezliğine yol açabilen hastalık varlığı
- Hipertansiyon
- Diabetes Mellitus
- Multifokal hastalık ya da ailesel sendromlar
- Papiller RHK
- Von Hippel-Lindau hastalığı
- **Elektif Endikasyonlar**
- 4 cm'den küçük boyutlu renal kitleler
- Genç, sağlıklı bireyler
- Periferik yerleşimli tümörler

Elektif NKC normal kontralateral böbreği ve tek, 4cm'den küçük, klinik lokalize RHK'ü bulunan hastalara uygulanan cerrahidir. Bu hasta grubunda NKC'nin radikal nefrektomi ile aynı onkolojik sonuçlar sağladığı ve renal fonksiyonların NKC uygulanan hastalarda daha iyi olduğu görülmüştür (134-137).

Boyutu 4 cm'nin üzerinde veya multipl olan lokalize RHK'de NKC'nin sonuçlarının daha başarısız olduğu gösterilmiş ve bu olgularda karşı taraf böbrek sağlamsa radikal nefrektominin tercih edilmesi önerilmiştir (138). Bununla birlikte

son verilere göre boyutu 7 cm'den küçük olan tek odak tümörlerde NKC'nin güvenle kullanılabileceği ve klinik T1 olan tümörlerde elektif NKC'nin iyi bir tercih olabileceğini gösteren yayınların sayısı artmaktadır (139-141).

2.8.1.3. Nefron koruyucu doku ablasyon teknikleri

Renal tümörleri bitişik normal parankime ve komşu organlara zarar vermeden çeşitli enerji formları kullanılarak tahrip etmeyi amaçlayan minimal invazif doku ablasyon teknikleri daha sık olarak kullanılmaya başlanmıştır (142,143). Özellikle cerrahiye uygun olmayan veya hereditör tümör zemini bulunan hastalarda kriyoablasyon (144,145), radyofrekans ablasyon (146-148), mikrodalga ablasyon, lazer ablasyon ve yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason dalgalarıyla (HIFU) çalışmalar sürdürülmektedir.

2.8.2. Metastatik hastalık

RHK hematogen yolla başta akciğer olmak üzere kemikler, karaciğer, sürrenal, ve karşı böbreğe yayılabilir.

2.8.2.1. Cerrahi tedavi

Metastatik böbrek kanserinde cerrahi girişimin rolü iki başlık altında incelenebilir. Birincisi nefrektomi sonrası hastayı tüm metastazlarından kurtarmak olan metastazektomi; ikincisi ise metastazları çıkarılamayacak durumda olan hastalarda sistemik tedavi öncesi primer tümörün çıkarılmasını ifade eden sitoredüktif nefrektomidir. Metastatik RHK'da nefrektomi prognoza olumlu etki sağlamakla beraber semptomların palyatif tedavisinde de etkilidir. Palyatif nefrektomi ağrı kontrolü, hematürinin giderilmesi, nadiren de paraneoplastik semptomların ortadan kaldırılmasında etkili olabilmektedir. Cerrahi ayrıca metastazların neden olduğu lokal semptomların kontrolü amacıyla da kullanılabilmektedir (17). Primer tümör kitlesi immun sistem üzerinde negatif etki yaratmakta ve kitlenin çıkartılması immunoterapötik potansiyeli arttırmaktadır (149). Teorik olarak sitoredüktif nefrektomi performans statüsünde iyileşme sağlamakta böylece immunoterapi daha iyi tolere edilebilmektedir (41).

Soliter metastazlara yönelik metastazektomi sonrası 5 yıllık sağkalım %30-35 gibi kabul edilebilir seviyelere ulaşabilmektedir (150). Metastazektomi ayrıca spinal kord kompresyonu veya patolojik fraktüre bağlı oluşan semptomların palyasyonunda da endikedir (151,152).

2.8.2.2. Kemoterapi, immunoterapi ve diğer tedaviler

RHK hastalarının yaklaşık üçte biri tanı esnasında metastatik hastalığa sahiptir ve yaklaşık %40'ı da bu hastalıktan dolayı ölmektedir. Altta yatan moleküler biyolojinin aydınlatılması ile tedavide anlamlı bir ilerleme sağlanmasında RHK bir model olmuştur. Von Hippel Lindau (VHL) geninin keşfedilmesi renal hücrenin moleküler biyolojisini daha hızlı anlamamızı sağlamıştır. Berrak hücreli RHK'da VHL geninin inaktivasyonu, hipoksi indüklenebilir faktörü (HIF) ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) proteini üretiminin aktivasyonuna neden olur. Bu biyolojik mekanizma, metastatik RHK'da spesifik moleküler değişiklikleri hedef alan tedavilerin başarılı bir şekilde uygulanmasını sağlamıştır. Moleküler yapının daha iyi anlaşılmasının yanı sıra, tümör biyolojisi, genetik ve hedefe yönelik tedavilerdeki araştırmalar RHK hastalarının prognzunu düzeltme ile ilgili çalışmalarda bir başlangıç olmuştur. RHK spesmenlerinin DNA, RNA, ve protein belirteçleri ekspresyonu açısından incelenmesinin hastalar için prognostik veya prediktif bilgi sağlayabileceği ve tedavi seçiminde rehberlik edebileceği rapor edilmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmadaki ortak amaç RHK hastasının en iyi şekilde sınıflandırılması ve buna uygun algoritmaların oluşturulmasıdır. Moleküler biyolojik belirteçlerle oluşturulacak bu algoritmanın RHK'yı en iyi şekilde tedavi etmememizi sağlayacağı düşünülmektedir. Standart sitotoksik ilaçlar RHK'da etkisizdir. En iyi kemoterapi cevapları floksüridin ve 5-florourasil ile elde edilen cevaplar %15'ler civarında kalmıştır (153). İmmunoterapi baskılanmış immün sistemin canlandırılması veya duyarlılaştırılmış hücrelerin konakçıya geri verilmesi şeklinde uygulanabilmektedir. Sitokinlerin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. İntraselüler ve interselüler sinyal mekanizmasını başlatarak kanser hücrelerini indirekt olarak etki ettikleri düşünülmektedir. İnterferon-alfa (IFN-alfa) ile %10-25 oranlarında cevap alınırken İnterlökin-2 (IL-2) ile %15 oranında cevap alınmıştır. IFN-alfa ve IL-2 kombinasyon tedavilerinde ise %30'a varan oranlarda cevap bildiren yayınlar mevcuttur (154). Berrak hücreli RHK'ların çoğunda VHL tümör baskılayıcı genin defekti mevcuttur ve

bu ilişki, RHK ile ilgili tümör belrteçlerinin araştırılmasında önemli bir bilgi olarak değerlendirilmiştir. VHL beyincik, retina, pankreas, ve böbrek gibi çok sayıda organdaki hipervasküler tümörlerle ilişkilidir. Hedefe yönelik tedaviler, dendritik hücre tabanlı immunoterapi, IL- 12 ve VHL gen tedavisi son yıllarda gelişmeye devam eden diğer tedavi yöntemleridir (155-157).

Tablo 2.5. Metastatik Renal Hücreli Karsinomun birinci ve ikinci basamak sistemik tedavisinde kanıta dayalı algoritma. Avrupa Üroloji Birliği önerileri 2010 (derece A).

Tedavi	Risk veya önceki tedavi	Önerilen ajan
Birinci basamak	Düşük veya orta risk mRHK	Sunitinib Bevacizumab + IFN- alfa Pazopanib
İkinci basamak	Yüksek risk mRHK	Temsirolimus
	Önceki sitokin tedavisi	Sorafenib Pazopanib
	Önceki VEGFR tedavisi	Everolimus
	Önce mTOR inhibitör tedavisi	Klinik denemeler (Derece C)
IFN=interferon, mRHK= metastatik renal hücreli karsinom, mTOR= rapamisin memeli hedefi, VEGFR= vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü		

Tablo 2.6. Metastatik berrak hücreli renal hücreli karsinomun sistemik tedavisinde son kılavuzlar.

Kılavuzlar	İlk basamak tedavi		İkinci basamak tedavi	
	İyi ve orta prognoz	Kötü prognoz	Ön sitokin tedavisi	Ön VEGF- hedefli tedavi
Avrupa				
ESMO	Sunitinib veya Bevacizumab +IFN-alfa Opsiyon: Sitokinler* (yüksek doz IL-2 içeren)	Temsirolimus Opsiyon: Sunitinib	Sorafenib Opsiyon: Sunitinib	Everolimus
EAU	Sunitinib veya bevacizumab + IFN-alfa (derece A)	Temsirolimus (derece A)	Sorafenib (derece A)	Everolimus (derece A)
EORTC-GU	Sunitinib (seviye 1b) veya bevacizumab + IFN-alfa (Seviye 1a)	Temsirolimus (seviye 1b)	Sorafenib (seviye 1b) Opsiyon: Sunitinib	Everolimus (seviye 1b)
SOGUG	Sunitinib veya bevacizumab + IFN-alfa	Temsirolimus	Sorafenib	Everolimus
AFU	Sunitinib veya bevacizumab + IFN-alfa veya sitokinler *	Temsirolimus Opsiyon: Sunitinib	Sorafenib Opsiyon: Sunitinib veya bevacizumab+ IFN-alfa	Everolimus
UK	Sunitinib veya bevacizumab + IFN-alfa veya sitokinler*	Temsirolimus	Sorafenib	Everolimus
Kuzey Amerika				
CCO	Sunitinib veya bevacizumab + IFN-alfa	Temsirolimus	Sorafenib	Everolimus
NCCN	Sunitinib (kategori 1) Bevacizumab + IFN-alfa (kategori 1) Temsirolimus (kötü prognoz için kategori 1; Diğer risk gruplarındaki seçilmiş hastalar için kategori 2B) Yüksek doz IL-2* (seçilmiş hastalar, kategori 2A) Sorafenib (seçilmiş hastalar, kateori 2A)		Sorafenib veya sunitinib (kategori 1) Opsiyon: Temsirolimus (kategori 2A) IFN-alfa veya yüksek doz IL-2 veya bevacizumab (kategori 2B) Düşük doz IL-2 (kategori 3)	Everolimus (kategori 1) Opsiyonlar: Sorafenib (kategori 2A) Temsirolimus (kategori 2B) Sunitinib (kategori 2A)
VEGF= Vasküler endotelial büyüme faktörü, ESMO= Avrupa Medikal Onkoloji Derneği, IFN-alfa= interferon alfa, IL-2= interleukin 2, EAU= Avrupa Üroloji Birliği, EORTC-GU= Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Topluluğu Genitoüriner Grup, SOGUG= İspanyol Onkoloji Genitoüriner Grup, AFU= Fransız Üroloji Birliği , CCO= Ontario Kanser Merkezi, NCCN= Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı, mRCC= metastatik renal hücreli karsinom * Sitokinler sadece iyi prognozlu seçilmiş hastalarda önerilmektedir.				

2.9. Substans P (SP)

SP 11 aminoasitten oluşan bir nöropeptittir. Etkisini G proteini aracılı reseptörleri olan NK -1, 2, 3 ile göstermektedir. SP NK -1 reseptörüne yüksek afinite ile diğer 2 reseptörüne düşük afinite ile bağlanır (161). Santral sinir sisteminde ve spinal kordda ağrı iletiminde ve otonomik reflekslerde görev alır. Periferik sinir

sisteminde ise, duyuşal nöronlarda, solunum sistemi, genitoüriner sistem, gastrointestinal sistemde bulunmaktadır (162). Bu nöropeptit lenfositlerin  o almasında, immünglobulin üretiminde, nötrofil kemotaksisinde, makrofajların fagositozunda rol almaktadır (163,164). Gastrointestinal sistem SP'nin yoğun olarak bulunduğu yerdir. Barsaklarda düz kasların kasılmasında, epitelde iyon transportunda, vasküler permeabilitede ve immün fonksiyonlarda rol oynamaktadır (165,166). SP, kronik kolitte doku iyileşmesini epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) transaktivasyonu ve mitojen aktive protein kinaz (MAPK) aktivasyonu ile hücre proliferasyonunu uyarır.

Hücre gelişimi ve transformasyonun serpentin reseptör G protein regulasyonunda, Ras aktivasyonu ve MAP kinaz aktivasyon yolağı kritik öneme sahiptir (167). Bazı  alışmalar SP ile indüklenen MAPK aktivasyonunun fonksiyonel EGFR kinaz kısmı varlığını gerektirdiğini  ne sürmektedir (168). Bundan başka, G protein ile eşleşmiş reseptörler EGFR'yi transaktive ettiği, EGFR sinyal iletim yolağının Ras aktivasyonuna ba lı olduğu öne sürülmektedir (169). Koon ve ark., SP-NK1R ile oluşan EGFR transaktivasyonu mekanizmasının kolonik epitel hücrelerinde TAPI-1 sensitif matriks metalloproteinaz aktivasyonuna da katıldığı (genellikle TACE), membrana ba lı prekürsör proTGF alfa'yı yıkararak, ekstraselüler boşluktan matür formunun ortaya çıkmasına neden olduğunu göstermişlerdir (170). TGF alfa daha sonra EGFR'ye tutunur , aktive eder ve MAPK sinyalini başlatır. Böylece kolonik epitel ve astrositom hücre proliferasyonu indüklenir. Bu yeni yol, bir çok hücre tipinde SP ile ilişkili hücre proliferasyonuna katılmaktadır. Örneğin, kolonik inflamasyon esnasında mukozal iyileşmede olduğu gibi. Pankreas kanseri, insan gliomaları, meme kanseri ve kolon displazi ve karsinomu gibi birçok etyolojide tümör büyümesini, progresyonu ve gelişiminde SP ve NK1R kullanıldığı ve önemli olduğu düşünülmektedir (171-175). SP'nin bir çok normal ve neoplastik hücre tiplerinde mitogenezi NK1 reseptörlerini aktive ederek uyardığı bilinmektedir. Birçok glial beyin tümöründen elde edilen hücre dizilerinde, NK1 reseptörlerinin varlığı SP ve/veya nörokinin A'nın DNA sentezi ve hücresel proliferasyon üzerindeki etkisiyle güçlü br korelasyon gösterir (176,177).  nceki çalışmalarda insan astrositoma hücre dizisinde U-373 MG mitogenezi indükleyen SP'nin rolü yayınlanmıştır .

Son zamanlarda SP'nin tümör hücrelerinde büyümeye yol açtığı ve NK1R antagonisti olan L733,060'ın nöroblastom, gliom, melanom, retinoblastom hücre

dizilerinde antitümöral aktivitesi olduğu gösterilmiştir (178). Bundan başka L733,060 NK1R eksprese eden kanser hücrelerinin metastatik progresyonunu da inhibe etmektedir (179). Kanser hücresi tiplerin büyümesinin NK1R anatagonistleri kullanılarak inhibisyonu, SP antagonistleriyle hem in vitro hem in vivo ortamda küçük hücreli akciğer kanseri ve gliom hücre dizisinin inhibisyonunu gösteren çalışmalarla uygunluk göstermiştir.

SP duysal sinirlerden salıverilen ve kanser gelişiminde rol oynadığı düşünülen en önemli peptittir. SP' yi parçalayan özgül enzim neprilisindir (180). Diğer yandan, neprilisin substratı olan bir peptit (beta amiloid), ADAM10 tarafından da parçalanmaktadır (181). Bu durum, ADAM10 ile neprilisinin başka ortak substratlarının olacağını ve ADAM10'un SP'yi parçalayabileceğini düşündürmektedir. ADAM10 ve neprilisin, SP'yi aynı noktalardan hidroliz etmektedir ve ADAM10'un da SP metabolizmasında çok önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. Ayrıca, ADAM10, kalsitonin geni ile ilişkili peptiti de hidrolize etmektedir.

Matriks metalloproteazlarının (MMP) ekstraselüler matriksin proteolitik yıkımıyla tümör invazyonu ve metastazları indüklediğine inanılmaktadır (182). ADAM'lar ve MMP'lar homolog katalitik motifleri paylaştığından, kanser progresyonunda ADAM'ların MMP'lara benzer şekilde bir rolü olduğu öne sürülmektedir.

Kapsaisin, vanilloid reseptörü de denilen, kapsaisin resptörü içeren küçük çaplı duysal nöronları aktive veya yok eder. Kapsaisine duyarlı bu nöronlar lokal doku homeostazı, inflamasyon, iyileşme ve büyümede özellikle psikolojik stres altında rol oynar. Stres henüz tanımlanmamış mekanizmalarla kanser rekürrensi ve metastazına katkı sağlar. Ayrıca kapsaisin sensitif nöronların patolojik koşullardaki aktivitesi (özellikle stres) metastaza yol açabilir. Bu nedenle duysal sinirlerin denervasyonunun meme kanseri tedavisi üzerine etkileri incelenmiştir (183). Kapsaisinle duysal sinirlerin inaktivasyonu, agresif tümör hücrelerinin daha fazla çoğalmasına neden olmaktadır.

SP von Euler ve Gaddum tarafından 1930'da keşfedilmiştir. Söz konusu bilim adamları at beyini ve barsağı ekstrelerinde hipotansif ve spasmogenik faktörün bulunduğunu tespit etmişlerdir. Sığır hipotalamusundan izolasyonu ve substans P olarak adının konması 1970-1971 yıllarında Leemans tarafından gerçekleştirilmiştir (184).

SP, taşıkinin ailesinin bir üyesi olup 11 aminoasitten oluşan bir nöropeptittir. Taşıkinin ailesinin diğer üyeleri nörokinin A ve nörokinin B'dir (185). Phe-x-Gly-Leu-Met-Nh₂ kısımları bu ailenin taşıdığı ortak karboksi terminalidir. Memelilerde taşıkinin ailesi 2 gen tarafından üretilir, bunlar protaşıkinin A ve protaşıkinin B'dir. SP Protaşıkinin-A geni tarafından üretilir (186).

SP etkisini 3 reseptör üzerinde gösterir. Bunlar NK-1, NK-2, NK-3'dür. Yüksek afinite ile NK-1 reseptörüne düşük afinite ile NK-2 ve NK-3 reseptörlerine bağlanır. NK-1 reseptörleri ince ve kalın barsakta, sinir hücreleri, düz kas hücreleri, immün sistem hücreleri, endotel ve epitel hücreleri gibi birçok hücrede lokalize olmuşlardır. NK-2 reseptörleri sirküler kaslarda ve muskularis mukozada yerleşmiş olup sirküler kas kasılması ile ilişkilidir. NK-3 reseptörleri baskın olarak gastrointestinal sistemde SP'nin bağlandığı myenterik ve submukozal sinir plexuslarında nöronlarda eksprese olur ve kas kasılmasını uyarır veya inhibe eder (187).

SP ve onun reseptörü Nörokinin-1 Reseptör (NK1R) onkogenezis ile ilişkili bir çok proseste; mitogeneze, anjiogeneze, hücre migrasyonu ve metastaz gibi, sorumlu bulunmuştur. SP mitogenezi MAPK yolağıyla NK-1 alttipi reseptörleri aktive ederek uyarır (176). İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişki klinisyenlerce SP merkezi modellerle açıklanmaya çalışılmıştır. NK1R antagonistlerinin antitümöral özellikleri olduğunu ve bu aileye ait insanlarda tek kabul edilen ilacın plaseboyla benzer yan etkileri olduğu düşünülmektedir.

Substans P sinir uçlarından ve nötrofiller, eosinofiller, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi immünregülasyonda rol alan hücrelerden salınmaktadır. Yapılan çalışmalarda havayollarında duyuşal sinirlerde tespit edilmiştir, NK-2 reseptörü ile bronkokonstriksiyon, NK-1 reseptörü ile mukozal bezlerde goblet hücreleri üzerine etkilidir ve pulmoner arterde relaksasyona yol açar. Astım hastalarının bronşlarında SP ve NK1R ekspresyonun arttığı saptanmıştır (188). Astım dışında KOAH, sarkoidoz, sigara içicilerinde ve non produktif öksürükte rol almaktadır. Substance P miktarının RA'lı hastaların sinoviyal sıvılarında arttığı tespit edilmiştir (189).

Substans P gastrointestinal sistemde düz kas kasılması, epitelyumda iyon transportu, vasküler permeabilite ve immün fonksiyonların düzenlenmesinde rol alır (165). Gastroözafajial reflü hastalığında özefagustaki asit SP salınımına yol açarak NK-1R üzerinden alt özefagial sfinkter kasılmasını inhibe eder (190). Taşıkininler

duodenal kontraksiyonu ve bikarbonat sekresyonunu uyarırlar (191). Ülseratif kolit, Chron hastalığı, c.difficile bağlı enterokolit, trişinella spiralis'e bağlı enterit ile ilgili çalışmalarda SP miktarı yüksek bulunmuştur. Bunların dışında kemoterapiye bağlı emeziste SP antagonistleri kullanılmaya başlanmıştır (186).

İnsan tümörlerinde SP ve onun reseptörü araştırılmış ve tümör hücrelerinde birçok normal hücre tipine kıyasla fazla sayıda NK1R saptanmıştır (192,193).

İnflamasyonun geliştiği, mitojenik sinyallerin güçlü kaynağı olan nöropeptitlerin yerleştiği alanlarda SP'nin rolü olduğu düşünülmektedir. 'Tüm solid tümörlerin proanjiojenik faktörler salıvererek anjiogeneze ulaştığı ön görülmektedir (194). NK1R ile SP stimülasyonunun, tümör hücrelerinin yeni kan damarları oluşturmaya çok sayıda farklı proanjiojenik fenotipi aktive etmek yerine alternatif ve daha kolay bir yol oluşturduğu düşünülmektedir (195). Ek olarak, tümöral kitlenin büyümesi, peritümöral infiltrasyon ve metastazın oluşumunun tümör hücrelerinde, tümöral ve peritümöral dokuda (inflatuar hücreler, fibroblastlar, kan damarları, sinirler, ganglionlar, adacıklar) SP/NK1 reseptör aşırı ekspresyonuyla düzenlenmektedir (171). Sonuçta, herhangi bir hücre genetik hasar bir veya birden fazla programlı hücre ölümü yollarını aktive eder. NK1R'in artmış ekspresyonu, tümör hücrelerinin potent bir mitotik sinyal olan SP uyarısına bağımlılığını artırır. Bu artmış mitojenik sinyal, farklı ölüm sinyal yollarıyla etkileşmekte ve her tümör hücresinde kendi genetik hasarına, onkogen aktivasyonuna uygun olarak bu yolları aktive etmektedir ve bunlar her tümör için kısmen genetik profilden bağımsızdır. SP bir inflamasyon mediatörüdür ve insan dokularında pikomolar konsantrasyonlarda bulunur, inflamasyon ve kanser arasında bağlantı teşkil eder. Kronik inflamasyon altında, sürekli bir SP salınımıyla tümör hücrelerinin NK1R'nü hücre membranlarına aldıklarını ve bu fenotiplerin doğal seleksiyonla daha agresif hale geldiği düşünülmektedir. Hem büyüme inhibisyonunun hem hücre ölümünün, NK1R antagonistleri kullanılarak incelendiğinde, NK1R lerinin SP ile stimülasyonu sonucu indüklenen 'yaşam' sinyallerinin kaybına sekonder olduğu düşünülmektedir. Reseptörün antagonistle blokajı sonrası bu sinyallerin yok olması hücre içindeki balansı apoptotik/ölüm sinyalleri lehine çevirmekte ve hücrenin ölümüyle sonlanmaktadır. SP ile oluşan mitotik stimulus sonrası her tümörde farklı mutasyonlar, onkogen aktivasyonu ve/veya süpresör gen kayıpları ve değişik sayıda ölüm sinyalleri oluşur. Böylece NK1R antagonistleri, SP ile indüklenen tek potent mitotik sinyalleri

keserek , hücreyi kendi ‘ölüm yükü’ ile başbaşa bırakarak , yaşam ve ölüm sinyalleri arasındaki dengenin yaşam tarafına kaymasına neden olur. Depresyon , kronik stres, inflamatuvar hastalıklar ve kanser arasındaki ilişkide SP patogenezinin rolünün bu yaygın medikal problemlerde değerlendirilmesiyle daha iyi aydınlatılacağı düşünülmektedir.

Mast hücrelerinde, SP selektif olarak TNF-alfa mRNA ve proteini indükler (196). SP ve NKA keratinositlerin, fibroblastların ve endotelial hücrelerin proliferasyonuna katkı sağladığı, böylece fibroblastların migrasyonunu in vitro, neovaskularizasyonu in vivo indüklediği rapor edilmiştir (197).

Kanser gelişimi ve progresyonunda SP’nin rolü iki yönlüdür. İntakt peptit ve hidroliz ürünleri oldukça farklı davranırlar. Son bulgular intakt peptitlerin tümör hücre migasyonunu indüklediğini göstermiştir(179). Aynı zamanda kanser hücresi büyümesini de uyarır (171). SP mitojeniktir ve SP ve reseptörlerinin artmış ekspresyonu (NK1-2, NK1R ve NK2R) meme kanseri hücre dizilerinde bulunmuştur. Nörokinin reseptörlerinin aktivasyonu kanser hücresi proliferasyonunu indükler(174). Ve NK1 reseptörlerini inhibe ederek tümör büyümesini inhibe eder . Benzer şekilde, anjiogenez kanser progresyonu için önemli bir komponenttir ve nörokinin reseptörlerinin aktivasyonu SP ile indüklenip anjiogenez tetikler(198). Diğer taraftan, bazı sentetik SP fragmanları klinik deneylerde kanser gelişimini inhibe edebilmektedir (199,200).

2.10. Vazoaktif İntestinal Peptit (VIP)

VIP, sekretin –glukagon ailesine ait 28 aminoasitten oluşan bir nöropeptittir. İlk olarak akciğer ve ince barsaktan izole edilmiştir. Daha sonra sinir sistemi ve endokrin sistemde nötransmitter ve nöromodülatör olarak görev aldığı ortaya konmuştur (201). Yapılan çalışmalarla immünmodülatör T hücreleri tarafından üretildiği ortaya konmuştur. Ayrıca VIP’in sinir uçlarının gastrointestinal sistem, solunum sistemi, pankreas, ürogenital sistemde yer aldığı belirlenmiştir (202).

Gastrointestinal sistemde düz kaslarda gevsemeye {alt özefagial sfinkter, mide, safra kesesinde} neden olur, kan akımını artırır, pankreas ve safra kesesinde sıvı sekresyonunu artırır, gastrik asit sekresyonunu ve intestinal lümeninden emilimini inhibe eder (203).

VIP üç reseptör üzerinden etkisini göstermektedir. Bunlar VPAC-1, VPAC-2 ve PAC-1'dir. VPAC1 ve VPAC2 resptörlerine yüksek afinite ile bağlanırken PAC1 reseptörüne düşük afinite ile bağlanır (201). Bu 3 reseptör de G protein bağlı resptörlerin grup 2 reseptör ailesine aittirler ve sekretin reseptör ailesi olarak bilinirler (204). VIP reseptör sinyal mekanizması G protein bağlı reseptör kinazlarla reseptör fosforilasyonunun terminasyonunu içerir. VPAC-1 reseptörü SSS'de özellikle serebral korteks ve hipokampusda yaygın olarak bulunmaktadır (205). Periferik olarak da karaciğer, akciğer, barsaklar ve T lenfositlerde izole edilmiştir (206). Selektif VPAC₁ receptor agonistleri ve antagonistleri açıklanmıştır (207). VPAC₂ receptorleri SSS'de talamus, suprakiazmatik nukleus, daha az miktarda da hipokampus, spinal kord ve dorsal kök ganglionlarında bulunmaktadır. Periferde kalp kasında, gastrointestinal ve üreme sisteminde bulunmaktadır (208).

PAC-1 reseptörleri en fazla SSS'de ve adrenal medullada tespit edilmişlerdir (209).

VIP, nitrik oksitle birlikte gastrointestinal sistemde non adrenerjik-nonkolinerjik sistemin en önemli komponentini oluşturur. VIP gastrointestinal sistemdeki düz kasların ritmik kasılmasında inhibitör rol oynar. Hirschprung hastalığı ve akalazya gibi özefajial gevşemedeki yetersizlik ve barsak dismotilitesi ile ilgili hastalıkların VIP inervasyonundaki bozukluktan kaynaklandığı düşünülmektedir (210).

VIP immünmodülatör özelliklere sahiptir. Th2 lenfositler tarafından üretilmektedir ve Th 2'nin immün cevabında rol almaktadır. İn vitro olarak Th-1 sitokinleri IFN-GAMA ve IL-2'yi inhibe eder. Makrofaj ve dendritik hücrelerde Th-2 sitokinleri olan IL-4, IL-5'i artırır. İn vivo olarak VIP alımı Th-2/Th-1 oranını artırır. Sonuç olarak VIP' in endojen antiinflamatuvar etkileri olduğundan bahsedilebilir (211).

VIP'in vasküler aktiviteleri için Gonzalez ve ark. farklı bir mekanizma ön görmüşlerdir (212). Perivasküler sinirler tarafından üretilen VIP'in nöronal NO sentaz ile aynı sinirlerden NO sentezini indükleyerek vazodilatasyona neden olduğunu öne sürmüşlerdir. VIP, cAMP'ye bağlı olarak keratinositlerin proliferasyonu ve migrasyonunu uyarmakta ve psoriasis gibi patofizyolojik deri durumlarında ve yara iyileşmesinde VIP'in fonksiyonları öne çıkmaktadır (213). VIP, iyileşen yara dokusundaki re-innervasyonda da rol oynamaktadır, transeksiyon sonrası sıçanlardaki siyatik sinir rejenerasyonu VIP tarafından sağlanmaktadır (214).

Ogasawara ve ark. Transwell hücre kültüründe Matrigel adlı bir bazal membran oluşturmuş ve burada kolon adenokarsinom hücrelerinin invazyonunda nöropeptitlerin (VIP, Substans P, Nöropeptit Y, Nörokinin A, Somatostatin, CGRP, Leucine-enkephalin L-ENK) etkisini incelemiştir. Tümör hücrelerinin invazyon potansiyelinde VIP, SP, NPY ve L-ENK konsantrasyonuna bağlı olarak azalma yaparken; SOM, CGRP ve NKA'nın bir etkisi olmadığı görülmüştür. Özellikle VIP'in tümör invazyonunun inhibisyonunda en etkili olduğu gösterilmiştir. VIP'e bağlı benzer bir etki de fibronektine hücre migrasyonunda gözlenmiştir. Araştırmanın sonuçları göstermiştir ki, kullanılan nöropeptitler arasında VIP; kolon adenokarsinom hücrelerinin invazyonunu, hücre içi cAMP'yi kullanan yolak ile ilişkili olarak tümör hücre motilitesinin parsiyel supresyonu ile inhibe edebilmektedir (215).

VIP'in karsinojenik potansiyeli Fernandez-Martinez ve ark. (2010) tarafından tümörsüz insan prostat epitel hücreleri ve in vivo xenograftlarda analiz edilmiştir. VIP'in indüklediği morfolojik değişiklikler ve migrasyona yol açan fenotip, metalloproteinazların (MMP-2 ve MMP-9) aktivasyonunun stimülasyonu, e-cadherinle oluşan hücre-hücre adezyonunda azalma ve hücre motilitesinde artmaya yol açar. VIP, siklin D1 ekspresyonunu ve hücre proliferasyonunu artırır. VIP tümörsüz prostat epitel hücrelerinde bir sitokin rolü oynar, hücrenin transformasyonu ile epitelial mezenkimal transizyon sağlanır, bu da VIP'in prostat tümör oluşumundaki rolünü göstermektedir.

Tablo 2.7. Epidermal, dermal ve immün hücrelerdeki nöropeptitler Scholzen ve ark. (1998).

<u>Nöropeptit</u>	<u>Hücre kaynağı</u>	<u>Hücresel cevap</u>
Substans P	Mast hücreleri, monositler Eosinofiller	T hücreleri : proliferasyonu artırır IL-2'yi artırır B hücreleri : diferansiyasyon Fibroblastlar/ keratinositler: proliferasyonu artırır Endotel hücreleri : adezyon molekül ekspresyonunu artırır Mast hücreleri: histamin salınımını artırır, TNF-alfa 'yı artırır Monositler ve astrositler : IL-1 / IL-6 IL-8'i artırır
VIP	Mast hücreleri , PMN	T hücreleri : proliferasyonu azaltır

2.11. CGRP {Calcitonin Gen Related Peptid}

CGRP, 37 aminoasitten oluşan nöropeptittir. Kalsitonin geninden CGRP mRNA ekspresyonu sonrası sinirlerden dokuya özgü olarak üretilir. (216). CGRP hem periferel hem de santral nöronlarda en fazla miktarda bulunan peptidlerden biridir (217). Genellikle SP'yi de içeren diğer peptitlerle birlikte C liflerinde lokalizedir. CGRP birçok biyolojik aktiviteyle ilişkilendirilmiştir. CGRP en kuvvetli vazodilatatör etkiye sahip peptittir ve ağrının iletilmesinde görev alır (218). CGRP etkisini G protein bağı reseptör olan CLR {kalsitonin reseptör benzeri reseptör} ve RAMP1 {reseptör aktivitesini modifiye eden protein} üzerinden gösterir (219). CGRP reseptörleri vücutta yaygın olarak bulunur ve bu peptit sistemlerde çeşitli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol alır {solunum, endokrin, GIS, immün, kardiovasküler sistem} (220).

CGRP'nin en belirgin etkisi in vivo ortamda küçük ve büyük damarlardaki vazodilatasyon aktivitesidir. CGRP ve VIP, keratinosit veya melanosit proliferasyonuna in vitro ortamda katkı sağlar (221). Benzer şekilde, CGRP endotel hücre proliferasyonuna katkı sağlamakta ve böylece iskemi, yara iyileşmesi ve inflamasyon gibi fizyolojik ve patofizyolojik olaylardaki anjiogenezde yer tutmaktadır.

CGRP immün hücre fonksiyonları üzerinde modölatör aktiviteler gösterir. Kültürdeki peritoneal fare makrofajlarında fagositoz alfa-CGRP ile sağlanmıştır . CGRP, IL-1 ve IL-8 gibi proinflamatuvar mediatörler tarafından indüklenen nötrofil akümüasyonu ve ödem formasyonunu potansiyalize eder ve nötrofiller ve monosit hücre dizisinin umbilikal ven endotel hücrelerinde adezyonunu stimüle eder. CGRP, çevre deri hücreleri üzerinde inflamatuvar etkileri olan TNF-alfa salınımının mast hücreleri tarafından yapılmasını indükler (222). CGRP, kutanöz makrofajların ve Langerhans hücrelerinin fonksiyonlarını bozar ve böylece akut ve gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonlarının potent bir inhibitörü olduğu düşünülmektedir.

ADAM10, CGRP'yi hidrolize eder ve çok sayıda spesifik ürün ortaya çıkarır. Şu an C7- V8 bölgesindeki hidrolize ait bir delil CGRP üretimi için gösterilememiştir. CGRP, potent bir Adrenomedullin reseptör antagonistidir (özellikle Tip2) ve insan prostat kanseri hücre dizisinde proliferasyonu azaltır ve apoptozisi artırır (223). CGRP ve onunla sıkı ilişkide olan kapsaisin gastrik mukozada da gösterilmiştir, ayrıca

trabeküler kemik yapısal bütünlüğü için önemlidir (224). Kemik metastazlarında ilişkili bulunmuştur.

Duysal sinirlerden salınan nöropeptitler biyolojik yanıtları oluşturdıkları hedef hücre yüzey reseptörlerine difüze olurlar. Hedef dokunun final cevabı nöropeptitleri ekstraselüler ortamdan çıkaran birçok mekanizma tarafından oluşturulur. Mast hücrelerinden salınan proteolitik enzimler, triptaz veya kimaz gibi, CGRP, PHI, VIP ve SP, NKA ve NKB gibi taşıyıcıları efektif olarak yıkabilirler (Tablo 2.8.).

Tablo 2.8. Derideki duysal nöronlardan elde edilen nöropeptitler Scholzen ve ark. (1998).

<u>Nöropeptit</u>	<u>Sinir</u>	<u>Ana Uyarı</u>	<u>Esas hedef doku / fonksiyon</u>
Substans P	duysal C-lifler / Aδ-lifler, serbest Sinir uçları, meissner Cisimciği, perivasküler Sinirler	tehlikeli uyarılar elektriksel uyarılar IL-1 NGF	mast hücreleri: histamin salınımını artırır TNF-alfa'yı artırır wheal and flare' reaksiyonu vazodilatasyonu artırır duysal nörotransmitter CHS reaksiyonu artırır keratinositlerde sitokin salınımını artırır endotel hücreleri : RAM artırır
CGRP	SP ile birlikte perivasküler Sinirlerin duysal C- lif / Aδ Lifleri Meissner cisimciği Ter bezleri	tehlikeli uyarılar elektriksel uyarı	Vazodilatasyonu artırır wheal and flare' reaksiyonu nötrofil akümülesyonunu artırır duysal nörotransmitterler Langerhans hücre fonksiyonlarını modüle eder endotel hücrelerinde IL-8 i artırır mast hücrelerinde histamin salınımını artırır endotel hücreleri, melanositler, keratinositlerde proliferasyonu artırır Langerhans hücrelerinde, makrofajlarda antijen prezentasyonunu azaltır Langerhans hücrelerinde IL-10'u artırır
VIP	derin dermal sinirler ter bezleri duysal sinirler Sempatik kolinerjik sinirler	c-AMP bağlı yollar	mast hücrelerinde histamin salınımını artırır wheal and flare' reaksiyonu nörotransmitter ter sekresyonunu artırır

2.12. Neutral Endopeptidaz

Neutral endopeptidaz (NEP, neprilisin, enkephalinaz, CD10) bir hücre yüzey enzimidir, nöropeptitlerin parçalanmasında ve etkilerinin sona ermesinde görevlidir. Memelilerde SSS'de enkefalinlerin metabolizmasında rol aldığı bilinmektedir (225). NEP birçok kanserde pivotal rol oynar. Yapılan çalışmalarda sigara içenlerde NEP'in azalmış regülasyonunun küçük hücreli akciğer kanseri ile ilişkili olabileceği saptanmıştır (226). Prostat kanserinde mitojenik peptitler tarafından tetiklenen androjen insensitif tümör progresyonuna NEP kaybı katkıda bulunur (227). NEP, androjen bağımsız prostat kanser hücrelerinde tümör süpresör etkiye sahiptir (228). Papandreou ve ark. NEP'in hormonla regüle androjen bağımlı prostat kanserinden androjen bağımsız prostat kanserine geçişte rol oynadığını öne sürmektedir (229). Androjen bağımlı prostat kanseri hücrelerinde görüldüğünde, NEP büyümeyi stimüle eden nöropeptitleri (ör: SP, bombesin, CGRP) inaktive eder. Androjen ablasyonu sonrası NEP ekspresyonu azalır ve nöropeptitler tümör hücrelerini uyarak, büyümeye ve androjenden bağımsız prostat kanser gelişimine yol açar. NEP ekspresyonu normalde membrana bağlı iken yüksek dereceli prostat kanserinde sitoplazmik dağılım paterni gösterir ve NEP ekspresyon kaybı yüksek proliferatif aktivite gösteren alanlarda izlenir (Albrecht ve ark. 2003).

Lösemilerde 'common acute lymphocytes leukemia antijen' {CALLA: CD10}'in eşdeğeri olduğu gösterilmiştir (230). Beyinde Alzheimer hastalığında biriken nörotoksik b-amyloid peptiti parçalandığı gösterilmiştir (231).

NEP SP'yi $\text{Gln}^6\text{-Phe}^7$, $\text{Phe}^7\text{-Phe}^8$ ve $\text{Gly}^9\text{-Leu}$ bölgelerinden hidroliz eder ve SP'nin biyolojik etkisi sona erer. NEP intestinal sistemde yaygın olarak bulunmaktadır. SP tarafından regüle edilen enterosit, endotel hücreleri, nöronlar ve monositlerde bulunur (232). Neprilisin en fazla böbrek ve akciğerde eksprese olmuştur. Analjezik ve antihipertansif amaçla geliştirilen bazı inhibitörler, neprilisinin enkefalinler, SP, endotelin, ANP gibi peptitlere yönelik aktivitesini engellemek amacı ile oluşturulmuşlardır (233).

Neprilisin, SP yi de içeren nöropeptit katabolizmasının temel enzimi olarak kabul edilir. NEP aynı zamanda fibroblastlar ve bronşiyal epitel hücreleri için potansiyel mitojenler olan bombesin benzeri peptitlerin hidroliziyle hücrel proliferasyonun kontrolünde görev alır.

SP'yi ADAM10 gibi hidroliz eden neprilisin ile kanser bağlantısı daha ayrıntılı çalışılmıştır. Renal hücreli kanser, invazif mesane kanseri, kötü diferansiye mide kanseri, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, endometrium kanseri ve prostat kanserini de içeren birçok malignitede NEP ekspresyonu azalması veya kaybı rapor edilmiştir (234,235). Azalmış NEP, daha yüksek peptit konsantrasyonlarının hücre yüzeyinde birikimine izin vererek peptitle sağlanan proliferasyonu ve neoplazinin gelişimi ve progresyonunu kolaylaştırır (236). Neprilisin düzeyindeki azalma akciğer kanserinde kötü prognozla ilişkilendirilmiş ve neprilisin düzeyi artırıldığında kanser gelişiminin yavaşladığı gösterilmiştir (237). Bu sonuçlar, peptidaz özelliği bulunan proteazların tümör supresör etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Prostat kanserinde, NEP proteini androjen duyarlı LNCaP hücrelerinde eksprese edilir fakat androjen bağımsız prostat kanser hücre dizilerinde eksprese edilmez. Bundan öte, NEP ekspresyonu LNCaP hücrelerindeki androjen ile transkripsiyonel olarak aktive olur ve androjen geri çekilmesi ile azalır .

Androjen geri çekilmesi ile çoğalmaya devam eden prostat kanser hücrelerinin azalmış NEP seviyeleri ile ilişkisi olduğunu düşünülmektedir. NEP ekspresyonundaki azalma, hücre proliferasyonunu stimüle eden prostat kanser hücrelerinin alternatif androjen kaynağı olarak nöropeptitleri kullanmasına izin vererek tümör büyümesiyle sonuçlanır. Hücre yüzeyindeki NEP aşırı ekspresyonunun prostat kanser hücresi büyümesini G1 hücre siklusu arrestine yol açarak inhibe ettiğini ve prostat hücresinde tümör oluşumunu ortotopik prostat kanser modelinde inhibe ettiği rapor edilmiştir.

NEP/CD10 ve APN/CD13 tip 2 integral membran proteinleri olarak sınıflandırılmış hücre yüzey proteinlerinin çinko bağlayan metallopeptidazlarıdır. CD10 cDNA dizisi böbrek fırçamsı kenarında NEPcDNA ile aynı olup monomer olarak 750 aminoasitten ibarettir. NEP CD10 ve APN/CD13 granulositlerde , bronşial epitel hücreleri, fibroblastlar, renal proksimal tübül epitel hücreleri ve ince barsak epitel hücrelerinde eksprese olurlar. NEP/CD10 lenfoid öncülerde eksprese olurken APN/CD13 myeloid öncü hücrelerde eksprese olur. Her iki metallopeptidaz peptit hormonlarının hücresel cevabını azaltır. NEP/CD10 fetal akciğer gelişimini regüle eder ve akciğer kanseri proliferasyonunda etkilidir. NEP/CD10 ile PCNA (prolifere olan hücresel nükleer antijen) arasında ters ilişki rapor edilmiştir ve proliferen olan hücrelerde daha düşük hücre yüzey NEP/CD10 seviyeleri eksprese edilmiştir (238).

Nötral endopeptidaz ve aminopeptidaz N gen ekspresyonları küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (KHDAK) prognozun anlamlı belirteçleridir (Tokuhara ve ark. 2001). NEP/CD10 pozitif tümörü olan hastalar negatif olan hastalara göre anlamlı oranda yüksek 5 yıllık sürviye sahip bulunmuştur (%79,3 vs %53,3 p=0,022).

Son zamanlarda birçok hematopoetik olmayan malignitelerde, özellikle genitoüriner traktın neoplazmlarında; renal hücreli karsinom, transizyonel hücreli karsinom ve prostat adenokarsinomları, CD10 immunreaktivitesi saptanmıştır (239). RHK'da CD10 ekspresyonu için diğerlerine göre erken sonuçlar elde edilmiştir (240). Ayrıca son zamanlarda yapılmış çalışmalarda CD10'un RHK alt tiplerinin ayırıcı tanısında kullanılabileceği gösterilmiştir (241). Langner ve ark. (2004) yaptığı çalışma renal malignitelerde CD10 immunreaktivitesini analiz eden en geniş çalışmadır. Tümör derecesi arttıkça CD10 ekspresyonunda aşırı pozitiflik anlamlı olarak düştüyse de TNM evrelemesiyle herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Kötü diferansiye tümörlerde immunreaktivitede azalma, tümör progresyonu esnasında diferansiyasyonla ilişkili belirteçlerin kaybıyla açıklanabilir. Bu sonuçlar Sato ve ark.'larının gastrointestinal adenokarsinomlarda elde ettiği sonuçlarla paralellik göstermektedir. Sato ve ark. (1996) kötü diferansiye gastrik ve kolorektal kanserleri iyi ve orta diferansiye olanlarla karşılaştırmış ve bunlarda CD 10 ekspresyon kaybı saptamıştır. Metastatik RHK dokusunda sık görülen aşırı immunreaktivite, CD10 immunboyamasının primeri bilinmeyen metastazlarda kanser türlerinin ayırıcı tanısında araç olarak kullanılabileceğini göstermekte, diğer birçok kanser türünde immun reaktivite kaybı olduğunu veya sadece fokal CD10 ekspresyonu gösterdiğini söylemektedir.

Standart hemotoksilen ve eosin kesitlerinde RHK histolojik alt tiplendirmesi zor olabilir. Kritik vakalarda konvansiyonel ve kromofob RHK'ların ayırıcı tanısında, vimentin immunboyamasının kromofob alt tipte yokluğu ve Hale'nin demir boyasıyla retiküler sitoplazmik pozitiflik göstermesi önemlidir. Konvansiyonel tipte CD10 baskın olarak membranda boyanırken, kromofob tipte membran immunreaktivitesi yoktur. Ancak patologlar her ikinci kromofob RHK'in diffüz sitoplazmik CD10 immunreaktivitesi gösterdiğini bilmelidir. Çünkü Bir çok vakada tümör hücrelerinin çok az bir kısmı reaktiftir. Tip 1 ve Tip 2 papiller RHK'lerde farklı ekspresyon paternleri iki farklı tümör tipinin biyolojik ve prognostik ayırımına olanak sağlar.

Transizyonel hücreli kanserler, RHK'lerle kıyaslandığında CD10 ekspresyonuna daha az rastlanır. Enteresan olan, yüksek evre ve yüksek dereceli tümörlerde immunreaktivitenin daha fazla görülmesidir (242).

2.13. ADAM-10

ADAM-10 'A Disintegrin And Metalloprotease' ekstraselüler metalloproteaz ailesine ait transmembran proteindir (243). ADAM-10 sinyal iletiminde Notch ve Eph/ Ephrin yollarında rol oynar. Bugüne kadar 30'dan fazla ADAM proteini tanımlanmıştır. Yapısal olarak ADAM proteinleri prometalloproteaz, disintegrin, EGF benzeri ve sitoplazmik parçaları kapsar (244). ADAM proteinlerinin en iyi tanımlanan üyelerinden biri ADAM-17'dir. TNF-alfa konverting enzim olarak da bilinir ve domainlerin parçalanmasında önemli yer tutar (245). Membran bağımlı pro TNF-alfayı solubl TNF-alfaya çevirir. ADAM-17 diğer membran bağlı proteinlerin 'IL1 reseptör II TNF reseptör I, TNFR II, TGF-alfa, CD30 ve HER4/erbB4' parçalanmasında da rol alır (246).

ADAM10 ADAM17 ile ilişkilidir. Pro TNF-alfayı parçalar. Myelin basic protein ve kollajen tip 4 diğer substratlarıdır. Erin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SP'yi hidroliz ettiği gösterilmiştir (247). ADAM10 ve 17 dışında ADAM ailesinin birçok subüniti tanımlanmıştır. Fonksiyonel olarak ADAM ailesi inflamatuvar ve patolojik durumlarda anahtar rol oynar (248). Ek olarak hücre adezyon ve migrasyonunu düzenleyerek hücre-hücre ve hücre matriks adezyonunu kolaylaştırır, bu nedenle tümör gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (249).

ADAM10'un kanser gelişimindeki rolü çok iyi bilinmemektedir. Diferansiyasyonu indüklediği ve aksonal gelişimi sınırladığı Drosophila'da gösterilmiştir(250). Bu özelliği tümör gelişiminin engellenmesinde de önemli olabilir. ADAM 10 un epitel diferansiyasyonun kontrolünde, büyüme kontrolünde, benzer rollere sahip olduğu ve bu ADAM 10'un bu fonksiyonlarının SP'nin hidroliziyle sağlandığı düşünülmektedir. ADAM 10'un diferansiyasyon üzerindeki etkisinde SP hidrolizinin olası yeri araştırılmaya değer görülmektedir.

ADAM10 hücre membranına lokalize olmuştur ve proteinin anormal lokalizasyonu onun peptidaz aktivitesini engellemekte ve antitümöral aktivitesini bozmaktadır. Prostat kanserinde, ADAM10'un membran lokalizasyonu kaybolmakta

ve proteinin nükleer lokalizasyonu saptanmaktadır. Bir çok membran proteinin nükleer lokalizasyonu malign transformasyonla ilişkilidir. MMP inhibitörlerinin klinik deneylerde antikanser aktivitesi gösterilememiştir (2003). Bununla beraber, MMP lar karaciğer metastazını indükler. SP hidrolizinde ADAM10 ile benzer bölgelere sahip olan bir enzim olan neprilisin kaybı da, akciğer karsinomunda kötü prognozla ilişkilidir. Ancak neprilisin aşırı ekspresyonu akciğer kanseri gelişimini azaltır. Dipeptidil peptidaz IV (DPPIV), membranla ilişkili bir peptidaz olup SP ve diğer nöropeptitlerin yıkımına da katılır. Melanomlar ve karsinomlar dahil malign hücrelerde genelde DPPIV'un hücre yüzey ekspresyonu kaybolmuştur ve DPPIV azalmış regülasyonu melanoma progresyonu için önemli bir ön olaydır. Bundan öte, prostat kanserinde DPPIV ayrıca beta FGF sinyali veren yolları bloke eder. Tüm bu bulgular, özellikle nöropeptit hidroliziyle ilişkili hücre yüzey proteazları, tümör indükleyici olmaktan çok tüm süpresör gibi davradıklarını düşündürmektedir (251).

2.14. ADAM-9

ADAM9 (MDC 9, Meltrin gamma) 'A Disintegrin And Metalloprotease' ailesi üyesidir. Fonksiyonel olarak ADAM lar spermatogenez, hücre adezyonu, myo ve nörogenez, inflamasyon, hücre migrasyonu ve doku yeniden yapılandırılmasında rol oynar. ADAM'lar hücre yüzey glikoproteini olup proteaz ve adezyon kısımları vardır. Hücre yüzey ve ekstraselüler matriks proteinleriyle etkileşimi tümör progresyonu, invazyon ve metastazında önemlidir. RHK'da bazı ADAM'ların transkripsiyon seviyesinde artmış regülasyonu gösterilmiştir. Örneğin ADAM8, kısalmış survi ve uzak metastazla ilişkilidir.

ADAM9, heparin bağlayan EGFR benzeri büyüme faktörünün membrana tutunan dış kısmında yer alır ve muhtemelen bağlayıcı protein Eve-1 ile regüle edilir. EGFR aktivitesinin sağlanmasındaki etkisi ADAM9'un karsinogenez ve tümör progresyonundaki yeri açısından önemlidir. Ayrıca e-cadherin ve bazı integrin tiplerini modifiye veya regüle ederek kanser hücresi invazyonunu kolaylaştırır. RHK'da ADAM-9 mRNA'nın artmış regülasyonu olduğu, ADAM9 protein ekspresyonun genel survi için prognostik değer taşıdığı gözlenmiştir. ADAM9 ekspresyonu kanserli doku örneklerinde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. ADAM9'un genel olarak sitoplazmik immünreaktivitesi distal tübülden ziyade

proksimal tübülde nonkanseroz tubuler epitelin luminal bölgesinde izlenmiş olup, daha zayıf ve daha diffüz boyanma paterni göstermiştir. Glomerül ve stromal hücreler negatiftir. RHK'nın tüm alt tiplerinde sitoplazmik ve membranöz boyanma görülür. Papiller tipte en güçlü sitoplazmik immünreaksiyon mevcuttur.

ADAM9 protein ekspresyonunun tümör derecesi, hasta yaşı ve pozitif cerrahi sınır ile korele olduğu görülmüştür. ADAM9 ekspresyonuyla metastaz, nodal tutulum ile anlamsız ilişki saptanırken rezidü tümör ile sınırda bir anlamlılık izlenmiştir. Papiller ve kromofob tiplerinde yüksek ADAM9 ekspresyonu, pozitif lenf nodu tutulumu, uzak metastaz ve tümör derecesi daha ilişkili bulunmuştur. Yüksek ADAM9 ekspresyonu renal kanserde kısalmış survi ile anlamlı olarak ilişkilidir.

ADAM9 birçok solid tümörün progresyonunda yer tutar ancak renal hücreli karsinomdaki rolüne ait çok az şey bilinmektedir. Fritzsche ve ark. yaptığı bir çalışmada renal hücreli kanserde ADAM9'un protein ve transkript seviyesinde ekspresyonu klinikopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Kanserli doku ile komşu normal doku mRNA seviyesinde karşılaştırıldığında ADAM9'un anlamlı olarak kanserli dokuda artmış regülasyonu olduğu görülmüştür. Protein seviyesinde ADAM9 daha yüksek tümör derecesi, pozitif nodal tutulum, uzak metastazla anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur. Bundan başka ADAM9 protein ekspresyonu tek değişkenli analizde kısalmış hasta survisi ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur (252).

2.15. ADAM- 17

ADAM'lar adezyon ve proteaz aktivitelere sahip hücre yüzey proteinleridir ve bunlar bir çok biyolojik proseste önemli rol oynar. Fakat ADAM'ların kanserdeki rolleri az bilinmektedir. Schwettmann ve ark. (2004) RHK nedeniyle nefrektomi yapılmış hastalarda kanserli ve kanserli olmayan eşleştirmiş dokularda ADAM8, 17, 19, 28, ADAM TS1, ADAM TS2 mRNA ekspresyonlarını incelemiştir. Real time PCR ile yapılan ölçümlerde kanserli dokuda ADAM8, 17 ve 19 anlamlı ölçüde yüksek çıkmıştır. ADAM8 ekspresyonu uzak metastazın en iyi prediktörüdür ve kısa survi ile ilişkilidir. Bu sonuçlar ADAM'ların aşırı ekspresyonlarının RHK da prediktif bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (253).

ADAM17, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) ligandlarının aktif formlarının oluşması için gereklidir ve epitelyal dokuların gelişimi için onun bu fonksiyonu şarttır.

Tablo 2.9. ADAM’lar ve insan dokularında major ekspresyon alanları (DR Edwards ve ark / Molecular Aspects of Medicine (2008).

<u>Gen</u>	<u>İnsan dokularında ekspresyon alanları</u>
ADAM 2	Testis
ADAM 7	Testis, eritrositler
ADAM 8	Kemik iliği, lenfoid/myeloid hücreler, lenfatik sistem, hematopoetik kök hücreler, Periferik kan lenfoid ve myeloid hücreler
ADAM 9	Mezenkimal kök hücreler, plasenta, pankreas, erişkin kök hücreler, Adipoz doku
ADAM 10	Mezenkimal kök hücreler, plasenta, kan myeloid hücreler, mesane, Kemik iliği myeloid hücreler
ADAM 11	Eritrositler, santral ve periferik sinir sistemleri, karaciğer ve biliyer sistem, Tükürük bezleri
ADAM 12	Plasenta, mezenkimal kök hücreler, erişkin kök hücreler
ADAM 15	Yaygın (en fazla mezenkimal kök hücreler ve ürogenital sistem)
ADAM 17	Yaygın (en fazla lenfatiklerde)
ADAM 18	Testis, eritrositler, kemik iliği, pankreas
ADAM 19	Yaygın (en fazla plasenta, mezenkimal kök hücreler, lenfatik sistem, kalp)
ADAM 20	Testis, eritrositler, kemik iliği
ADAM 21	Testis, eritrositler, santral ve periferik sinir sistemi
ADAM 22	Periferik ve santral sinir sistemi
ADAM 23	Periferik ve santral sinir sistemi, kalp
ADAM 28	Hematopoetik kök hücreler, pankreas, gastrointestinal sistem, kemik iliği, myeloid hücreler, lenfatik sistem, solunum sistemi, mesane
ADAM 29	Testis
ADAM 30	Testis
ADAM 32	Kan lenfoid hücreler
ADAM 33	Uterus, diğer ürogenital sistem, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, dil, endokrin sistem
ADAM-benzeri decysin1	Lenfatik sistem, mesane, gastrointestinal sistem

Tablo 2.10. ADAM'ların insan hastalıklarıyla ilişkisi [D.R. Edwards ve ark./Molecular Aspects of Medicine (2008)].

ADAM	İlişkili Patoloji	Gözlem	Referans
ADAM 8	Kanser	Pankreatik kanserde aşırı ekspresyon azalmış hasta survisi, gliomlarda upregulasyon ve lokal invazyonla ilişki	Valkovskaya ve ark. (2007) Wildeboer ve ark. (2006)
	Romatoid artrit	Eklem inflamasyonu sinovial sıvıda ADAM8 seviyesi artışı	Gomez-Gavero ve ark. (2007)
ADAM 9	Kanser	Meme kanserinde upregüle Kolon kanser hücrelerinin invazyonunu öncüler, integrinlere bağlanır Prostat, meme ve barsak kanserlerinde upregule olur KHD akciğer kanseri beyin metastazında aşırı ekspresyonu mevcuttur Pankreatik duktal adenokarsinomda sitoplazmik ADAM9 aşırı ekspresyonu kötü prognozla ilişkilidir	O'Shea ve ark. (2003) Mazzocca ve ark. (2005) Peduto ve ark. (2005) Shintani ve ark. (2004) Grutzman ve ark. (2004)
ADAM 10	İnflamasyon	VE-cadherin yıkımı ve artmış permeabilite	Schultz ve ark. (2008)
	Kanser	Prostat kanserinde upregüle olur Nükleer lokalizasyon Gleason skoruyla ilişkilidir-prostat kanserinde Lenfoma hücrelerinde CD30 dökülmesi antikor bazlı immunterapiyi başarısız kılar	McCulloch ve ark. (2000) Arima ve ark. (2007) Eichenauer ve ark. (2007)
	Yaşlanma	Anti-ageing Klotho protein dökülmesi	Chen ve ark. (2007)
	Allerjik yanıtlar	Çözünen CD23 Ig E üretimini öncüler	Weskamp ve ark. (2006)
	Alzheimer Hastalığı	Alzheimer hastalarının beyinlerinde nöronlarda azalmış immunboyanma	Bernstein ve ark. (2003)
ADAM 17	Kanser	Meme kanserinde protein seviyesinde aşırı ekspresyon ve pro TGF alfa aktivasyonu için gereklidir Meme kanserinde artmış protein ekspresyonu Meme kanserinde aşırı ekspresyon tümör progresyonu ve metastazla ilişkilidir Meme kanserinde TGF alfa ile korelasyon Meme kanserinde kötü prognoz prediktörü	Borrel Pages ve ark. (2003) Santiago-Josefat ve ark (2007) McGowan ve ark. (2008) Kenny ve Bissell (2007) Mcgowan ve ark. (2008)
	Romatoid artrit	Sinovial hücrelerde upregulasyon, HIF 1 ekspresyonuyla ilişkilidir	Charbonneau ve ark. (2007)
	Multipl skleroz	Damarlarda, makrofajlarda ve astrositlerde aktif lezyonlarda artmış ekspresyon	Plumb ve ark. (2006)
	Diabet	Diabetik hastalarda LDL ye yanıt olarak monositlerde artmış ekspresyon	Worley ve ark. (2007)

3. MATERİYAL ve METOD

- **Hasta grubu:** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Kliniği'nde Temmuz 2007 ile Aralık 2010 arasında renal hücreli kanser nedeniyle radikal nefrektomi uygulanmış toplam 60 hasta çalışmaya alındı. Kontrol grubu olarak taşlı nonfonksiyone böbrek nedeniyle basit nefrektomi uygulanan 10 hastadan alınan dokularda da aynı çalışma yapıldı.
- Çalışma 14.01.2009 tarihinde alınan B.30.2.AKD.0.01.00.00 sayı no'lu Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Kararı ile onaylandı.
- Araştırmaya alınma kriterleri:

Klinik olarak böbrek adenokanser tanısı konmuş, bilgisayarlı tomografide solid kitlesi olan olgular çalışmaya alındı.
- Araştırmadan çıkarılma kriterleri:

Hastalar tümöre yönelik herhangi bir tedavi (radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi, immunoterapi, cerrahi girişim) almışsa çalışmadan çıkarıldı.

Çalışmada nefrektomi sonrası taze tümör dokusu ve normal böbrek dokusundan alınan örnekler sıvı nitrojen içine dondurularak -80°C'de saklandı. Enzim ve peptit düzey tayini için daha önce kullanılan iki basamaklı asetik asit ekstraksiyon yöntemi kullanıldı (Erin N, Reg peptides 2009). Bu metod nöron ve nöron dışı SP düzeyini kısmen belirleyebilmektedir. SP, EIA kiti (Cayman Marka, Katolog no: 583751) kullanılarak, VIP düzeyi, Bachem Marka Katolog no: S-1183 kiti kullanılarak ve CGRP düzeyi Phoenix Pharmaceuticals Marka Katolog no: EK-015-02 kiti kullanılarak ölçüldü.
- Enzim aktivitesinin tayini için dokular önce %1 deterjan eklenmiş (Triton-X) Anaspec Alpha secretaz assay solüsyonunda sonikatör kullanarak buz içinde homojenize edildi ve 2 saat buzda bekletildi. Çöktürüldükten sonra süpernatantları alınarak enzim aktivitesi ölçümleri kit protokolü kullanılarak yapıldı (Anaspec SensoLyte alpha-secretase activity kit Katolog no: 72085). CD10 aktivitesi için Dansyl-D-Ala-Gly-p-nitro-Phe-Gly, florojenik substrat kullanıldı ve daha önce anlatıldığı gibi yapıldı (254).

- Ayrıca enzimlerin ve peptitlerin hücre düzeyinde lokalizasyonunu belirlemek için parafine alınan dokularda Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında immunohistokimya ile boyama yapıldı. Kullanılan antikorlar: CD10, ADAM 9 ,ADAM10 ve ADAM17 idi. Toplam 60 vakadan tümör örnekleri incelenmiştir. Her vakadan 3 blok (tümörlü alan, tümör-kenar kavşağı ve 2 cm uzaklığındaki normal görünümlü böbrek dokusu) incelenmiş ve immunreaktivite skalası ile sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Tablo 3.1. Hasta ad-soyadı, yaşı, cinsiyeti, operasyon türü, ek hastalıklar, tümör boyutu, tümör tipi, Fuhrmann nükleer derecesi, TNM sınıflaması.

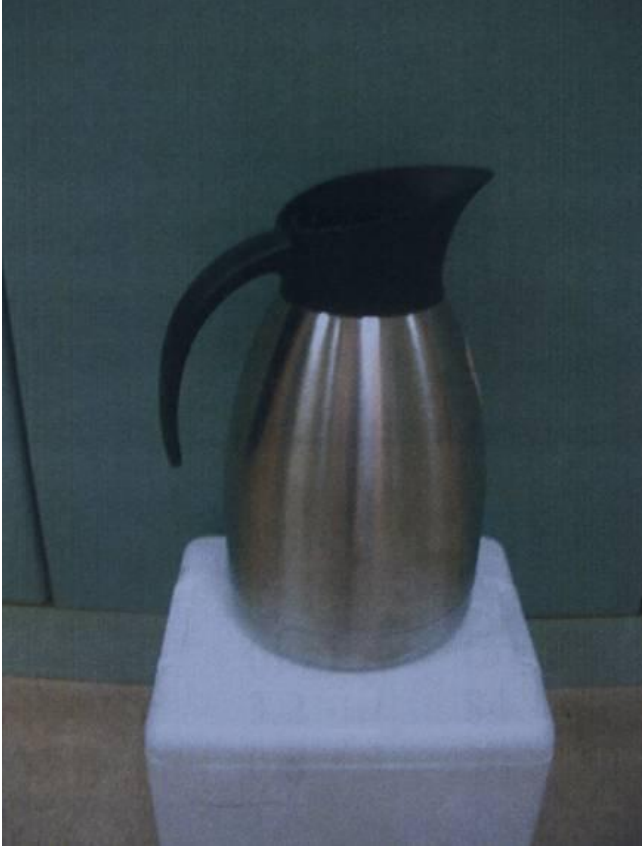
Ad-Soyad	Yaş-cinsiyet	Operasyon	Ek Hastalıklar	Tm boyutu	Tm tipi	FND	TNM
Ş S	47e	Sol rad. Nefrektomi	Yok	5,5x 5,5x 6 cm	Berrak hücreli	3	T3aN0M0
İ E	81k	lap.sol rad. Nefrektomi	HT + KAH	8 x7x 6 cm	granüler	3	T2N2M0
A K	48k	Sağ rad. Nefrektomi	DM + HT+ HPL+	4x3x3 cm	Kromofob	2	T1N0M0
H A	68e	Sağ rad. Nefrektomi	DM + HT + KAH+ HİPERTİROİDİ	7x6x6 cm	Berrak hücreli	2	T1N0M0
M Y	56k	Sağ rad. Nefrektomi	HT	8x8x7 cm	Papiller	2	T2N0M0
T E	39e	Lap. Sağ rad. Nefrektomi	Yok	3x2x2 cm	Berrak hücreli	2	T1N0M0
C B	62e	Sol rad. Nefrektomi	BPH	8x5x5 cm	berrak hücreli	2	T2N0M0
İ G	67e	Sağ rad. Nefrektomi	DM	8x5,5x4 cm	berrak hücreli	2	T2N0M0
E S K	58e	Sağ rad. Nefrektomi	Yok	20x13x13 cm	berrak hücreli	3	T2N0M1
O A	61e	Sağ rad. nefrektomi	HT	4,5x4x3 cm	berrak hücreli	3	T1N0M0
A A	42e	Sağ rad. Nefrektomi	DM	13x10x10 cm	berrak hücreli	3	T2N1M0
M R	36k	Sağ rad. Nefrektomi	Yok	7x6x6,5 cm	berrak hücreli	2	T1N0M0
G K	52e	Sağ lap. Rad. Nefrektomi	KAH	2,5x2,5 cm	berrak hücreli	3	T1N0M0
İ K	54k	Sağ rad. Nefrektomi	Yok	3,5x3,5x3 cm	berrak hücreli	2	T1N0M0
Y E	65e	Sağ lap. Rad. Nefrektomi	KOAH	3,6 cm	sarkomatoid diferans.	3	T1N0M1
F Ö	55k	Sağ rad. Nefrektomi	Yok	13,6 cm	Kromofob	2	T3aN0M0
R A	58e	Sağ lap. Rad. Nefrektomi	DM	3,4x3x3 cm	Papiller	2	T1N0M0

Tablo 3.1. (Devam)							
A G	70e	Sağ rad. nefrektomi	HT	7x6x5,5 cm	Papiller	2	T1N0M0
G T	55e	Sol rad. Nefrektomi	Demir eksikliği anemisi	8x7,5x6,5 cm	sarkomatoid ve papiller	3	T3aN0M0
M E	63e	Sol rad. Nefrektomi	Yok	6,5x6x5 cm	papiller ve berrak hücreli	3	T3aN0M0
S A	58e	sol lap. Rad.nefrektomi	Yok	5,5cm	berrak hücreli	3	T3aN0M1
E K	63e	Sağ lap. Rad. Nefrektomi	Yok	4,7x4x4 cm	Papiller	2	T1N0M0
İ H	60e	sol lap. Rad.nefrektomi	Yok	2x2x1cm	berrak hücreli ve papiller	2	T1N0M0
F A D	50 k	Sağ rad. Nefrektomi	Yok	6,5x5cm	berrak hücreli	2	T3aN0M0
M B	78e	Sol rad. Nefrektomi	Yok	5x4 cm	Kromofob	2	T1N0M0
M Ç	40e	Sol rad. Nefrektomi	Yok	9x6,5x5,5 cm	berrak hücreli	3	T2N0M0
F Ö	59k	Sağ rad. Nefrektomi	Yok	7,7x4,3x4 cm	berrak hücreli	3	T3aN0M0
M K	57e	Sol rad. Nefrektomi	KAH + DM	3 cm	berrak hücreli	2	T1N0M0
F Ş	47e	Sol rad. Nefrektomi	Yok	11 cm	Papiller	3	T3aN0M1
B B	62e	Sol rad. Nefrektomi	KAH	5x4,5 cm	berrak hücreli	2	T1N0M0
O A Ç	57e	Sol rad. Nefrektomi	KOAH + BPH	5 cm	berrak hücreli	2	T1N0M0
E Z	63k	Sol rad. Nefrektomi	HT+ MENENGEİOM +	3,8 x 3,5 cm	berrak hücreli	2	T1N0M0
N T	60e	Sol rad. Nefrektomi	DM	8,5 x 8 cm	berrak hücreli	3	T2N1M0
K Y	63e	Sol rad. Nefrektomi	Yok	12x8,5 cm	berrak hücreli	3	T2N0M0
İ B	75e	Sol rad. Nefrektomi	Yok	9x7x8 cm	berrak hücreli	3	T3aN0M0
H D	54e	Sol rad. Nefrektomi	Yok	4x3x3 cm	sarkomatoid diferans.	3	T3aN0M1
Ş P	75e	Sol rad. Nefrektomi	HT	5,5x5x4 cm	Kromofob	3	T1N0M0
A A	55e	sol Lap. El yardımlı Rad.Nefrektomi	Yok	6x5x3 cm	berrak hücreli	3	T1N0M0
A E	68e	Sol Lap. El yardımlı Rad.Nefrektomi	BPH	10x5x4 cm	berrak hücreli	2	T3aN0M0
A Ö	55k	Sağ rad. Nefrektomi	Yok	9,5x7,5x7 cm	Papiller	2	T2N0M0
Ş Ş	41 k	Sol rad. Nefrektomi	Yok	7,4x6,5x6 cm	berrak hücreli	2	T2N0M0
H Ç	44k	Sağ rad. Nefrektomi	HT	5,8x4,2x4 cm	berrak hücreli	2	T1N0M0

Tablo 3.1. (Devam)							
D A	40k	Sağ rad. Nefrektomi+KC rez.	Yok	11x7x6 cm	Bellinin'nin toplayıcı duktusları karsinomu	4	T3aN0M1
H Ç	51e	Sol rad. nefrektomi	Yok	3,5x3x2,5 cm	Papiller	2	T1N0M0
C Ş	43 k	Sağ rad. nefrektomi	Yok	6x5,3x4 cm	Kromofob	3	T1N0M0
H F S	78e	Sağ radikal nefrektomi	OPERE LARENKS CA+ HT+	36 cm	Papiller	4	T3bN1M1
İ Y	79e	Sol rad. Nefrektomi	SVO	11,5x7x6,5 cm	Berrak hücreli	3	T2N0M0
O Y	45k	Sol rad. Nefrektomi	HT	6,5x6,5x5,8 cm	Berrak hücreli	2	T1N0M0
Y E	54 e	Lap Rad.Sağ nefrektomi	Yok	7,5x7x6,5 cm	Berrak hücreli	3	T2N0M0
H G	69 k	sol lap. Rad.nefrektomi	KOAH + HT + DM	4x4x3 cm	Multiloküler kistik berrak hücreli	3	T1N0M0
K G	48 k	Sol rad. Nefrektomi	Yok	10x9x8 cm	Kromofob	2	T2N0M0
H Y	37 e	Sol rad. Nefrektomi	Yok	2,5x3x2 cm	Papiller	2	T1N0M0
S C	61 k	Sağ rad. Nefrektomi	DM, HPL	13x10x7 cm	Papiller	4	T2N0M1
S Y G	72 k	Sağ Rad. Nefrektomi	Astım ,HT	7x5x5,5 cm	Berrak hücreli	2	T3aN0M0
O A	63 e	Sol rad. Nefrektomi	HT	4x3,5x2,8 cm	Berrak hücreli	3	T1N0M0
Ş Ö	77 k	Sağ Rad. Nefrektomi	HT, DM	7,5x5,5x5 cm	Berrak hücreli	2	T2N0M1
N K	47 e	Sol rad. Nefrektomi	DM	5,5x4x3 cm	Papiller	3	T3aN0M0
A A	77 e	Sağ Rad. Nefrektomi	HT , KKY ,DM	7x6x3 cm	Berrak hücreli	2	T1N0M0
İ K	65 e	Sol Rad. Nefrektomi	Yok	4x4 cm	Kromofob	2	T1N0M0
N D	48 e	Sağ Rad. Nefrektomi	Astım	9,5x8,5x8cm	Kromofob	2	T2aN0M0
FND= Fuhrmann Nükleer derecesi, TNM=Tümör Lenf Nodu Metastaz, DM= Diabetes mellitus, HT= Hipertansiyon, HPL= Hiperlipidemi, KAH= Koroner arter hastalığı , KKY= Kompanse kalp yetmezliği, KOAH= Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı , SVO= Serebrovasküler Olay, BPH= Benign prostat hiperplazisi, CA=kanser , KC=karaciğer, e=erkek, k=kadın							

Kontrol grubu olarak taşlı nonfonksiyone böbrek basit nefrektomi uygulanan 10 hastadan alınan dokularda da aynı çalışma yapıldı.

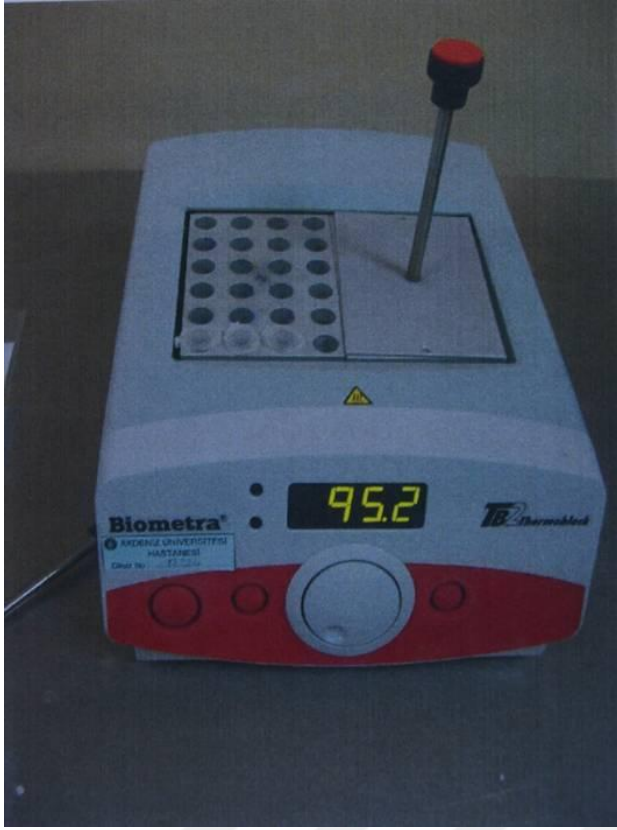
3.2. Örneklerin Alınması, Saklanması ve Ölçümlerin Yapılması Sırasında Kullanılan Cihazlar



Şekil 3.1. Sıvı nitrojeni taşımakta kullandığımız termos.



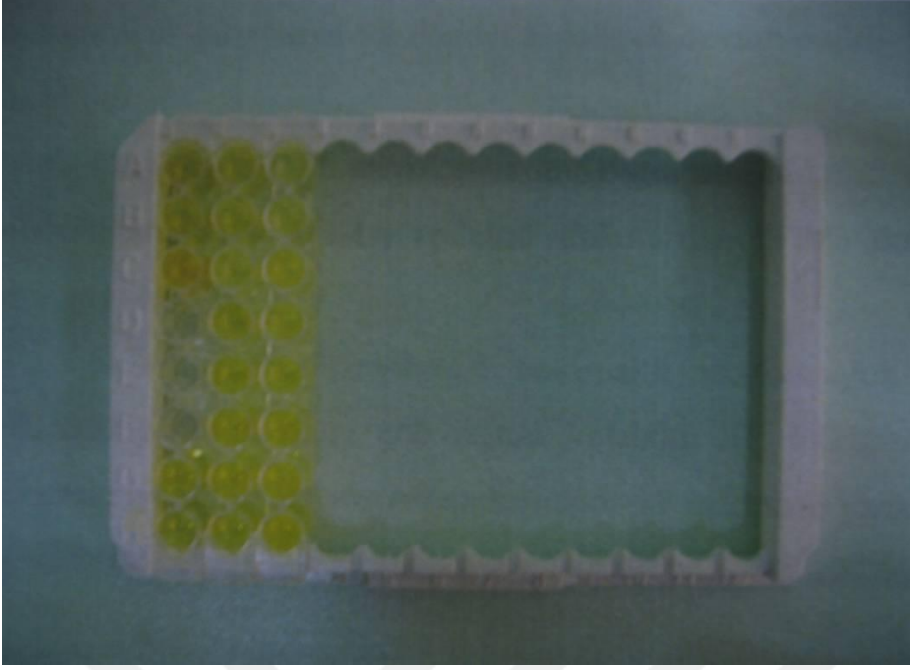
Şekil 3.2. Dokuları tartmakta kullanılan hassas tartı.



Şekil 3.3. Dokulara asetik asit ekleyerek ve ısıtılarak ekstraksiyonları elde ettiğimiz cihaz.



Şekil 3.4. Speed VAC Cihazı: Ekstraksiyon sıvılarının uçurulması için kullanılan cihaz.



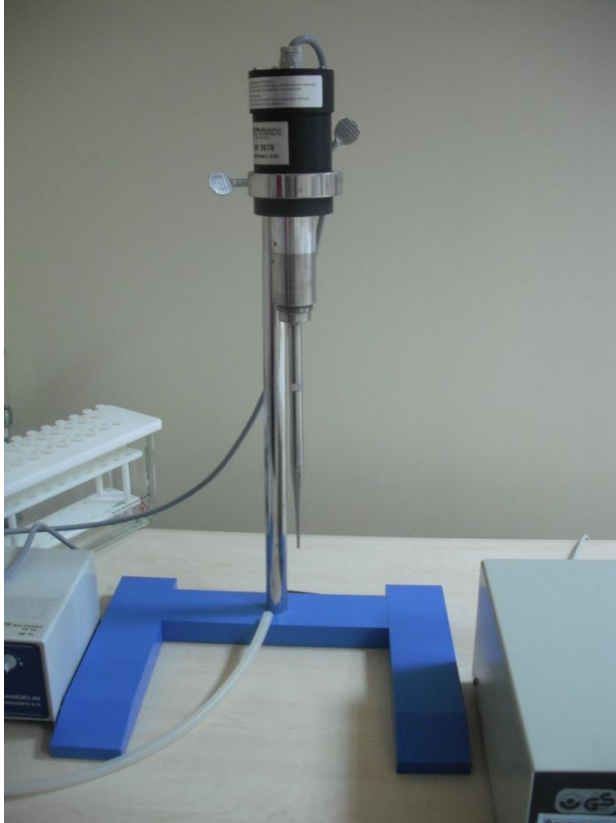
Şekil 3.5. EIA yöntemi ile ölçümlerin yapıldığı bilgisayar destekli cihaz.



Şekil 3.6. EIA yönteminin yapılışı. Thermo Labssystem Multiskan Spectrum (Spektrofotometri- VIP, SP, CGRP ölçümleri).



Şekil 3.7. BioTek FLx800 Fluorescence (Neprilisin ve Alfa secretase fluorometric ölçüm).



Şekil 3.8. Bandelin UW-2070 (Sonikatör-Dokuların parçalanması homojen hale getirilmesi).

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler INSTAT Windows programı kullanılarak yapıldı. Normal dağılıma uygun olan parametrik değerler için paired T-testi; normal dağılıma uymayan parametrik değerler için ManWhitney U testi; nonparametrik değerler için Unpaired t-test, welch t-test kullanıldı. P değerinin $<0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



5. SONUÇLAR

Renal hücreli karsinom ve çevre tümörsüz böbrek dokusundaki Alfa-sekretaz ve Neprilisin aktiviteleri

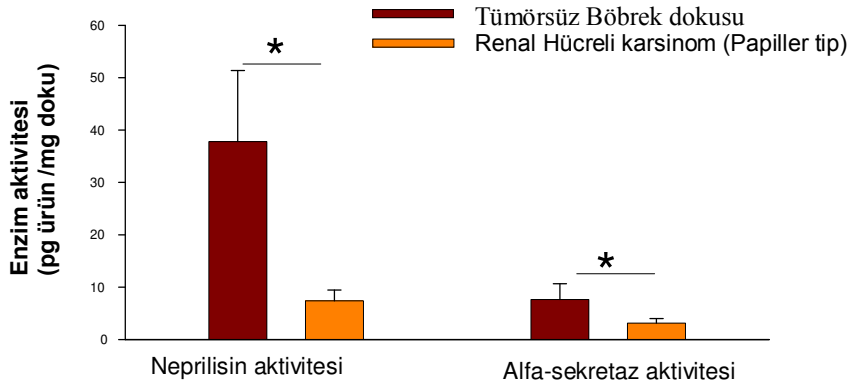
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Kliniği'nde Temmuz 2007 ile Aralık 2010 arasında renal hücreli kanser nedeniyle radikal nefrektomi uygulanmış toplam 60 hasta çalışmaya alındı. Hastaların 40'ı erkek, 20'si kadındı. Ortalama yaş kadınlarda 52,1, erkeklerde 60,5 idi. Hastaların 12'sinde papiller tip, 34'ünde berrak hücreli tip, 8'inde kromofob tip renal hücreli karsinom tespit edildi. 6 olgu diğer tiplerde renal hücreli karsinomdu (Tablo 5.1). Tüm renal kanser tiplerinde Neprilisin (CD10) ve alfa sekretaz aktiviteleri cerrahi sınıra en az 2 cm uzaklıkta olan komşu sağlam doku ile karşılaştırıldığında daha düşük seviyelerde izlendi.

Toplam 45 hastada tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda alfa-sekretaz ve NEP aktivitesi florojenik substratlar kullanılarak metotta anlatıldığı gibi ölçüldü. Tümör dokularının hepsinde NEP aktivitesi aynı bireyden alınan tümörsüz böbrek dokusuna göre belirgin derecede düşük bulundu. Benzer şekilde tümör alfa-sekretaz aktivitesi 6 hasta hariç, hastaların hepsinde böbrek dokusuna göre belirgin derece de düşük bulundu.

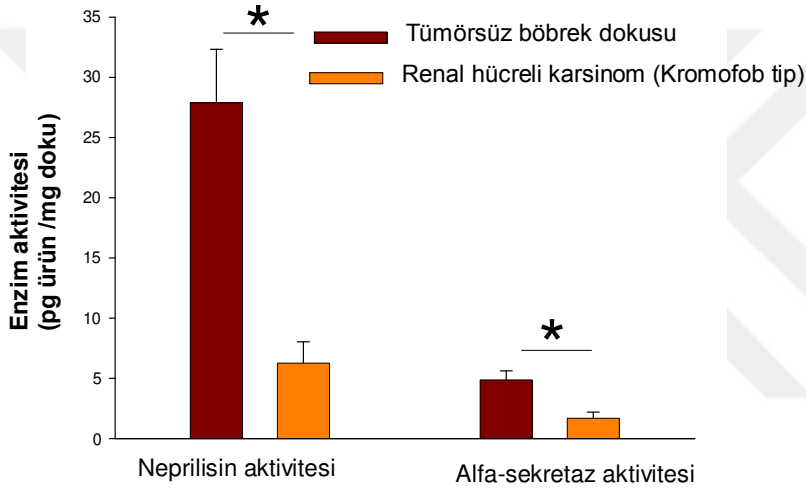
Enzim aktivitesindeki azalış hastaların tümör tipine ve derecesine göre değişiklik göstermedi. İstatistiksel analizler, tümör tiplerine göre yapıldı. Şekil 5.1 de görüldüğü gibi papiller tip RHK'da NEP aktivitesi ve alfa-sekretaz aktivitesi tümör dokusunda belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. NEP düzeyindeki kaybın alfa sekretaza göre daha fazla olduğu gözlemlendi.

Tablo 5.1. Hastaların demografik verileri

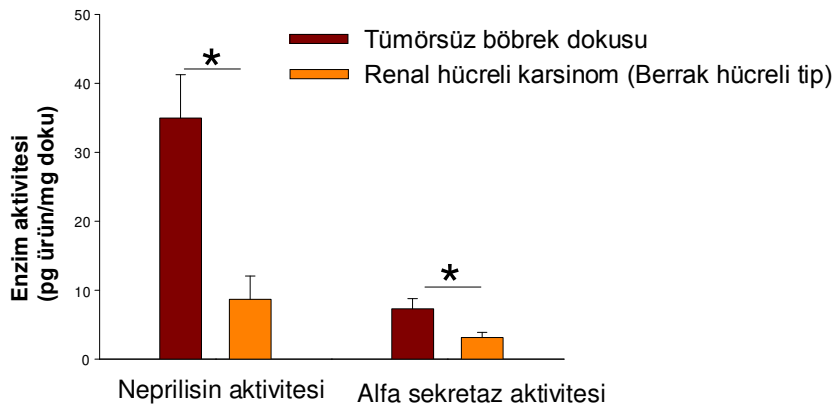
	PAPİLLER	BERRAK HÜCRELİ	KROMOFOB	DİĞER	TOPLAM #
KADIN HASTA SAYISI	3	10	4	3	20
ORTALAMA YAŞ	55,5 ± 0,5	49,5 ± 3,7	48,6 ± 3,5	55, 7 ± 8,4	52,1 ± 3,3
ERKEK HASTA SAYISI	9	24	4	3	40
ORTALAMA YAŞ	61 ± 2,9	58,1 ± 2,3	73,7 ± 2,9	61,7 ± 3,6	60,5 ± 1,8



Şekil 5.1. Papiller tip renal hücreli karsinomu olan 9 hastanın NEP ve alfa-sekretaz aktivitelerinin karşılaştırılması. Paired Student-t testi kullanıldı. * $p<0,05$.



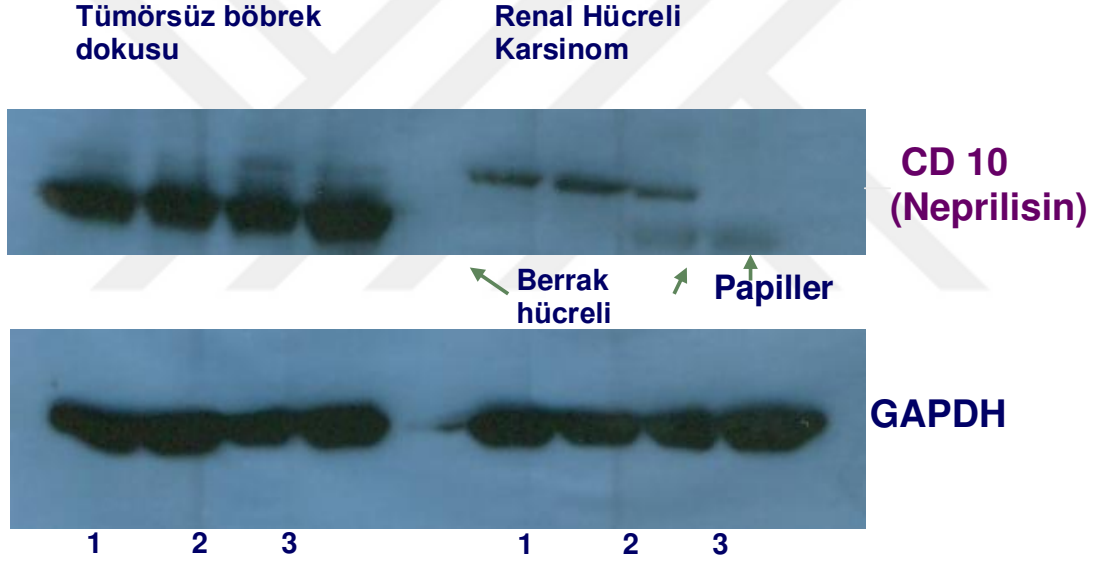
Şekil 5.2. Kromofob tip renal hücreli karsinomu olan 6 hastanın NEP ve alfa-sekretaz aktivitelerinin karşılaştırılması. Paired Student-t testi kullanıldı. * $p<0,05$.



Şekil 5.3. Berrak hücreli tip renal hücreli karsinomu olan 25 hastanın NEP ve alfa-sekretaz aktivitelerinin karşılaştırılması. Paired Student-t testi kullanıldı. * $p<0,05$.

Neprilisin protein düzeylerindeki değişiklikler: Berrak hücreli ve papiller tip renal hücreli karsinomlarda alınan doku örnekleri ve eş böbrek dokusundan alınan örnekler kullanılarak immüno blotlar hazırlandı. NEP düzeyi poliklonal tavşan anti-NEP antikoru (Santa Cruz) kullanılarak belirlendi. Yüklenen protein miktarının eşit olup olmadığını belirlemek için G6PDH (Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz) düzeyi de belirlendi. Böbrek dokusunda NEP düzeyinin belirgin derecede yüksek olduğu görülmektedir.

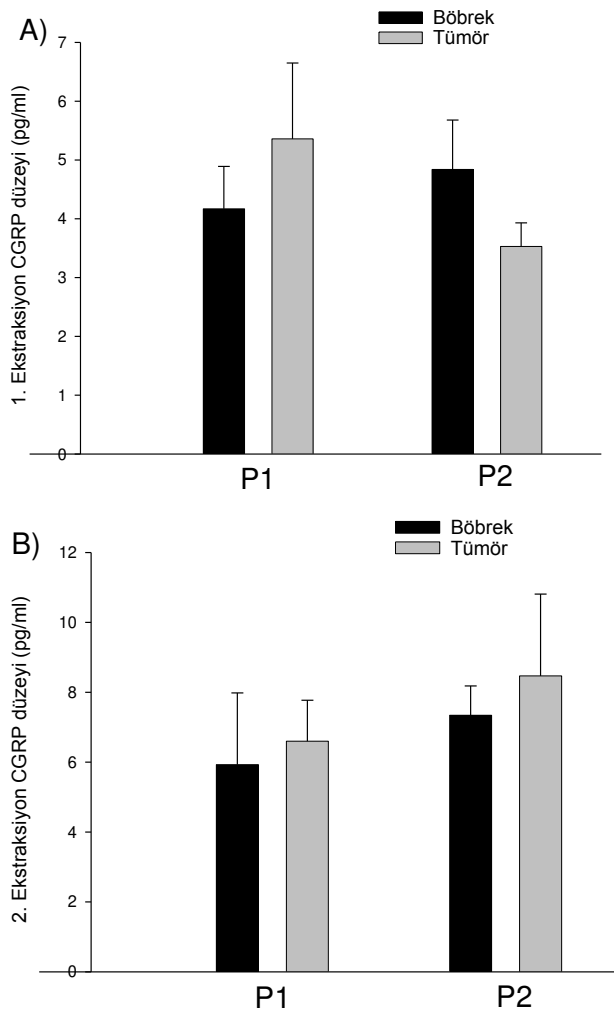
Rastgele seçilen 15 hastanın dokularında NEP düzeyi Western-blot yöntemi ile bakıldı. Enzim aktivitesindeki değişikliklerle korele olarak NEP protein düzeyinin RHK'da belirgin düzeyde düşük olduğu bulundu. Sonuçları örnekleyen immunoblot Şekil 5.4'te gösterilmiştir.



Şekil 5.4. Dokuların Western-Blot analizi. Eşit miktarda protein yüklenen SDS-PAGE jellerinde ayrıştırılan proteinler nitroseluloz membrana aktarıldı. Spesifik NEP ve G6PDH antikoru kullanılarak protein miktarı belirlendi. Dokular Western blot analiziyle incelendiğinde Neprilisin'in (CD 10) renal hücreli karsinomda protein seviyesinde de azaldığı tespit edilmiştir.

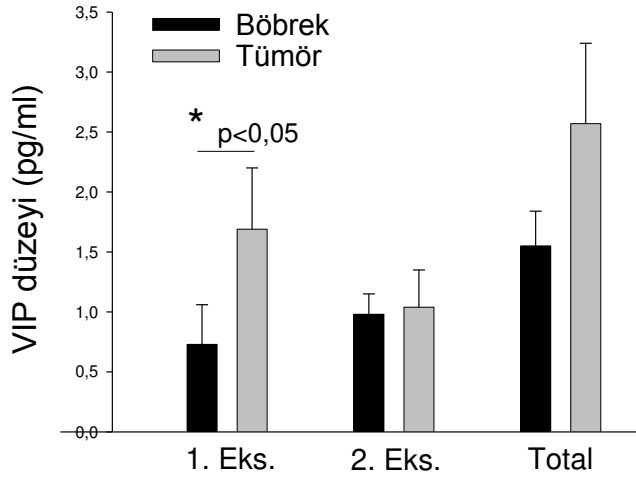
RHK hastalarındaki renal alfa sekretaz aktivitesi nefrolitiazis nedeniyle cerrahi uygulanan böbrek dokularıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksekti ($p < 0,05$) (2,4 kat). Buna karşın, kromofob RHK hastalarındaki renal neprilisin aktivitesi taş bağlı nonfonksiyone böbrek nedeniyle uygulanan nefrektomi materyalinden alınan böbrek dokularıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştı (%44).

SP ve CGRP düzeyindeki değişiklikler: Yukarıda da anlatıldığı gibi kanser gelişimde önemli olan lokal immün süpresyon ve kontrolsüz inflamasyon kısmen duyuşal nöronlarda bulunan nöropeptitler tarafından regule edilmektedir. Bu nöropeptitlerden SP, CGRP ve VIP düzeyleri elimdeki dokularda çalışıldı. SP düzeyinin hem tümörlü hem de tümörsüz böbrek dokusunda ölçülemeyecek kadar düşük olduğu gözlendi. CGRP düzeyinde ise Şekil 5.5'te görüldüğü gibi tümörlerde CGRP seviyelerinde, 1. ve 2.ekstraksiyonlar sonrası, sağlam böbrek dokusuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (p değeri > 0,10).



Şekil 5.5. Tümör dokusu ve komşu sağlam dokuda CGRP ölçümleri. İki basamaklı asetik asid ekstraksiyonu yapılarak nöronal ve nöron dışı CGRP düzeyleri belirlendi. P1: T1N0M0' olan vakaları içermekte iken P2: T2 ve üzeri evreleri göstermektedir.

VIP düzeyindeki değişiklikler: Nöronal ve nöron dışı VIP düzeyi iki basamaklı ekstraksiyonda pT1, PT2 ve üzerindeki tümörler birlikte gruplanıp ölçüldü. Nöronal düzeyi gösteren 1 ekstraksiyonda normal böbrek dokusuyla karşılaştırıldığında VIP seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda tümör dokusunda arttığı saptanmıştır (p değeri < 0,05) (Şekil 5.6.). Diğer taraftan nöron dışı VIP düzeylerinin iki grup arasında farklı olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 5.6. Tümör dokusu ve komşu normal böbrek dokusunda VIP ölçümleri. Hastalar evrelerine göre ayrılmadan analizler yapılmıştır. Nöronal düzeyini gösteren 1. ekstraksiyonda tümör dokusunda komşu tümörsüz böbrek dokusuna göre VIP miktarının arttığı görülmüştür (VIP-vazoaktif intestinal peptit, 1.EKS. -1. Ekstraksiyon, 2.EKS- 2. Ekstraksiyon).

İmmunohistokimyasal olarak alfa-sekretazdan sorumlu ADAM ailesine ait enzimlerin ve Neprilisin (CD10) incelenmesi

Dokular standart immünohistokimyasal yöntemlerle boyandıktan sonra boyanmanın yoğunluğu, lokalizasyonu immunreaktivite skalası kullanılarak değerlendirildi (Oh ve ark. 2009): Bütün tümör tipleri ve evreleri bir arada değerlendirilip çevre tümörsüz dokuyla karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar Tablo 5.2’de verilmiştir.

ADAM ve CD10 boyanma yoğunluğu (BY) dört dereceli immunreaktivite skalası ile değerlendirildi (Oh ve ark. 2009) (**BY: 0** – hiç boyanma yok, **1** – zayıf BY, **2** – orta BY, **3** – güçlü BY).

Pozitif boyanmış CD10,ADAM9, 10, 17 hücre yüzdesi beş dereceli skala ile hiç boyanmamış hücrelerden neredeyse tamamen boyanmış hücrelere kadar sınıflandırıldı (**PB yüzdesi: 0**- hiç boyanmış hücre yok, **1**- >0-25% boyanmış hücre, **2**-

>25-50% boyanmış hücre, **3-** >50-75% boyanmış hücre, **4-** >75-100 % boyanmış hücre).

CD10 ve ADAM'ların genel immunreaktivitesi immunreaktivite skoru hesaplanarak değerlendirildi.

$$(IRS = BY \times PB)$$

IRS: Immunreaktivite skoru, **PB:** Pozitif boyanmış hücreler, **BY:** Boyanma yoğunluğu

Tablo 5.2. pT1N0M0 (T1), pT2N0M0 (T2) ve pT3aN0M0 (T3) ve lenf nodu tutulumu veya uzak metastazı olan (M1) tüm tiplerde renal hücreli karsinom hastalarında tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda CD10, ADAM9, ADAM17, ADAM10 düzeylerinin immunreaktivite skalası kullanılarak ölçümleri yapılmıştır.

	CD 10 (IRS)		ADAM 9 (IRS)		ADAM 17 (IRS)		ADAM 10 (IRS)	
	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi
T1 n=27	1,7±0,57	11,4±0,29	0,8±0,27	6,25±0,64	5,59±0,76	7,7±0,65	4,7±0,66	8,6±0,57
T2 n=11	2,5±1,11	10,7±0,67	0,6±0,33	4,7±1,06	6,1±1,08	5,6±1,08	3,7±0,69	7,3±1,09
T3 n=9	0,7±0,52	10,2±1,17	0	3,7±0,96	5,1±1,60	6,6±1,48	3,3±0,55	7,1±1,05
M1 n=13	1,7±1,05	11,3±0,41	0,7±0,39	6,3±0,97	3±0,76	5,6±0,59	3,7±1,17	6,2±1,08

IRS: Immunreaktivite skoru, **PB:** Pozitif boyanmış hücreler , **BY:** Boyanma yoğunluğu

BY: 0 – hiç boyanma yok, 1 – zayıf BY, 2 – orta BY, 3 – güçlü BY

PB yüzdesi: 0- hiç boyanmış hücre yok, 1- >0-25% boyanmış hücre, 2- >25-50% boyanmış hücre, 3- >50-75% boyanmış hücre, 4- >75-100 % boyanmış hücre

$$IRS = BY \times PB$$

Berrak hücreli karsinom: Tümör dokusu ile böbrek dokusu arasındaki istatistiksel farklar tümör tipleri ve evreleri göz önüne alınarak yapılmış ve sonuçları aşağıda verilmiştir. Berrak hücreli karsinomla ilgili sonuçlar Tablo 5.3'te görülmektedir. NEP (CD10), ADAM9 ve ADAM10 düzeyi berrak hücreli renal hücreli karsinomda incelenen tüm evrelerde tümörsüz böbrek dokusuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. İstatistiksel analizler ANOVA ve Bonferroni post-testi kullanılarak elde edilmiştir. ADAM17 düzeyinin ise ileri evrelerde tümör dokusunda erken evre tümör dokusuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir (Student's t-testi).

Tablo 5.3. T1 (T1N0M0), T2 (T2N0M0) ve T3 (T3aN0M0) ve lenf nodu tutulumu veya uzak metastazı olan (M1) berrak hücreli tip renal hücreli karsinom hastalarında tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda CD10, ADAM9, ADAM17, ADAM10 düzeyleri.

	CD 10 (IRS)		ADAM 9 (IRS)		ADAM 17 (IRS)		ADAM 10 (IRS)	
	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi
T1 n=16	1,6±0,63	11,7±0,25	0,3±0,19	6,1±0,76	6,0±1,05	8,6±0,93	3,5±0,77	7,6±0,76
T2 n=7	4±1,51	10,5±0,94	0,4±0,42	4,5±1,38	7±1,17	4,8±1,39	3,5±0,84	7±1,25
T3 n=6	1,1±0,75	10±1,37	0±0	4,5±1,26	3,3±1,26	5,5±1,50	2,5±0,62	7,3±1,61
M1 n=5	0,6±0,40	12±0	0,4±0,40	7,4±1,47	2,2±0,58	6,4±0,75	4±2,12	7,6±1,16

IRS: Immunreaktivite skoru, PB: Pozitif boyanmış hücreler, BY: Boyanma yoğunluğu

BY: 0 – hiç boyanma yok, 1 – zayıf BY, 2 – orta BY, 3 – güçlü BY

PB yüzdesi: 0- hiç boyanmış hücre yok, 1- >0-25% boyanmış hücre, 2- >25-50% boyanmış hücre, 3- >50-75% boyanmış hücre, 4- >75-100 % boyanmış hücre

IRS= BY x PB

Papiller tip renal hücreli karsinom: Toplam 13 hastanın yer aldığı bu grupta NEP (CD10) ve ADAM 9 düzeyindeki değişiklikler berrak hücreli renal hücreli karsinomdakine benzer bulunmuştur. Spesifik olarak NEP düzeyi hem erken hem ileri evre tümörlerde böbrek dokusuna göre belirgin ve anlamlı derecede düşük bulunmuştur (ANOVA ve Bonferroni post-testi). ADAM9 düzeyi de özellikle erken evre tümörlerde düşük bulunmuştur. İleri evre tümörlerde ADAM9 düzeyi erken evre tümörlerdeki düzeye benzer bulunmuştur. Fakat bu grupta çevre böbrek dokusundaki düzeyin erken evre tümör çevre dokusuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 5.4.). ADAM17 düzeyinin ise değişiklik göstermediği saptanmıştır.

Tablo 5.4. T1 (T1N0M0), T2 (T2N0M0), T3a≤ (T3aN0M0) ve üzerindeki (T3b,N1,M1) lenf nodu tutulumu veya uzak metastazı olan papiller tip renal hücreli karsinom hastalarında tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda CD10, ADAM9, ADAM17, ADAM10 düzeyleri.

	CD 10 (IRS)		ADAM 9 (IRS)		ADAM 17 (IRS)		ADAM 10 (IRS)	
	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi
T1-T2 n=7	0,1±0,14	12±0	0,8±0,59	6,1±1,24	3,4±1,17	6,5±1,04	6,2±1,04	9,4±1,29
T3a≤ n=6	0±0	11,3±0,66	1,3±1,33	3,3±1,23	7,3±2,00	8±1,37	4,3±1,77	6,3±1,67

IRS: Immunreaktivite skoru, PB: Pozitif boyanmış hücreler, BY: Boyanma yoğunluğu

BY: 0 – hiç boyanma yok, 1 – zayıf BY, 2 – orta BY, 3 – güçlü BY

PB yüzdesi: 0- hiç boyanmış hücre yok, 1- >0-25% boyanmış hücre, 2- >25-50% boyanmış hücre, 3- >50-75% boyanmış hücre, 4- >75-100 % boyanmış hücre

IRS= BY x PB

Kromofob tip renal hücreli karsinom: Bu grupta diğer gruplara benzer olarak NEP ve ADAM 10 düzeyinin böbrek dokusuna göre belirgin derecede düşük olduğu bulunmuştur. Sayı sınırlı olduğu için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır (Tablo 5.5.).

Tablo 5.5. T1 (T1N0M0), T2 (T2N0M0), T3a (T3aN0M0) kromofob tip renal hücreli karsinom hastalarında tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda CD10, ADAM9, ADAM17, ADAM10 düzeyleri.

	CD 10 (IRS)		ADAM 9 (IRS)		ADAM 17 (IRS)		ADAM 10 (IRS)	
	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi
T1-T2 n=7	2,7±1,67	10,5±0,94	1,8±0,70	5±1,46	6,4±1,60	6,5±1,04	5±1,51	9,2±1,13
T3a n=1	0	4	0	2	1	1	4	6

IRS: Immunreaktivite skoru, **PB:** Pozitif boyanmış hücreler, **BY:** Boyanma yoğunluğu

BY: 0 – hiç boyanma yok, 1 – zayıf BY, 2 – orta BY, 3 – güçlü BY

PB yüzdesi: 0- hiç boyanmış hücre yok, 1- >0-25% boyanmış hücre, 2- >25-50% boyanmış hücre, 3- >50-75% boyanmış hücre, 4- >75-100 % boyanmış hücre

IRS= BY x PB

Diğer tip renal hücreli karsinom: Bu grupta da sayının sınırlı olmasına rağmen NEP ve ADAM9 düzeylerinin çevre dokuya göre düşük olduğu bulunmuştur (Tablo 5.6).

Tablo 5.6. Diğer tiplerdeki renal hücreli karsinom hastalarında tümör ve tümörsüz böbrek dokusunda CD10, ADAM9, ADAM17, ADAM10 düzeyleri, T1 (multiloküler kistik berrak hücreli T1N0M0), T2≤ (sarkomatoid diferansiyasyon, Bellini'nin toplayıcı duktusları karsinomu ve granüler hücreli tip renal hücreli karsinom olup tümünde lenf nodu ve/veya uzak metastaz mevcuttur).

	CD 10 (IRS)		ADAM 9 (IRS)		ADAM 17 (IRS)		ADAM 10 (IRS)	
	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi	Tm	Tm çevresi
T1 n=1	0	8	2	12	4	6	8	12
T2≤ n=4	2±2	12±0	1,7±1,03	7,5±1,70	2,2±1,31	4,7±1,49	3,5±1,65	4,7±2,21

IRS: Immunreaktivite skoru, **PB:** Pozitif boyanmış hücreler, **BY:** Boyanma yoğunluğu

BY: 0 – hiç boyanma yok, 1 – zayıf BY, 2 – orta BY, 3 – güçlü BY

PB yüzdesi: 0- hiç boyanmış hücre yok, 1- >0-25% boyanmış hücre, 2- >25-50% boyanmış hücre, 3- >50-75% boyanmış hücre, 4- >75-100 % boyanmış hücre

IRS= BY x PB

Tümör dokusunda ADAM9 immunboyanması komşu tümörsüz böbrek dokusuyla karşılaştırıldığında tümör tipinden bağımsız, belirgin olarak düşük bulunmuştur. ADAM17 seviyeleri papiller tip renal hücreli karsinomda erken evrede ileri evreye (metastatik veya T3a tümörlerde) ve çevre tümörsüz dokuya göre daha düşüktü. Ayrıca ileri evre berrak hücreli karsinomda da azalmış ADAM17 ekspresyonu saptandı.

ADAM10 seviyeleri tüm tiplerdeki tümörlerde komşu normal dokuya göre anlamlı olarak düşüktü, ileri veya erken evre açısından anlamlı fark yoktu.

Genel olarak tüm ADAM'lerden en fazla ADAM17 ekspresyonu mevcuttu. Tümör dokusunda ADAM'ların aberran (sitoplazmik) ekspresyonu saptanması azalmış alfa sekretaz aktivitesini açıklamaktadır.

Bizim sonuçlarımız aynı zamanda ADAM17 aberran ekspresyonunun papiller tip renal hücreli karsinomda tümör progresyonuna yol açtığını göstermektedir

İmmunohistokimyasal boyamaların morfolojik görüntüleri

B

Şekil 5.7. A- Tümör dokusunda CD10 immunboyanması, **B-** tümörsüz dokuda CD 10 immunboyanması. Şekilde görüldüğü gibi tümör dokusunda çok az sitoplazmik boyanma gözlenirken, tümörün 2 cm kadar uzağındaki tümörsüz böbrek dokusunda membranöz/sitoplazmik yoğun boyanma gözlendi.

A **B**
Şekil 5.8. A- Tümör dokusunda ADAM 10 immunboyanması, B-Tümörsüz dokuda ADAM 10 immunboyanması.

A **B**
Şekil 5.9. A- Tümör dokusunda ADAM 9 immunboyanması, B- Tümörsüz böbrek dokusunda ADAM 9 immunboyanması.

A **B**
Şekil 5.10. A- Tümör dokusunda ADAM 17 immunboyanması, B- Tümörsüz böbrek dokusunda ADAM 17 immunboyanması.

6. TARTIŞMA

Renal hücreli kanserde ADAM ailesine üye proteazların prognostik ve patolojik rolüne ait çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bu konuda yapılan sınırlı sayıda çalışmada bazı ADAM ailesi proteazlarının yüksek seviyesi kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Örneğin ADAM8, kısalmış survi ve uzak metastazın en iyi prediktörü olarak tanımlanmıştır (253,255). Papiller ve kromofob tiplerdeki renal hücreli karsinomda yüksek ADAM9 ekspresyonu, pozitif lenf nodu tutulumu, uzak metastaz ve tümör derecesi ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek ADAM9 ekspresyonunun renal kanserde kısalmış survi ile bağlantılı olduğu öne sürülmüştür (252,256).

Schwettmann ve ark. (2004) RHK nedeniyle nefrektomi yapılmış hastalarda kanserli ve kanserli olmayan eşleştirmiş dokularda ADAM 8, 17, 19, 28, ADAM TS1, ADAM TS2 mRNA ekspresyonlarını incelemiştir. Real time PCR ile yapılan ölçümlerde kanserli dokuda ADAM 8, 17 ve 19 anlamlı ölçüde yüksek çıkmıştır (253).

Ancak bizim çalışmamızda ADAM 9, 10 ve 17'nin aktivitesini gösteren alfa sekretaz aktivitesi renal hücreli kanserde anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu da bize bazı ADAM ailesi proteazlarının azalmış aktivitesi olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada hangi ADAM üyesinin azaldığını belirlemek için parafine alınan dokularda immunhistokimya ile ADAM 9, 10 ve 17'nin düzeyleri ve lokalizasyonu incelendi. Alfa sekretaz aktivite düzeyi 9'u papiller tip, 25'i berrak hücreli tip, 6'sı kromofob tip renal hücreli karsinomda tümörsüz böbrek dokusuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (%25-50) ($p<0,05$) düşük bulunmuştur. Bu da bize alfa sekretaz aktivitesi gösteren ADAM ailesi proteazlarının bazılarının azalmış aktivitesi olduğunu göstermektedir. ADAM ailesi içinde ADAM 9, 10 ve 17'nin alfa sekretaz aktivitesi

gösterdiği bilinmektedir. Artmış ekspresyon her zaman artmış aktiviteyi yansıtmamaktadır. Fonksiyonel değişiklikler analiz edilerek, her ADAM ailesi üyesinin rolünü anlamak için daha ileri çalışmalar gerekmektedir. Benzer şekilde renal hücreli kanserde Neprilisin aktivitesi ve protein seviyeleri belirgin olarak azalmış olduğu saptandı. Bundan dolayı Neprilisin aktivitesinin tümör oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda, tümör dokusunda ADAM9 immunboyanması komşu tümörsüz böbrek dokusuyla karşılaştırıldığında tümör tipinden bağımsız, belirgin olarak düşük bulunmuştur. ADAM17 seviyeleri papiller tip renal hücreli karsinomda erken evrede ileri evreye (metastatik veya T3a tümörlerde) ve çevre tümörsüz dokuya göre daha düşüktü. Ayrıca ileri evre berrak hücreli karsinomda da azalmış ADAM17 ekspresyonu saptandı. ADAM10 seviyeleri tüm tiplerdeki tümörlerde komşu normal dokuya göre anlamlı olarak düşüktü, ileri veya erken evre açısından anlamlı fark yoktu. Genel olarak tüm ADAM'lerden en fazla ADAM17 ekspresyonu mevcuttu. Tümör dokusunda ADAM'ların aberran (sitoplazmik) ekspresyonu saptanması azalmış alfa sekretaz aktivitesini açıklamaktadır. Bizim sonuçlarımız aynı zamanda ADAM17 aberran ekspresyonunun papiller tip renal hücreli karsinomda tümör progresyonuna yol açtığını göstermektedir.

NEP, androjen bağımsız prostat kanserinde progresyonda rol oynayan nörotensin, bombesin ve endotelin -1 i inaktive eder (257). NEP aşırı ekspresyonunun apoptoza giden hücre sayısında artışa yol açtığı gözlemlenmiştir. Ek olarak, hücre yüzey NEP aşırı ekspresyonunun G1 hücre siklus arrestine yol açtığı, bunu da p21 protein ekspresyonunu indükleyerek ve Rb defosforilasyonu ile sağladığı düşünülmektedir. Prostat kanser hücrelerinde NEP aşırı ekspresyonunun büyüme inhibisyonu, apoptozis indüksiyonu, hücre siklus arresti ve tümör formasyonunun inhibisyonunu da içeren birçok etkisi olduğu gösterilmiştir. NEP androjen bağımsız epitelyal prostat kanser hücrelerinde tümör süpresör etkiye sahiptir ve hormonal regüle androjen bağımlı prostat kanserinden androjen bağımsız prostat kanserine geçişte rol oynar (228,229). Cohen ve ark. küçük hücreli akciğer kanserinde ve adenokarsinom tümörlerde NEP aktivitesi ve protein seviyelerini komşu tutulum olmayan dokuyla karşılaştırdığında daha düşük bulmuşlardır (258). Benzer sonuçlar Pekonen ve ark.'nın endometrial kanser dokularında NEP mRNA seviyelerini değerlendirdikleri çalışmada da görülmüştür (259). NEP ekspresyonu mide ve kolon epitel hücrelerinde normalde izlense de kötü diferansiye tip adenokarsinomda

ekspresyon seviyeleri düşük bulunmuştur (260). Önceki çalışmalar NEP'in epitelyal prostat kanser hücrelerinden ve prostat stroma hücrelerinden farklı olarak eksprese edildiğini göstermiştir. Hücre proliferasyonu ile ilişkili antijen ki-67 ve NEP'e karşı antikorlarla yapılan dual immunhistokimya çalışmalarda NEP ekspresyonuyla hücre proliferasyonu arasında ters bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Benzer sonuçlar hücre kültürü ve xenograft fare modellerinde NEP'in prostat hücrelerinde tümör süpresör ve antimitojenik etkisi olduğunu göstermiştir (261,262). Bu da NEP'in insan prostat kanser hücresi büyümesini ve tümör oluşumunu inhibe edebileceğini düşündürmüştür.

Hem renal hücreli kanserlerde hem de transizyonel hücreli kanserlerde CD10 immunreaktivitesi bulunmuştur. RHK'lerdeki ekspresyonu hem primer hem metastatik tümör dokusunda benzerdir ve histolojik alt tiplerin ayırıcı tanısı için ek belirteç olduğu kanıtlanmıştır. Bundan başka, hücresel boyanma paternleri TNM evresi ve tümör derecesi ile korelasyon göstermektedir. Prognoz yönünden ise, her ne kadar CD10 ile hastaların sonuçları arasında tek değişkenli analizde istatistiksel anlamlı ilişki görülse de, çok değişkenli değerlendirmede anlamlılık gözlenmemiştir.

CD10 nötral metallopeptidaz aktivitesine sahip bir yüzey enzimidir. Bir çalışmada, 180 primer, 58 metastatik böbrek kanseri hastasında ve 53 değişici epitelyum hücreli kanser hastasında CD10 ekspresyonu araştırılmıştır. Primer böbrek kanseri olgularının %90'ında, metastatik olanların %86'sında CD10 ekspresyonu saptanırken değişici epitelyum hücreli kanser olgularının %51'inde gözlenmiştir. Tümör evresi ile CD10 ekspresyonu arasında korelasyon bulunmamıştır. Tümör hücrelerinin derecesi arttıkça CD10 pozitifliğinde azalma görülmüştür. Kromofob hücreli böbrek kanserinde immunreaktivite klasik tipe göre çok daha azdır. Papiller tip böbrek kaserinde %10'dan fazla CD10 immunreaktivitesi, daha agresif formu olan Tip 2'de vardır. CD10 ekspresyonu ile prognoz arasında bir ilişki saptanmamıştır. Sonuç olarak, CD10 ekspresyonu sadece böbrek kanserinde histolojik alt grubu ortaya koymakta yardımcı olmaktadır (242). Başka bir çalışmada, CD10'un hemanjioblastoma ve metastatik berrak hücreli böbrek kanseri ayırım yapmada faydalı bir belirteç olduğu saptanmıştır (263).

Bizim çalışmamızda, tüm renal kanser tiplerinde Neprilisin (CD10) ve alfa sekretaz aktiviteleri cerrahi sınıra en az 2 cm uzaklıkta olan komşu sağlam doku ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük seviyelerde bulundu. Enzim aktivitesindeki azalış hastaların tümör tipine ve derecesine göre değişiklik göstermedi.

NEP düzeyindeki kaybın alfa sekretaza göre daha fazla olduğu gözlemlendi. NEP düzeyi Western-blot yöntemi ile de bakıldı. Enzim aktivitesindeki değişikliklerle korele olarak NEP protein düzeyinin RHK'da belirgin düzeyde düşük olduğu bulundu.

Substans P ve reseptörü olan NK1R'in normal ve neoplastik hücrelerde incelenmesiyle nörokinin-1 reseptör antagonistlerinin kanser hastalarının tedavisinde güncel bir yaklaşıma yol açacağı düşünülmektedir (5).

(Arg6,D-Trp7,9,NmePhe8)-Substans P ((antagonist G)) küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) gelişimini in vitro ve in vivo inhibe eden yeni bir antikanser ajan sınıfı olup, KHAK tedavisi için faz 2 araştırmalarda kullanılmaktadır (MacKinnon ve ark. 1999). Her ne kadar antagonist G KHAK hücre gelişimini bloke etse de kesin etki mekanizması belli değildir. MacKinnon ve ark. yaptığı çalışmada antagonist G'nin apoptozu stimüle ettiğini morfolojik ve KHAK hücrelerinde c-Jun -N terminal kinaz (JNK) aktivitesini uyarak göstermiştir. Bu aktivite nöropeptitten bağımsızdır, ancak reaktif oksijen türlerine (ROS) bağımlıdır ve serbest radikal yakalayıcı olan N-acetyl cysteine ile inhibe edilir. Bundan öte, antagonist G inflamasyonu indükler ve in vivo bradikinin ile indüklenen ödem formasyonunu ortaya çıkarır. Bu sonuçlar ışığında, geniş spektrumlu nöropeptit antagonisti olarak, antagonist G, KHAK hücre membranlarında bazal G protein aktivitesini uyarmaktadır. Böylece G proteinleri aktive ederek sinyal iletimini sağlar. Bu yeni aktivite, KHAK hücrelerinde tam anti-kanser aktivite için önemli olup, nöropeptite bağlı olmayan kanserlerde antagonist G aktivitesi için de yararlı olabileceği gösterilmiştir (264).

Kapsaisine duyarlı duysal sinirler miyelinsiz C-liflerden oluşmakta ve doku sonlanmalarında SP, vazoaaktif intestinal peptit ile kalsitonin geni ile ilişkili peptit gibi immün regülatör peptitler içermektedir (265,266). SP kanserle en fazla ilişkilendirilen nöropeptittir. SP'nin kanser gelişimindeki rolü ile ilgili çalışmaların sonuçları birbiriyle çelişkili bulunmuştur. Çalışmaların bir kısmı SP'nin tümör gelişimini hızlandırdığını, yeni damar oluşumunu artırdığını ve bu yolla metastazı kolaylaştırdığını göstermektedir (171,174,179,198,267). Diğer yandan, SP geninin kaybı kolon kanserinin gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (268). Benzer şekilde, farelerin SP ile önceden tedavi edilmesinin tümöre karşı immün yanıtı artırarak melanoma gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir (269). Bu birbirine zıt görünen etkilerin olası nedeni, SP ve hidroliz ürünlerinin çok farklı etkilerinin olması ve duruma göre birbirlerinin etkisini antagonize etmeleri olabilir. Bu etkileşim daha çok santral sinir sisteminde gösterilmiş olsa da, kanser gelişiminde de önemli olacağını sentetik SP

fragmanlarıyla yapılan çalışmalar göstermiştir. Sentetik SP kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlatmaktadır ve olası antitümör etkileri için klinik denemeler yapılmaktadır. Bu durum endojen SP'nin ortamda doğru enzimler bulunduğunda, fragmanları yoluyla antitümör etki göstereceğini düşündürmektedir (270,199,200). Kanser tedavisi için denenen SP fragmanları, SP'nin bazı etkilerini taklit ederken, mitojenik etkilerini antagonize etmektedir (271). Henüz SP'nin fizyolojik fragmanları kanser hücreleri üzerinde test edilmemiş olmakla birlikte, bu fragmanlardan SP 1-7'nin santral sinir sistemindeki etkileri ayrıntılı olarak çalışılmış ve SP 1-7'nin NK-1 reseptörlerinin düzeyini azalttığı gösterilmiştir (272-274). Bu bulgular, SP'nin ADAM 10'la hidroliz ürünlerinin antitümör etki gösterebileceği ve bu etkiyi kaspaz 7 gibi antitümör genlerin aktivasyonu ile yapabileceğini göstermektedir.

Bizim çalışmamızda, SP, CGRP ve VIP düzeyleri elimizdeki dokularda çalışıldı. SP düzeyinin hem tümörlü hem de tümörsüz böbrek dokusunda ölçülemeyecek kadar düşük olduğu gözlemlendi. CGRP düzeyinde ise tümörlerde CGRP seviyelerinde, 1. ve 2. ekstraksiyonlar sonrası, sağlam böbrek dokusuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (p değeri $> 0,10$).

ADAM 9 dahil birçok ADAM çeşitli solid tümörlerde mRNA ve/veya protein seviyesinde tanımlanmış ve sıklıkla kötü prognostik parametreler veya kısalmış hasta survisi ile ilişkili bulunmuştur (275-277). ADAM 9 ekspresyonu ile metastaz ve yüksek tümör derecesi arasında güçlü bir ilişki vardır. ADAM 9 esas olarak nefronun proksimal kısmında eksprese olur bu nedenle bu bölgeden kaynaklandığı düşünülen berrak hücreli ve papiller karsinomlarda yüksek ADAM 9 ekspresyonu izlenir. İlginç olarak Fritzsche ve ark (2008) yaptığı bir çalışmada 5 kromofoblu vakanın 3'ünde yüksek ADAM9 ekspresyonu göstermesi bu tümör alt tipinin bilinen aksine distal nefrondan kaynaklanmadığını düşündürür. ADAM 9 solid tümörlerde tümör oluşumu ve tümör progresyonunda rol oynar (278,279). Fonksiyonel olarak ADAM 9'un spesifik antikorlarla blokajı gastrik kanser hücre dizilerinde hücre büyümesinin inhibisyonu ile sonuçlanmıştır (275). ADAM9'un akciğer kanser dizilerinde aşırı ekspresyonu invazifliği ortaya koyarken; beyin metastazları da anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur. Melanomda da ADAM9 in vivo invazyonda artmış regülasyon göstermiştir (280). ADAM9'un kötü prognostik tümör parametreleri ile (pozitif lenf nodu, uzak metastaz, pozitif cerrahi sınır, yüksek tümör derecesi) anlamlı olarak ilişkili bulunması diğer bulgularla örtüşmektedir. Enteresan olan en yüksek oranda

ekspresyon papiller hücreli tip RHK'da görülmüştür, vaka sayısı her ne kadar az da olsa tanınal bilgi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda, ADAM9 düzeyi de özellikle erken evre tümörlerde düşük bulunmuştur. İleri evre tümörlerde ADAM9 düzeyi erken evre tümörlerdeki düzeye benzer bulunmuştur. Fakat bu grupta çevre böbrek dokusundaki düzeyin erken evre tümör çevre dokusuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Renal hücreli karsinom (RHK) için çok sayıda yeni tümör belirteci bulunmuştur. Bunlardan biri ADAM10'dur. ADAM10 bir metalloproteazdır ve tümör evresi, lenf nodu ve metastaz durumu ile anlamlı olarak ilişkili olduğu, ayrıca papiller RHK'da belirgin şekilde bulunduğu gösterilmiştir (281). IL-15'in tümör içi ekspresyonu güçlü bir immünomodulator faktördür ve tümör progresyonu ve kötü klinik sonuçlar ile ilişkilidir. Bu faktör ADAM17 ve ADAM10 tarafından hücre dışına bırakılır. Sonuçta IL-15 tümör progresyonunda kritik bir proses olan epitelyum-mezenkimal transdiferansiyasyonu meydana getirir (282).

Aktif metalloproteinazlar olarak ADAM'lar, ekstraselüler matriks proteinlerini yıkararak tümör invazyonu ve metastazda önemli rol oynarlar. ADAM 9 laminini parçalayarak invazyonu kolaylaştırır (283). ADAM'lar integrinler ve proteoglikanlarla etkileşerek tümör hücresi adhezyonunu direkt sağlayabilirler (284). ADAM'ların izole edilmiş kısımları tümör oluşumunda potent etkilere sahiptir. ADAM 15'in antianjiyogenik ve antimetastatik işlevi olan disintegrin kısmı olduğu bilinmekte ve bu görüşü desteklemektedir (285). ADAM 10'un adhezyon molekülleri N- E ve VE cadherin'i yıkma özelliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Maretzky ve ark 2005, Reiss ve ark 2005, Schulz ve ark 2008). Bunlar tümör hücresi fenotipini etkiler, farklı adezyon paternleri oluşumuna yol açar ve migrasyon, beta catenin aktivasyonu sinyali veya intraselüler kısmın direkt etkisiyle oluşur.

Selektinler, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 gibi adezyon moleküllerinin ADAM'lar tarafından dökülmesi (shedding) tümör hücrelerinin adezyon ve damarlanmasını etkiler. ADAM'lar dış kısımlarını dökerek büyüme faktörlerini, kemokinler ve diğer çözünen mediatörleri mobilize eder veya sinyal iletimiyle reseptörleri uyarır. Bu özellikle ADAM 17 ve EGFR sinyal iletimi için geçerli olup, ADAM 17 ve TGF-alfa arasındaki direkt ilişki insan meme kanserinde açıkça rapor edilmiştir (Borrel Pages ve ark 2003, Kenny ve Bissel 2007) (13).

Bizim çalışmamızda, NEP (CD10), ADAM9 ve ADAM10 düzeyi berrak hücreli renal hücreli karsinomda incelenen tüm evrelerde tümörsüz böbrek dokusuna

göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. İstatistiksel analizler ANOVA ve Bonferroni post-testi kullanılarak elde edilmiştir. ADAM17 düzeyinin ise ileri evrelerde tümör dokusunda erken evre tümör dokusuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir (Student's t-testi).



7. ÖZET

Renal hücreli karsinom (RHK) insidansı giderek artan, sınırlı bir grup hasta için etkin tedavisi olan, konvansiyonel kemoterapi ve radyoterapiye iyi cevap vermeyen bir malignensidir. Bu nedenle son yıllarda hastalığın gelişimi ve progresyonu ile ilgili moleküllerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar artmıştır. ADAM (A Disintegrin A Metalloproteaz)'lar bir metalloproteaz ailesi olup, tüm çalışmalarda olmasa da bazı çalışmalarda ADAM 9, ADAM 10 ve ADAM 17'nin artmış ekspresyonunun tümör progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde nöropeptidlerin hidrolizinden sorumlu bir peptidaz olan neprilisin (NEP) seviyesindeki değişimin tümör formasyonu ve progresyonunu nasıl etkilediği kesinliğe kavuşmamıştır. Bu bulgular protein seviyesindeki değişimlerin her zaman fonksiyonel değişimlerle korele olmadığını göstermiştir. Aday moleküllerin tümör formasyonu ve metastazları nasıl etkilediğini anlamak için fonksiyonel değişimlerin belirlenmesi gerekmektedir.

Biz ardışık 60 olguluk renal hücreli kanser serimizde postoperatif taze dondurulmuş RHK dokusunda ve primer tümöre 2 cm uzaklıktaki komşu renal dokuda neprilisin ve alfa sekretaz aktivitesini ADAM 9, 10 ve 17 fonksiyon ölçümleriyle değerlendirdik. ADAM'ların hem tümör hem de komşu tümörsüz dokudaki seviyeleri ve lokalizasyonları immunhistokimya çalışmasıyla değerlendirildi. Örneklerin patolojik derecelendirmesi immünreaktivite skalası kullanılarak yapıldı. Kontrol grubu olarak taşı nonfonksiyone böbrek nedeniyle cerrahi uygulanan 10 hastadan alınan dokularda da aynı çalışma yapıldı. RHK alt tiplerinden 34'ü berrak hücreli, 12'si papiller ve 8'i kromofob idi. Yüzdeleri sırasıyla 58, 16 ve 11 idi. 6 olgu ise diğer tip RHK'lardan oluşuyordu.

Hem alfa sekretaz, hem de neprilisin aktivitesinin tümör olmayan komşu renal dokuyla karşılaştırıldığında tümör dokusunda anlamlı olarak azaldığı (alfa sekretaz %78, neprilisin %57) saptandı ($p < 0,0001$ paired t test). Enzim aktivitesindeki azalış farklı histolojik alt tipler ve derecesine göre değişiklik göstermedi. İstatistiksel analizler, tümör tiplerine göre yapıldı. Papiller tip RHK'da NEP aktivitesi ve alfa-sekretaz aktivitesi tümör dokusunda belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. NEP düzeyindeki kaybın alfa sekretaza göre daha fazla olduğu

gözlendi. RHK hastalarındaki renal alfa sekretaz aktivitesi nefrolitiazis nedeniyle cerrahi uygulanan böbrek dokularıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$) (2,4 kat). Buna karşın, kromofob RHK hastalarındaki renal neprilisin aktivitesi taşa bağlı nonfonksiyone böbrek nedeniyle uygulanan nefrektomi materyalinden alınan böbrek dokularıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştı (%44).

NEP (CD10), ADAM9 ve ADAM10 düzeyi berrak hücreli renal hücreli karsinomda incelenen tüm evrelerde tümörsüz böbrek dokusuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. ADAM17 düzeyinin ise ileri evrelerde tümör dokusunda erken evre tümör dokusuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. Tümör dokusunda ADAM9 immunboyanması komşu tümörsüz böbrek dokusuyla karşılaştırıldığında tümör tipinden bağımsız, belirgin olarak düşük bulunmuştur. ADAM17 seviyeleri papiller tip renal hücreli karsinomda erken evrede ileri evreye (metastatik veya T3a tümörlerde) ve çevre tümörsüz dokuya göre daha düşüktü. Ayrıca ileri evre berrak hücreli karsinomda da azalmış ADAM17 ekspresyonu saptandı. ADAM10 seviyeleri tüm tiplerdeki tümörlerde komşu normal dokuya göre anlamlı olarak düşüktü, ileri veya erken evre açısından anlamlı fark yoktu. Genel olarak tüm ADAM'lerden en fazla ADAM17 ekspresyonu saptandı. Tümör dokusunda ADAM'ların aberran (sitoplazmik) ekspresyonu saptanması azalmış alfa sekretaz aktivitesini açıklamaktadır. Bizim sonuçlarımız aynı zamanda ADAM17 aberran ekspresyonunun papiller tip renal hücreli karsinomda tümör progresyonuna yol açtığını göstermektedir.

Alfa sekretaz aktivitesinin tümör oluşumu ve progresyonundaki rolü tam bilinmemektedir. Bu sonuçlar, neprilisin ve alfa sekretaz aktivitesinin RHK olan hastalarda azaldığını **ilk kez** göstermiştir ve terapötik anlamlılık için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Renal hücreli karsinom, Substans P, NEP/CD10, ADAM, alfa sekretaz.

8. ABSTRACT

Association of Renal Cell Carcinoma Phenotype and Prognosis with Differential Changes of Substance P and Substance P Degrading Enzyme Levels

Renal cell carcinoma (RCC) is a malignancy with a rising incidence and has effective treatment modalities for a limited group of patient which does not response well to conventional chemotherapy and radiotherapy. Hence recently, the identification of molecules involved in the development and progression of this disease is of high priority. ADAMs (A Disintegrin A Metaloproteases) are a family of metaloproteases and increased expression of ADAM9, ADAM10 and ADAM17 was associated with tumor progression in some but not in all studies. Similarly effects of different levels of neprilisin (NEP), a peptidase which is responsible for hydrolyzing neuropeptides, on tumorigenesis and tumor progression is not clear. These discrepancies may reflect the fact that changes in protein levels do not always correlate with the functional changes.

Changes in alpha-secretase activity as an assay for ADAM9, 10 and 17 functions in freshly frozen 60 consecutive renal cell carcinoma samples were examined. Adjacent renal tissue ~2cm distant to primary tumor was also used. Changes in the level and localization of the ADAMs were evaluated in both tumor tissue and neighboring uninvolved kidney tissue by immunohistochemistry. Pathological grading of the samples was calculated using immunoreactivity scale. Subtypes of RCC and the number of patients examined were as follows: Clear cell carcinoma (n=34) (58%), papillary cell carcinoma (n=12) (16%), Chromophobe cell type (n=8) (11%) and other types (n=6).

Alpha-secretase activity and neprilisin was significantly lower (78% and 57%) in tumor tissue compared to the neighboring renal tissue regardless of tumor type ($p < 0,0001$ paired t test). Statistical analysis done according to tumor types. In papillary type RCC NEP and alpha secretase activity in tumor tissue is markedly and statistically significant lower than neighbouring uninvolved kidney. NEP level decrease was higher than alpha secretase decrease. Renal alpha secretase activity in

RCC was significantly higher than alpha secretase activity in patients underwent simple nephrectomy for nonfunctioning kidney because of nephrolitiazis ($p < 0,05$) (2-4 times). But in chromophobe type RCC patients renal neprylisin activity was significantly lower (44%) than patients underwent simple nephrectomy for nonfunctioning kidney because of nephrolitiazis. Immunostaining for ADAM9 demonstrated that ADAM9 levels were markedly lower in tumor tissue compared to neighboring renal tissue regardless of cell type. ADAM17 levels however were lower in early disease compared to advanced carcinoma (metastatic disease or with T3a tumors) as well as neighboring renal tissue in papillary type but not clear cell carcinoma. In fact decreased expression of ADAM17 in advanced carcinoma of clear cell was observed. ADAM10 levels were significantly lower in all types compared to neighboring renal tissue and there was no difference between early and advanced disease. Overall, of all ADAMs, ADAM17 was expressed the highest. The aberrant (cytoplasmic) expression of all ADAMs however was observed in tumor tissue explaining the decreased alpha secretase activity. Our results also suggested that aberrant expression of ADAM17 may promote tumor progression in papillary cell type.

The role of alpha-secretase activity in tumor progression as well as tumorogenesis is not well-known. Our results demonstrated for the **first time** that alpha-secretase activity was significantly decreased in RCC which might be involved in pathogenesis. Further studies however are needed to evaluate possible anti-tumoral effects of alpha-secretase activity.

Key words: Renal cell carcinoma, Substance P, NEP/CD10, ADAM, alpha secretase.

9. KAYNAKLAR

1. Baldewijns MM, van VI, Schouten LJ, Soetekouw PM, de Bruine AP, van EM. Genetics and epigenetics of renal cell cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1785(2): 133-55.
2. Ogasawara M, Murata J, Ayukawa K, Saiki I. Differential effect of intestinal neuropeptides on invasion and migration of colon carcinoma cells in vitro. *Cancer Lett* 1997; 119(1): 125-30.
3. Brain SD, Cox HM. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 2006; 147(1): 202-11.
4. Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 1998; 7(2-3): 81-96.
5. Esteban F, Munoz M, Gonzalez-Moles MA, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(1): 137-45.
6. Erin N, Boyer PJ, Bonneau RH, Clawson GA, Welch DR. Capsaicin-mediated denervation of sensory neurons promotes mammary tumor metastasis to lung and heart. *Anticancer Res* 2004; 24(2B): 1003-9.
7. Erin N, Zhao W, Bylander J, Chase G, Clawson G. Capsaicin-induced inactivation of sensory neurons promotes a more aggressive gene expression phenotype in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 99(3):351-64.
8. Manske JM, Hanson SE. Substance-P-mediated immunomodulation of tumor growth in a murine model. *Neuroimmunomodulation* 2005; 12(4):201-10.
9. Harris DT, Witten M. Aerosolized substance P protects against cigarette-induced lung damage and tumor development. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2003; 49(2): 151-7.
10. MacKinnon A, Sethi T. [D-Arg6, D-Trp7,9, NmePhe8]-substance P (6-11) activates JNK and induces apoptosis in small cell lung cancer cells via an oxidant-dependent mechanism. *Methods Mol Med* 2003; 74: 299-307.
11. Tokuhara T, Adachi M, Hashida H. Neutral endopeptidase/CD10 and aminopeptidase N/CD13 gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 49(8): 489-96.
12. Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. CD10 is a diagnostic and prognostic marker in renal malignancies. *Histopathology* 2004; 45(5): 460-7.
13. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 2008; 29(5): 258-89.
14. Roemer A, Schwettmann L, Jung M. Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome. *Oncol Rep* 2004; 11(2): 529-36.

15. Gutwein P, Schramme A, Sinke N. Tumoural CXCL16 expression is a novel prognostic marker of longer survival times in renal cell cancer patients. *Eur J Cancer* 2009; 45(3): 478-89.
16. Florentin D, Sassi A, Roques BP. A highly sensitive fluorometric assay for "enkephalinase," a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosine-glycine-glycine from enkephalins. *Anal Biochem* 1984; 141(1): 62-9.
17. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics 2007. *Cancer. J Clin* 2007; 57: 43-66.42.
18. Lindblad P. Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scand J Surg* 2004; 93: 88-96.
19. Pischon T, Lahmann PH, Boeing H. Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2006; 118: 728-38.
20. Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
21. Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni Jr JF. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999; 281: 1628-31.
22. Vaishampayan UN, Do H, Hussain M. Radical disparity in incidence pattern and outcome of kidney cancer. *Urology* 2003; 62: 1012-7.
23. Lam JS, Svarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol* 2005; 173: 1853-62.
24. Castellanos RD, Aron BS, Evans AT: Renal adenocarcinoma in children: Incidence, therapy and prognosis. *J Urol* 1974; 11: 534-7.
25. Chan HSL, Daneman A, Gribin M, Martin DJ. Renal cell carcinoma the first two decades of life. *Pediatr Radiol* 1983; 13: 324-8.
26. Freddman AL, Vats TS, Stewart T. Renal cell carcinoma in children: The Detroit experience. *J Urol* 1996; 155: 1708-10.
27. Asanuma H, Nakai H, Takeda M. Renal cell carcinoma in children: Experience at a single institution in Japan. *J Urol* 1999; 162: 1402-05.43.
28. Hunt DJ, van der Hel QL, McMillan GP. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* 2005; 114: 101-8.
29. Kantor AF. Current concepts in the epidemiology and etiology of primary renal cell carcinoma. *J Urol* 1977; 117: 415-7.
30. La Vecchia C, Negri E, D'avanzo B, Franceschi S. Smoking and renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 5231-3.
31. McLaughlin JK, Linblad P, Mellemegaard A. International renal cell cancer cancer study: Tobacco use. *Int J Cancer* 1995; 60: 194-8.
32. Kovacks G, Akhtar M, Beckwith BJ. The Heilderberg of renal cell tumors. *J Pathol* 1997; 83: 131-3.classification.

33. Grossman E, Messerli FH, Boyko V. Is there an association between hypertension and cancer mortality? *Am J Med* 2002; 112: 479-86.
34. Hu J, Mao Y, White K. Diet and vitamin or mineral supplements and risk of renal cell carcinoma in Canada. *Cancer Causes Control* 2003;14: 705-14.
35. Menezes RJ, Tomlinson G, Kreiger N. Physical activity and risk of renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 107: 642-6.
36. Kolonel LN. Association of cadmium with renal cancer. *Cancer* 1976; 37: 1782-7.
37. Ishikawa I, Saito Y, Asaka M. Twenty-year follow-up of acquired renal cystic disease. *Clin Nephrol* 2003; 59: 153-9.
38. Rubagotti A, Martorana G, Boccardo FM. Epidemiology of kidney cancer. *Eur Urol* 2006; 50(suppl 5): 558-65.
39. Kırkalı Z, Obek C. Clinical aspects of renal cell carcinoma. *EAU Update Series* 2003; 1: 189-96.
40. Hirata H, Hinoda Y, Matsuyama H. Polymorphisms of DNA repair genes are associated with renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 1058-62.
41. Dimarco DS, Lohse CM, Zincek H, Cheville JC, Blute ML. Long-term survival of patients with unilateral sporadic multifocal renal cell carcinoma according to histologic subtype compared with patients with solitary tumors after radical nephrectomy. *Urology* 2004; 64(3): 462-7.
42. Lang H, Lindler V, Martin M, Letourneaux H, Roy C, Saussine C. Prognostic value of multifocality on progression survival in localized renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2004; 45(6): 749-53.
43. Richstone L, Scherr DS, Reuter VR, Synder ME, Rabbani F, Kattan MW. Multifocal renal cortical tumors: Frequency associated clinicopathological features and impact on survival. *J Urol* 2004; 171(2Pt1): 615-20.
44. Cohen HT, Mc Govern FJ. Renal cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 8; 353(23): 2477-90.
45. Campbell SC, Fichter J, Novick AC: Intraoperative evaluation of renal cell carcinoma: A prospective study of the roles of ultrasonography and histopathological frozen sections. *J Urol* 1996a; 155: 1191-5.45.
46. Flocks RH, Kadeky MC. Malignant neoplasms of the kidney: an analysis of 353 patients followed five years or more. *J Urol* 1958; 79: 196-201.
47. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1969; 101: 297-301.
48. Harmer M. TNM classification of malignant tumors. Ed.3. Geneva: International Union Against Cancer 1974.
49. Hermanek P, Sobin LH. TNM classification malignant tumours. Ed 4. Berlin: Springer-Verlag 1987.

50. Sobin LH, Fleming ID. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. TNM classification of malignant tumors, fifth edition. *Cancer* 1997; 80: 1803-4.
51. Greene FL, Page D, Morrow M, editors. AJCC cancer staging manuel ed. 6. New York: Springer 2002.
52. Novick AC, Campbell SC. Renal Tumors. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editors. *Campbell's Urology*. Philadelphia: WB Saunders 2002; 2672-731.
53. Lee CT, Katz J, Feran PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinomaprovides prognostic information. *Urol Oncol* 2002; 7: 135-40.
54. Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guille F, Lobel B. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2003; 44: 226-32.
55. Anafarta MK, Yaman MÖ ed. *Campbell's Urology Eight Edition Türkçe çeviri*. Ankara, Güneş 2005; 2697-2698.46.
56. Gold PJ, Fefer A, Thompson JA. Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 1996; 14: 216-22.
57. Spirnak JP, Rubenstein RA. Hematuria In Resnick MI, Elder JS, Spirnak JP (eds): *Critical Decisions in Urology*, BC Decker Inc 2003.
58. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. Solid renal tumors: An analysis of pathological features related to tumor size. *J Urol* 2003; 170(6 Pt1): 2217-20.
59. Patard JJ, Dorey FJ, Cindolo L, Ficarra V, De La Taille A, Tostatin J. Symptoms as well as tumor size provide prognostic information on patients with lokalized renal tumors. *J Urol* 2004; 172(6 Pt1 of 2): 2167-71.
60. Russo P. Renal cell carcinoma: presentation, staging and surgical teatment. *Semin Onco* 2007; 27: 160-76.
61. Charboneau JW, Hattery RR, Ernst EC. Spectrum of sonographic findings in 125 renal masses other than benign simple cyst. *Am J Roentgenol* 1983; 140: 87-94.
62. Heidenreich A, Ravery V. European society of oncological Urology. Preoperative imaging in renal cell cancer. *World J Urol* 2004; 22: 307-15.
63. Catalona C, Fraioli F, Laghi A. High resolution multidetector CT in the preoperative evaluation of patients with renal cell carcinoma. *Am J Roentgenol* 2003; 180(5): 1271-7.
64. Sheth S, Scatarige JC, Horton KM, Fishman EK. Current concepts in the diagnosis and manegement of renal cell carcinoma: role of multidetector CT and three-dimensional CT. *Radiographics* 2001; 21: 237-54.
65. Walter C, Kruessel M, Gindele A. Imaging of renal lesions: evaluation fast MRI and helical CT. *Br J Radiol* 2003; 76(910): 696-703.

66. Hallscheidt P, Stolte E, Roeren T. The staging of renal cell carcinomas in MRI and CT-a prospective histologically controlled study. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bidgeb Verfahr* 1998; 168(2): 165-70.
67. Hricak H, Demas BE, Williams RD, Mc Namara ML, Hedgcock MW, Amparo EG, Tanagho EA. Magnetic resonance imaging in the diagnoses staging of renal and perirenal neoplasms. *Radiology* 1985; 154: 709-15.
68. Goldfarb DA, Novick AC, Long R. Magnetic resonance imaging for assessment of vena caval tumor thrombi: A comparative study with venacavography and computerized tomography scanning. *J Urol* 1990; 144: 1100-4.
69. Kalman DA, King BF, Hattery RR. Renal vein and inferior vena cava tumor thrombus in renal cell carcinoma: CT, US, MRI and venacavography. *J Comput Asist Tomogr* 1992; 16: 240-7.
70. Choyke PL. Detection and staging of renal cancer. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 1997; 5: 29-47.
71. Bechtold RE, Zagoria RI. Imaging approach to staging of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 1997; 24: 507-22.
72. Thomas DH, Verghese A, Kynaston HG, Griffiths DF. Analysis of the prognostic implications of different tumor margin types in renal cell carcinoma. *Histopathology* 2003; 43: 374-80.
73. Sobin LH. TNM classification of malignant tumours. Ed 6. New York: Wiley-Liss 2002; 193-5.
74. Karakiewicz PI, Lewinshtein DJ, Chun FK-H. Tumor size improves the accuracy of TNM predictions in patients with renal cancer. *Eur Urol* 2006; 50: 521-9.
75. Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol* 2006; 49: 798-805.
76. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 655-63.
77. Lang H, Lindler V, de Fromont M. Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma: assessment of 241 patients with >15 -years follow-up. *Cancer* 2005; 103: 625-9.
78. Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol* 2003; 170: 1742-6.
79. Bensalah K, Tostatin J, Vincendeau S. Prognostic significance of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171: 200-752.
80. Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun AS. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol* 2001; 166: 1611-23.
81. Ficarra V, Schips L, Guille F. Multiinstitutional European validation of the 2002 TNM staging system in conventional and papillary localized renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 968-74.

82. Kontak JA, Campbell SC. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 2003; 30: 467-80.
83. Bonsib SM. The renal sinus is the principal invasive pathway: a prospective study of 100 renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 1594-600.
84. Thompson RH, Leibovich BC, Cheville JC. Is renal sinus fat invasion the same as perinephric fat invasion for pT3a renal cell carcinoma? *J Urol* 2005; 174: 1218-21.
85. Murphy AM, Gilbert SM, Katz AE. Re-evaluation of the tumournode-metastasis staging of locally advanced renal cortical tumours: absolute size (T2) is more significant than renal capsular invasion (T3a). *BJU Int* 2005; 95: 27-30.
86. Siemer S, Lehmann J, Loch A. Current TNM classification of renal cell carcinoma evaluated: revising stage T3a. *J Urol* 2005; 173: 33-7.
87. Han KR, Bui MHT, Pantuck AJ. TNM T3a renal cell carcinoma: adrenal gland involvement is not the same as renal fat invasion. *J Urol* 2003;169: 899-903.
88. Ficarra V, Novara G, Iafrate M. Proposal for reclassification of the TNM staging system in patients with locally advanced (pT3-4) renal cell carcinoma according to the cancer-related outcome. *Eur Urol* 2007; 51: 722-31.
89. Ficarra V, Righetti R, Piloni S. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: retrospective analysis of 675 cases. *Eur Urol* 2002; 41: 190-8.
90. Moinzadeh A, Libertino JA. Prognostic significance of tumor thrombus level in patients with renal cell carcinoma and venous tumor thrombus extension: Is all T3b the same? *J Urol* 2004; 171: 598-601.
91. Zisman A, Wieder JA, Pantuck AJ. Renal cell carcinoma with tumor thrombus extension: biological the role of nephrectomy and response to immunotherapy. *J Urol* 2003; 169: 909-16.
92. Sevinc M, Kirkali Z, Yorukoglu K, Mungan U, Sade M. Prognostic significance of microvasculer invasion in localized renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2000; 38: 728-33.
93. Lang H, Lindler V, Saussine C, Havel D, Faure F, Jacqmin D. Microscopic venous invasion: a prognostic factor in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2000; 38: 600-5.
94. Bonsib SM, Gibson D, Mhoon M. Renal sinus involvement in renal cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 451-8.
95. Karakiewicz PI, Trinh Q-D, Bhojani N. Renal cell carcinoma with nodal metastases in the absence of distant metastatic disease: prognostic indicators of disease –specific survival. *Eur Urol* In pres.doi:10.1016/j.eururo.2006.12.015.
96. Pantuck AJ, Zisman A, Dorey F. Renal cell carcinoma with retroperitoneal lymph nodes: role of lymph node dissection. *J Urol* 2003; 169: 2076-83.
97. Pantuck AJ, Zisman A, Dorey F. Renal cell carcinoma with retroperitoneal lymph nodes. Impact on survival benefits of immunotherapy. *Cancer* 2003; 97: 2995-3002.

98. Terrone C, Cracco C, Porpiglia F. Reassessing the current TNM lymph node staging for renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2006; 49: 324-31.
99. Lohse CM, Cheville JC. A review of prognosticpathologic features and algorithms for patients treated surgically for renal cell carcinoma. *Clin Lab Med* 2005; 25: 433-64.
100. Amin MB, Tamboli P, Javidan J. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 281-91.
101. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisions of outcome and prognostic features among histological subtype of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 612-24.
102. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinomas: a multi-center experience. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2763-71.
103. Renshaw AA, Richie JP. Subtypes of renal cell carcinoma: different onset and sites of metastatic disease. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 539-49.
104. Motzer RJ, Bacik J, Mariani T, Russo P, Mazumdar M, Reuter V. Treatment outcome and survival associated with metastatic renal cell carcinoma of non-clear-cell histology. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2376-81.
105. Sanders ME, Mick R, Tomaszewski JE, Barr FG. Unique patterns of allelic imbalance distinguish type 1 from type 2 sporadic papillary renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 161: 997-1005.
106. Delahunt B, Eble JN, McCredie MR. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol* 2001; 32: 590-5.
107. Moch M, Gasser T, Amin MB. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer* 2000; 89: 604-14.
108. Chao D, Zisman A, Pantuck AJ. Collecting duct renal cell carcinoma: clinical study of a rare tumor. *J Urol* 2002; 167: 71-4.
109. Cangiano T, Liao J, Naitoh J. Sarcomatoid renal cell carcinoma: biologic behavior, prognosis and response to combined surgical resection and immunotherapy. *J Clin Oncol* 1999; 17: 523-8.
110. Goldenstein NS. The current state of renal cell carcinoma grading. *Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC)*. *Cancer* 1997; 80: 977-80.
111. Lam JS, Shvarts O, Said JV. Clinical pathological and molecular correlations of necrosis in the primary tumor of patients with renal cell carcinoma (abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 23: 416.
112. Palapattu GS, Pantuck AJ, Dorey F. Collecting system invasion in renal cell carcinoma: impact on prognosis and future staging strategies. *J Urol* 2003; 170: 768-72.

113. Bretheau D, Lechevallier E, Eghazarian C. Prognostic significance of incidental renal cell carcinoma. *Eur Urol* 1995; 27: 319-23
114. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB. Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. *J Urol* 2000; 163: 426-30.
115. Greene FL, Page D, Morrow M. editors, *AJCC Cancer Staging Manual*, 6th ed New York Springer 2002.
116. Gelb AB. Renal cell carcinoma: Current prognostic factors. Union Internationale Centre le and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997; 80: 981-6.
117. Srigley JR, Hutter RV, Gelb AB. Current prognostic factors – renal cell carcinoma: Workgroup no.4. Union Internationale Centre le and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997; 80: 994-6.
118. Bensalah K, Tostain J, Vincendeau S. Prognostic significance of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171: 200-752.
119. Stauffer MH. Nephrogenous hepatosplenomegaly. *Gastroenterology* 1961; 40: 694.
120. Giannnakos G, Papanicolaou X, Trafalis D. Stauffer's syndrome variant associated with renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2005; 12: 757-9.
121. Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005.
122. Kirkali Z, Van Poppel H. Developments in organ preserving treatments for renal cell cancer: Open Surgery. *Eur Urol* 2004; 3: 9-13.
123. Kirkali Z. Limits of cure by surgery in renal cell carcinoma. In Kurth KH, Mickisch GH, Schoeder FH eds, *Renal, Bladder and Prostate Cancer, an Update*. Bath: Parthenon Publishing Group 1999: 15-22.
124. Tsui KH, Shvarts O, Barbaric Z. Is adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? UCLA experience with 511 radical nephrectomies. *J Urol* 2000; 163: 437-41.
125. Campbell CM, Middleton RG, Rigby OF. Adrenal metastasis in renal cell carcinoma. 1983; 21: 403-5.
126. Shalev M, Cipolla B, Gtille F. Is ipsilateral adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? *J Urol* 1995; 153: 1445.
127. Kuczyk M, Munch T, Machtens S. The need for routine adrenalectomy during surgical treatment for renal cell cancer: the Hannover experience. *BJU Int* 2002; 89: 517-22.
128. Kuczyk M, Wegener G, Jonas U. The therapeutic value of adrenalectomy in case of solitary metastatic spread originating from primary renal cell cancer. *Eur Urol* 2005; 48: 252-7.
129. Kirkali Z, Van Poppel H, Tuzel E. A prospective survey of surgical approaches in clinically localized renal cell carcinoma preliminary attempt at surgical quality control. *Urooncology* 2002; 2(4): 169-74.

130. Minervini A, Lilas H, Morelli G. Regional lymph node dissection in the treatment of renal cell carcinoma: is it useful in patients with no suspected adenopathy before or during surgery? *BJU Int* 2001; 88(3): 169-72.
131. Fergany AF, Saad IR, Wood L, Novick AC. Open partial nephrectomy for tumor in a solitary kidney: Experience with 400 cases. *J Urol* 2006 discussion 1633; May;175(5):1630-3.
132. Fergany AF, Hafez KS, Novick AC. Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year follow-up. *J Urol* 2000; 163(2): 442-5.
133. Herr HW. Partial nephrectomy for unilateral renal cell carcinoma and a normal contralateral kidney:10-year follow-up. *J Urol* 1999; 161(1):33-4;discussion 34-5.
134. Lau WK, Blute ML, Weaver AL, Torres VE, Zincke H. Matched comparison of radical nephrectomy vs nephron-sparing surgery in patients with unilateral renal cell carcinoma and a normal contralateral kidney. *Mayo Clin Proc* 2000; 75(12): 1236-42.
135. Lee CT, Katz J, Shi W, Thaler HT, Reuter VE, Russo P. Surgical management of renal tumor 4 cm or less in a contemporary cohort. *J Urol* 2000; 163(3): 730-6.
136. D'Armiento M, Damiano R, Feleppa B, Perdoni S, Oriani G, DeSio M. Elective conservative surgery for renal cell carcinoma versus radical nephrectomy: A prospective study. *Br J Urol* 1997; 79(1): 15-9.
137. Lerner SE, Hawkins CA, Blute ML, Grabner A, Wollan PC, Eickholt JT. Disease outcome in patients with low stage renal cell carcinoma treated with nephron-sparing or radical surgery. *J Urol* 1996; 155(6): 1868-73.
138. Hafez KS, Fergany AF, Novick AC. Nephron-sparing surgery for localized renal cell carcinoma: Impact of tumor size on patient survival, tumor recurrence and TNM staging. *J Urol* 1999; 162(6): 1930-3.
139. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. Nephron sparing surgery for appropriately selected selected renal cell carcinoma between 4 and 7 cm results in outcome similar to radical nephrectomy. *J Urol* 2004; 171(3): 1066-70.
140. Patard JJ, Shvarts O, Lam JS, Pantuck AJ, Kim HL, Ficarra V, et al. Safety and efficacy of partial nephrectomy for all T1 tumors based on an international multicenter experience. *J Urol* 2004; 171(6Pt1): 2181-5,quiz 2435.
141. Becker F, Siemer S, Hack M, Hack M, Humke U, Ziegler M, Stockle M. Excellent long-term cancer control with elective nephron-sparing surgery for selected renal cell carcinomas measuring more than 4 cm. *Eur Urol* 2006; 49(6): 1058-63; discussion 1063-4.
142. Hegarty NJ, Gill IS, Desai MM, Remer EM, O'Malley CM, Kaouk JH. Probe-ablative nephron-sparing surgery: Cryoablation versus radiofrequency ablation. *Urology* 2006; 68(1 Suppl): 7-13.

143. Schwartz BF, Newcastle JC, Powell T, Whelan C, Manny GT Jr, Vestal JC. Cryoablation of small peripheral renal masses: a retrospective analysis. *Urology* 2006; 68(1 Suppl): 14-8.
144. Permpongkosol S, Lind RE, Solomon SB, Kavoussi LR. Result of computerized tomography guided percutaneous ablation of renal masses with nondiagnostic pre-ablation pathological findings. *J Urol* 2006; 176(2): 463-7; discussion 467.
145. Hegarty N, Gill I, Kaouk JH, Spaliviero M, Desai M, Novick AC, Remer E. Renal cryoablation: 5-year outcomes. *J Urol* 2006; 175; 351.
146. McDougal WS, Gervais DA, McGovern FJ, Mueller PR. Long term follow-up of patients with renal cell carcinoma treated with radiofrequency ablation with curative intent. *J Urol* 2005; 174(1): 61-3.
147. Gervais DA, McGovern FJ, Arellano RS, McDougal WS, Mueller PR. Renal cell carcinoma: Clinical experience and technical success with radiofrequency ablation of 42 tumors. *Radiology* 2003; 226(2): 417-24.
148. Varkarakis IM, Ellaf ME, Inaki T, Bhayani SB, Chan DY, Su LM, et al. Percutaneous radiofrequency ablation of renal masses: Results at a 2 year mean follow-up. *J Urol* 2005; 174(2): 456-60; discussion 460.
149. Ljungberg B, Landberg G, Alamdari FI. Factors of importance for prediction of survival in patients with metastatic renal cell carcinoma, treated with or without nephrectomy. *Scand J Urol Nephrol* 2000; 34: 246-51.
150. Flanigan RC, Mickisch G, Slyvester R. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: A combined analysis. *J Urol* 2004; 171: 1071-6.
151. Mosharafa A, Koch M, Shalhav A. Nephrectomy for metastatic renal cell carcinoma: Indiana University experience. *Urology* 2003; 62: 636-40.
152. Rackley R, Novick A, Klein E. The impact of adjuvant nephrectomy on multimodality treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 1994; 152: 1399-403.
153. Stadler WM, Huo D, George C, Yang X, Ryan CW, Karrison T, Zimmerman TM, Vogelzang NJ. Prognostic factors for survival with gemcitabine plus 5-fluorouracil based regimens for metastatic renal cancer. *J Urol* 2003; 170: 1141-5.
154. Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard YJ, Savary J, Chevreau C, et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa 2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie. *N Eng J Med* 1998; 338: 1272-8.
155. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody for metastatic renal cancer. *N Eng J Med* 2003; 349: 427-34.
156. Patel PH, Chaganti RS, Motzer RJ. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2006 Feb 7.
157. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, et al. Activity of SU11248 a multitargeted inhibitor of vascular endothelial

- growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 16-24.
158. Rodriguez A, Sexton WJ. Management of locally advanced renal cell carcinoma. *Cancer Control* 2006; 13: 199-210.
 159. Rini BI. Current status and future directions of molecular markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 2006; 16: 332-6.
 160. Klatte T, Seligson DB, LaRochelle J. Molecular signatures of localized clear cell renal carcinoma to predict disease free survival after nephrectomy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 894-900.
 161. Hershey AD, Krause JE. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science* 1990; 247: 958-62.
 162. Maggi CA. Principles of tachykinergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regul Pept* 2000; 93: 53-64.
 163. Weinstock JV. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis *mansoni* produce substance P. *J Immunol* 1988; 141: 961-6.
 164. Killingsworth CR. Rat alveolar macrophages express preprotachykinin gene-I mRNA-encoding tachykinins. *Am J Physiol* 1997; 273: L1073-L1081.
 165. Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev* 1983; 35: 85-141.
 166. Lordal M. Tachykinins increase vascular permeability in the gastrointestinal tract of the rat. *Acta Physiol Scand* 1996; 156: 489-94.
 167. Parma J, Duprey L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mochel J, et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 1993; 365: 649-51.
 168. Castagliuolo I, Valenick L, Liu J, Pothoulakis C. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates substance P – induced mitogenic responses in U-373 MG cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 2645-50.
 169. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 1997; 16: 7032-44.
 170. Koon HW, Zhao D, Na X, Moyer MP, Pothoulakis C. Metalloproteinases and transforming growth factor- α mediate substance P induced mitogen activated protein kinase activation and proliferation in human Colonocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 45519-27.
 171. Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande SV, Wang L, et al. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest* 2003; 83: 731-42.
 172. Palma C, Nardelli F, Manzini S, Maggi CA. Substance P activates responses correlated with tumor growth in human glioma cells line bearing tachykinin NK1 receptors. *Br J Cancer* 1999; 79: 236-43.
 173. Munoz M, Perez A, Covenas R, Rosso M, Castro E. Antitumoural action of L733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines. *Arch Ital Biol* 2004; 142: 105-12.

174. Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascon P, Maloof PB, et al. Increased expression preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci* 2000; USA 97: 388-93.
175. Sitohy B, El Salhy M. Changes in the colonic enteric nervous system in rats with chemically induced colon dysplasia and carcinoma. *Acta Oncol* 2002; 41: 543-49.
176. Luo W, Sharif TR, Sharif M. Substance P induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen activated protein kinase signalling pathway. *Cancer Res* 1996; 56: 4983-91.
177. Sharif TR, Luo W, Houghron PJ, Sharif M. Substance K peptide induces mitogenesis by activating the mitogen activated protein kinase signalling pathway through the substance P receptor (NK-1 subtype) in human astrocytoma. *Cell Pharmacol* 1996; 3: 441-9.
178. Munoz M, Rosso M, Covenas R, Soult JA. Antitumoural action of neurokinin-1 receptor antagonists on human brain cancer cell lines. In: *Brain Cancer: Therapy and Surgical Interventions* 2006 (in press).
179. Lang K, Drell TL, Lindecke A, Niggemann B, Kaltschmidt C, Zaenker KS, Entschladen F. Induction of a metastogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs . *Int J Cancer* 2004; 112: 231-8.
180. Skidgel RA, Erdos EG. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow ups to early studies. *Peptides* 2004; 25(3): 521-5.
181. Fahrenholz F, Postina R. Alpha secretase activation – an approach to Alzheimer's disease therapy. *Neurodegener Dis* 2006; 3 (4-5): 255-61.
182. Yu A, Hewitt R, Connor E, Stetler-Stevenson W. Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Drugs Aging* 1997; 11: 229-44.
183. Erin N, Boyer PJ, Bonneau RH, Clawson GA, Welch DR. Capsaicin mediated denervation of sensory neurons promotes mammary tumor metastasis to lung and heart. *Anticancer Res* 2004; 24 (2B): 1003-9.
184. Chang MM. Amino-acid sequence of substance P. 1971.
185. Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji* 2000.
186. O'Connor TM. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 2004; 201.2: 167-80.
187. Koon HW, Pothoulakis C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1088: 23-40.
188. De Swert, Joss KO, Joos GF. Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur J Pharmacol* 2006; 533.1-3: 171-81.
189. Marshall KW. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels 1990.

190. Blackshaw LA, Dent J. Lower oesophageal sphincter responses to noxious oesophageal chemical stimuli in the ferret: involvement of tachykinin receptors. *J Auton Nerv Syst* 1997; 66.3: 189-200.
191. Pawlik WW. Role of tachykinins in the control of pancreatic secretion and circulation. *J Physiol Pharmacol* 1992; 43.1: 43-57.
192. Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol* 1983; 131: 1613-5.
193. Goso C, Potier E, Manzini S, Szallasi A. Comparison of tachykinin NK1 receptors in human IM9 and U373 MG cells, using antagonist (FK888, +/-) – CP-96,345, and RP 67580) binding. *Eur J Pharmacol* 1994; 254: 221-7.
194. Hahn WC, Weinberg RA. Mechanisms of disease: rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347: 1593-603.
195. Seegers HC, Hood VC, Kidd BL, Cruwys SC, Walsh DA. Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptors during neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(1): 8-12.
196. Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF- α gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 1993; 150: 4478-85.
197. Wiedermann CJ, Auer B, Sitte B, Reinisch N, Schratzberger P, Kahler CM. Induction of endothelial cell differentiation into capillary like structures by substance P. *Eur J Pharmacol* 1996; 298: 335-8.
198. Walsh D, Hu D, Mapp P, Polak J, Blake D, Fan T. Innervation and neurokinin receptors during angiogenesis in the rat sponge granuloma. *Histochemical J* 1996; 28: 759-69.
199. Heasley L. Autocrine and paracrine signalling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene* 1996; 20: 1563-9.
200. Rosati R, Adil M, Ali M, Eliason J, Orosz A, Sebestyen F, Kalemkerian G. Induction of apoptosis by a short chain neuropeptide analog in small cell lung cancer. *Peptides* 1998; 19: 1519-23.
201. Chorny A. Signaling mechanisms of vasoactive intestinal peptide in inflammatory conditions. *Regul Pept* 2006; 137.1-2: 67-74.
202. Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev* 2004; 56.2: 249-90.
203. Said SI. Vasoactive intestinal peptide. *J Endocrinol Invest* 1986; 9.2: 191-200.
204. Harmar AJ. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* 1998; 50.2: 265-70.
205. Ishihara T. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 1992; 8.4: 811-9.
206. Delgado M. Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1996; 68.1-2: 27-38.

207. Gourlet P. Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists. *Peptides* 1997; 18.10: 1539-45.
208. Usdin TB, Bonner TI, Mezey E. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 1994; 135.6: 2662-80.
209. Reubi JC. In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Ann NY Acad Sci* 2000; 921: 1-25.
210. Larsson LT, Sundler F. Is the reduction of VIP the clue to the pathophysiology of Hirschsprung's disease? *Z Kinderchir* 1990; 45.3: 164-6.
211. Pozo D, Delgado M. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? *FASEB J* 2004; 18.12: 1325-34.
212. Gonzalez C, Barroso C, Martin C, Gulbenkin S, Estrada C. Neuronal nitric oxide synthase activation by vasoactive intestinal peptide in bovine cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 977-84.
213. Haegerstrand A, Jonzon B, Dalsgaard CJ, Nilsson J. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5993-6.
214. Rayan GM, Johnson C, Pitha J, Cahill S, Said S. Vasoactive intestinal peptide and nerve growth factor effects on nerve regeneration. *J Okla State Med Assoc* 1995; 88: 337-41.
215. Ogasawara M, Murata J, Ayukawa K, Saiki I. Differential effect of intestinal neuropeptides on invasion and migration of colon carcinoma cells in vitro. 1997.
216. Brain SD. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 1985; 313.5997: 54-6.
217. Rosenfeld MG. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 1983; 304.5922: 129-35.
218. McCulloch J. Calcitonin gene-related peptide: functional role in cerebrovascular regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83.15: 5731-5.
219. Poyner DR. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev* 2003; 54.2: 233-46.
220. Arulmani U. Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *Eur J Pharmacol* 2004; 500.1-3: 315-30.
221. Hara M, Toyoda M, Yaar M. Innervation of melanocytes in human skin. *J Exp Med* 1996; 184: 1385-95.
222. Niizeki H, Alard P, Streilein JW. CGRP is necessary for ultraviolet B-impaired induction of contact hypersensitivity. *J Immunol* 1997; 159: 5183-6.
223. Mazzocchi G, Malendowicz L, Ziolkowska A, Spinazzi R, Rebuffat P, Aragona F, et al. Adrenomedullin (AM) and AM receptor type 2 expression is upregulated in prostate carcinomas (PC), and AM stimulates in vitro growth of

- a PC-derived cell line by enhancing proliferation and decreasing apoptosis rates. *Int J Oncol* 2004; 25: 1781-7
224. Offley S, Guo T, Wei T, Clark J, Voel H, Lindsey D, Jacobs C, et al. Capsaicin sensitive sensory neurons contribute to the maintenance of trabecular bone integrity. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 257-67.
 225. Schwartz JC. Enkephalinase, a newly characterised dipeptidyl carboxypeptidase: properties and possible role in enkephalinergic transmission. 1980.
 226. Shipp MA. CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. 1991.
 227. Papandreou CN. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. 1998.
 228. Dai J, Shen R, Sumimoto M, Goldberg JS, Geng Y, Navarro D, et al. Tumor suppressive effects of neutral endopeptidase in androgen independent prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1370-7.
 229. Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, et al. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen independent progression. *Nat Med* 1998; 4: 50-7,
 230. Letarte M. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. 1988.
 231. Howell S. Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid (1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. 1995.
 232. Bunnett NW. Distribution and abundance of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in the alimentary tract of the rat. *Am J Physiol* 1993; 264.3 Pt 1: G497-G508.
 233. Oefner C. Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; 60.Pt 2: 392-6.
 234. Gohring B, Holzhausen HJ, Meye A, Heynemann H, Rebmann U, Langner J, Riemann D. Endopeptidase 24.11/CD10 is downregulated in renal cell cancer. *Int J Mol Med* 1998; 2: 409-14.
 235. Koiso K, Akaza H, Ohtani M, Miyanaga N, Aoyagi K. A new tumor marker for bladder cancer. *Int J Urol* 1994; 1: 33-6.
 236. Shipp M, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 1993; 84: 1052-70.
 237. Bunn PA Jr, Helfrich BA, Brenner DG, Chan DC, Dykes DJ, Cohen AJ, Miller YE. Effects of recombinant neutral endopeptidase(EC3.4.24.11) on the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 1998; 4(11): 2849-58.
 238. Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, et al. CD10/NEP hydrolyzes bombesin like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10662-6.

239. Chu P, Arber DA. Paraffin section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2000; 113; 374-82.
240. Holm-Nielsen P, Pallesen G. Expression of segment specific antigens in the human nephron differentiation molecules and in renal epithelial tumors. *APMIS Suppl* 1988; 4: 48-55.
241. Avery AK, Beckstead J, Renshaw AA, Corless CL. Use of antibodies RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms. *Am J Surgical Pathol* 2000; 24: 203-10.
242. Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. CD10 is a diagnostic and prognostic marker in renal malignancies. *Histopathology* 2004; 45: 460-7.
243. Wolfsberg TG. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol* 1995; 169.1: 378-83.
244. Schlondorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 21): 3603-17.
245. Black RA. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997; 385.6618: 729-33.
246. Yoshimura T. ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa. *J Infect Dis* 2002; 185.3: 332-40.
247. Erin N. Capsaicin-induced inactivation of sensory neurons promotes a more aggressive gene expression phenotype in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 99.3: 351-64.
248. Mullberg J. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. 2000.
249. DeClerck YA. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36.10: 1258-68.
250. Fambrough D, Pan D, Rubin GM, Goodman CS. The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(23): 1323-38.
251. Erin N, Zhao W, Bylander J, Chase G, Clawson G. Capsaicin induced inactivation of sensory neurons promotes a more aggressive gene expression phenotype in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 99: 351-64.
252. Fritzsche FR, Wassermann K, Jung M, Tölle A, Kristiansen I, Lein M, et al. ADAM9 is highly expressed in renal cell cancer and is associated with tumor progression. *BMC Cancer* 2008; 8: 179.
253. Roemer A, Schwetmann L, Jung M, Roigas J, Kristiansen G, Schnorr D, et al. Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome. *Oncol Rep* 2004; 11(2): 529-36.

254. Carter TL, Pedrini S, Ghiso J, Ehrlich ME, Gandy S. Brain neprilysin activity and susceptibility to transgene-induced Alzheimer amyloidosis. *Neurosci Lett* 2006; 392: 235-9
255. Roemer A, Schwettmann L, Jung M, Stephan C, Roigas J, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Lichtinghagen R, Jung K. The membrane proteases adams and hepsin are differentially expressed in renal cell carcinoma. Are they potential tumor markers? *The Journal of Urology* 2004; 172 (6Pt 1): 2162-6.
256. Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, Jung K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real time PCR. *BMC Molecular Biology* 2007; 8: 47.
257. Di Sant'Agnese PA. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Cancer Philadelphia* 1995; 75: 1850-9.
258. Cohen AJ, Bunn PA, Franklin W, Magill-Solc C, Hartmann C, Helfrich B, et al. Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide induced calcium influx. *Cancer Res* 1996; 56: 831-9.
259. Pekonen F, Nyman T, Ammala M, Rutanen EM. Decreased expression of messenger RNAs encoding endothelin receptors and neutral endopeptidase 24.11 in endometrial cancer. *Br J Cancer* 1995; 71: 59-63.
260. Sato Y, Itoh F, Hinoda Y, Ohe Y, Nagawa N, Ueda R, et al. Expression of CD10/neutral endopeptidase in normal and malignant tissues of the human stomach and colon. *J Gastroenterol* 1996; 31: 12-7.
261. Stattin P, Damber JE, Karlberg L, Bergh A. Cell proliferation assessed by ki-67 immunoreactivity on formalin fixed tissues is a predictive factor for survival in prostate cancer. *J Urol* 1997;157: 219-22.
262. Sumimoto M, Shen R, Goldberg JS, Dai J, Navarro D, Nanus DM. Neutral endopeptidase promotes phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting neuropeptide-induced protein kinase C delta degradation. *Cancer Res* 2000; 60: 6590-6.
263. Jung SM, Kuo TT. Immunoreactivity of CD10 and inhibin alpha in differentiating hemangioblastoma of central nervous system from metastatic clear cell renal carcinoma. *Modern Pathol* 2005; 18: 788-94.
264. MacKinnon AC, Armstrong RA, Waters CM, Cummings J, Smyth JF, Haslett C, Sethi T. (Arg6,D-Trp7,9,NmePhe8)-Substance P (6-11) activates JNK and induces apoptosis in small cell lung cancer cells via an oxidant-dependent mechanism. *Br J Cancer* 1999; 80(7): 1026-34
265. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988; 24(3) :739-68.
266. Holzer P. Implications of tachykinins and calcitonin gene related peptide in inflammatory bowel disease. *Digestion* 1998; 59(4): 269-83.

267. Palma C, Bigioni M, Irrisuto C, Nardelli F, Maggi CA, Manzini S. Antitumor activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cancer* 2000; 82(2): 480-7.
268. Mori Y, Cai K, Cheng Y, Wang S, Paun B, Hamilton JP, et al. A genome wide search identifies epigenetic silencing of somatostatin , tachykinin-1 and 5 other genes in colon cancer. *Gastroenterology* 2006;131(3): 797-808.
269. Manske JM, Hanson SE. Substance P mediated immunomodulation of tumor growth in a murine model. *Neuroimmunomodulation* 2005; 12 (4): 201-10.
270. Cairns RA, Khokha R, Hill RP. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr Mol Med* 2003; 3(7): 659-71.
271. MacKinnon AC, Waters C, Jodrell D, Haslett C, Sethi T. Bombesin and substance P analogues differentially regulate G-protein coupling to the bombesin receptor. Direct evidence for biased agonism. *J Biol Chem* 2001; 276(30): 28083-91.
272. Hallberg M, Nyberg F. Neuropeptide conversion to bioactive fragments – an important pathway in neuromodulation. *Curr Protein Pept Sci* 2003; 4(1): 31-44.
273. Hornfeldt CS, Sun X, Larson AA. The NH-2 terminus of substance P modulates NMDA induced activity in the mouse spinal cord. *J Neurosci* 1994; 14(5 Pt 2): 3364-9.
274. Sakurada C, Watanabe C, Sakurada T. Occurrence of substance P and its antinociceptive activity at the mouse spinal cord level. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004; 26(3): 171-6.
275. Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Rocken C. The disintegrin–metalloproteinases ADAM9, ADAM12 and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *International Journal of Oncology* 2005; 26(1): 17-24.
276. Hirao T, Nanba D, Tanaka M, Ishiguro H, Kinugasa Y, Doki Y, et al. Overexpression of ADAM9 enhances growth factor mediated recycling of E-cadherin in human colon cancer cell line HT29 cells. *Experimental Cell Research* 2006; 312(3): 331-9.
277. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Dahl E, et al. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prgnostic markers for patient survival. *The Journal of Pathology* 2005; 205(3): 359-76.
278. Karan D, Lin FC, Bryan M, Ringel J, Moniax N, Lin MF, Batra SK. Expression of ADAMs and TIMP-3 in human prostatic adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2003; 23(5): 1365-71.
279. O'Shea C, McKie N, Buggy Y, Duggan C, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Expression of ADAM9 mRNA and progtein in human breast cancer. *Int J Cancer* 2003; 105(6): 754-61.

280. Zigrino P, Mauch C, Fox JW, Nischt R. Adam-9 expression and regulation in human skin melanoma and melanoma cell lines. *Int J Cancer* 2005; 116(6): 853-9.
281. Gutwein P, Schramme A, Sinke N. Tumoral CXCL16 expression is a novel prognostic marker of longer survival times in renal cell cancer patients. *Eur J Cancer* 2009; 45: 478-89.
282. Khawam K, Giron-Michel J, Gu Y. Human renal cancer cells express a novel membrane bound interleukin-15 that induces, in response to the soluble interleukin 15 receptor alpha chain, epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res* 2009; 69: 1561-9.
283. Mazzocca A, Coppari R, De Franco R, Cho JY, Libermann TA, Pinzani M, Toker A. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 2005; 65(11): 4728-38.
284. Arribas J, Bech-Serra JJ, Santiago-Josefat B. ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(1): 57-68.
285. Trochon-Joseph V, Martel Renoir D, Mir LM, Thomaidis A, Opolon P, Connault E, Li H, et al. Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin. *Cancer Res* 2004; 64(6): 2062-9.