

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MESANE KANSERİNDE 20q11-13 BÖLGESİ
HETEROZİGOTLUK KAYBI ANALİZİ**

**BIYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

CEYDA UYAR

Ocak 2014

OCAK, 2014

Yüksek Lisans Tezi - Biyoloji Bölümü

CEYDA UYAR

Mesane Kanserinde 20q11-13 Bölgesi Heterozigotluk Kaybı Analizi

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN

Ceyda UYAR

Ocak 2014

© 2014 [Ceyda UYAR]

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Mesane Kanserinde 20q11-13 Bölgesi Heterozigotluk Kaybı Analizi

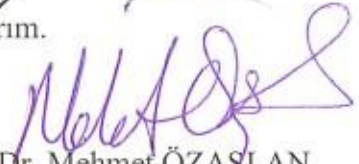
Öğrencinin, Adı Soyadı: Ceyda UYAR

Tez Savunma Tarihi: 06/01/2014

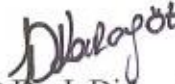
Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Doç.Dr. Metin BEDİR
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylıyorum.


Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımca (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Yrd.Doç.Dr. I. Didem KARAGÖZ
İkinci Tez Danışmanı


Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN

Doç.Dr. Sakıp ERTURHAN

Doç.Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Doç.Dr. Abuzer ÇELEKLİ

Doç.Dr. İbrahim Halil KILIÇ

İmzası











İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Ceyda UYAR

ABSTRACT

ANALYSIS OF LOSS OF HETEROZYGOSITY OF 20q11-13 REGION IN BLADDER CANCER

UYAR, Ceyda

M.Sc. in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

January 2014

75 pages

Bladder cancer is one of the most common solid epithelial cancers and is the third most common cancer among men in Turkey. It has heterogeneous histopathology and growth properties. It has been suggested that multiple pathways, all including multistep genetic alterations are involved in the development of bladder tumors. Molecular pathology of bladder cancers has shown considerable heterogeneity, including loss of heterozygosity (LOH) and deletions in many chromosomes. Aim of present study was to identify the loss of heterozygosity of 20q11-13 and to compare with the tumor grades and stages.

9 polymorphic microsatellite markers in 33 matched bladder normal and tumor tissues were used to identify the loss of heterozygosity of 20q11-13. LOH in 17 of 33 patients (51,5%) at least in one loci was determined. The highest frequency of LOH was found on D20S872 (30%) loci. The lowest frequency of LOH was on D20S465 (5%) loci and LOH on D20S443 loci was not detected. Also no statistically significant association between tumor grades and stages and LOH frequency ($p>0,05$) were found.

Key Words: Bladder cancer, Chromosome 20, Loss of Heterozygosity.

ÖZET

MESANE KANSERİNDE 20q11-13 BÖLGESİ
HETEROZİGOTLUK KAYBI ANALİZİ

UYAR, Ceyda

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Ocak 2014

75 sayfa

Mesane kanseri en yaygın görülen solid tümörlerden birisidir ve ülkemizde erkeklerde en sık görülen kanserler arasında 3. sırada yer almaktadır. Mesane kanseri heterojen histopatolojiye ve büyüme özelliklerine sahiptir. Mesane tümörlerinin gelişiminde çok aşamalı genetik değişiklikleri içeren çeşitli oluşum mekanizmalarının rol oynadığı düşünülmektedir. Mesane kanserlerinin moleküler patolojisi birçok kromozomda meydana gelen heterozigotluk kayıplarını (LOH) ve delesyonları içeren oldukça geniş bir heterojenite göstermektedir. Bu çalışmada mesane kanserli hastalarda 20q11-13 bölgesinin heterozigotluk kayıplarını belirlemek ve bu kayıpların tümör derece ve evresiyle ilişkili olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

20q11-13 bölgesindeki heterozigotluk kaybını tespit etmek için 33 mesane tümör ve normal dokusunda karşılaştırmalı olarak 9 polimorfik mikrosatellit markır kullanılmıştır. 33 hastanın 17'sinde (%51,5) en az bir bölgede heterozigotluk kaybı tespit edilmiştir. En yüksek LOH frekansı D20S872 (%30) lokusunda saptanmıştır. En düşük LOH frekansı (%5) D20S465 lokusunda saptanmış olup D20S443 lokusunda ise LOH saptanmamıştır. Tümör patolojik evresi ve derecesi ile LOH frekansı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p > 0,05$).

Anahtar Kelimeler: Mesane Kanseri, 20. Kromozom, Heterozigotluk Kaybı.

Rahmetli babamın anısına.....

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden beri maddi ve manevi tüm desteğiyle yanımda olan sadece ders de değil hayatı öğrenmemde de danışman hocam olan; özellikle çalışmam boyunca engin bilgisini ve emeğini benden esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN' a;

Eğitim hayatımdaki en büyük destekçilerimden biri olan ve eğer bir aşama kaydettiysen bunda en çok emeği geçenlerden biri olan değerli hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Işık Didem KARAGÖZ' e;

Tez çalışmalarım döneminde büyük destek sağlayan, her türlü laboratuvar imkanını bana sunan değerli hocam Doç.Dr. İbrahim Halil KILIÇ' a;

Laboratuvar çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç.Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER' e;

Tez çalışması için gerekli doku örneklerinin toplanmasında yardımlarını benden esirgemeyen Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç.Dr. Sakıp ERTURHAN' a, Arş.Gör.Dr. Gökhan URGUN' a ve Arş.Gör.Dr. Erkan SADIÖĞLU' na;

Laboratuvar çalışmaları döneminde desteğini ve emeğini benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Dilan ALBARAWİ'ye;

Tez çalışmam süresince benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ahmet ÇAKMAK, İzzettin GÜLER ve Mehmet ERDEM' e;

Tez çalışmam süresince teknik destek konusunda bilgi ve becerisini yılmadan benimle paylaşan değerli arkadaşım Selçuk KÖK'e;

Tez yazım aşamasında emeğini benden esirgemeyen değerli arkadaşım Mustafa SEVİNDİK' e;

Bu çalışmada FEF.12.03 nolu proje ile maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi BAP Yönetim Birimine;

Hayata gözlerimi açtığım ilk günden bu zamana kadar her anımda bana o büyük karşılıksız sevgisini, emeğini ve sabrını sunan vazgeçilmezim ANNEME;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	v
ÖZET.....	vi
İTHAF	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	xvi
BÖLÜM I GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser Oluşum Mekanizmaları.....	2
1.1.1. Kanserın Çift- Vuruş Orijini.....	5
1.1.2. Heterozigotluk Kaybı (LOH).....	6
1.2. Mesane.....	8
1.2.1. Mesane Embriyolojisi.....	8
1.2.2. Mesane Anatomisi.....	8
1.2.3. Mesane Histolojisi.....	9
1.2.3.1. Ürotelyum.....	10
1.2.3.2. Lamina Propria.....	11
1.2.3.3. Muskularis Propria.....	12
1.2.3.4. Adventisya/Seroza.....	12
1.3. Mesane Kanseri.....	12
1.3.1. Epidemiyoloji.....	12
1.3.2. Etyoloji ve Risk Faktörleri.....	14
1.3.2.1. Sigara.....	14
1.3.2.2. Mesleki Faktörler.....	14
1.3.2.3. Enfeksiyon ve Enflamasyon.....	15
1.3.2.4. İlaçlar ve Radyoterapi.....	15

1.3.2.5. Gıda Maddeleri.....	15
1.3.3. Patogenez.....	16
1.3.3.1. Normal Mesane Ürotelyumu.....	16
1.3.3.2. Epitelyal Hiperplazi ve Metaplazi.....	16
1.3.3.3. Ürotelyal Displazi.....	16
1.3.3.3.1. Preneoplastik Proliferatif Anormallikler.....	16
1.3.3.3.2. Displazi.....	16
1.3.3.3.3. Inverted Papilloma.....	17
1.3.3.3.4. Vezikal Lökoplaki.....	17
1.3.3.3.5. Psödosarkom (Postoperatif İğ Hücreli Nodül).....	17
1.3.3.4. Ürotelyal Karsinom.....	17
1.3.3.4.1. Karsinoma In Situ.....	17
1.3.3.4.2. Transizyonel Hücreli Karsinom.....	17
1.3.3.4.3. Skuamoz Hücreli Karsinom.....	18
1.3.3.4.4. Adenokarsinoma.....	18
1.3.4. Evreleme ve Derecelendirme.....	19
1.3.4.1. Evreleme.....	19
1.3.4.2. Derecelendirme.....	20
1.3.4.2.1. Papilloma (Derece 0 / G0).....	21
1.3.4.2.2. İyi Differansiye Tümörler (Düşük derece / G1).....	21
1.3.4.2.3. Orta Derecede Diferansiye Tümörler (G2).....	22
1.3.4.2.4. Kötü Diferansiye Tümörler (Yüksek derece /G3).....	22
1.3.5. Mesane Kanseri Tümör Belirteçleri.....	23
1.3.6. Mesane Kanserinde Moleküler Süreçler.....	25
1.3.6.1. Kromozomların Sayısal ve Yapısal Anomalileri.....	25
1.3.6.2. DNA Dizilim Anomalileri.....	27
1.3.6.3. Mikro-RNA Regülasyon Kaybı.....	28
1.3.6.4. Mesane Kanserinde Epigenetik Değişiklikler.....	29
1.4. Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları.....	30
BÖLÜM II KAYNAK ÖZETLERİ.....	32
BÖLÜM III MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	36
3.1. MATERYAL.....	36
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	36

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar	37
3.2. YÖNTEM.....	38
3.2.1. Doku Örneklerinin Toplanması ve DNA İzolasyonu.....	38
3.2.2. PCR Amplifikasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	39
3.2.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	41
3.2.3.1. Cihazın Hazırlanması.....	41
3.2.3.2. Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Yüklenmesi.....	42
3.2.4. Gümüş Boyama ile DNA Bantlarının Görünür Hale Getirilmesi.....	42
3.2.5. Verilerin İstatiksel Analizi.....	43
BÖLÜM IV BULGULAR.....	44
4.1. Örnek Doku Alınan Hastaların Demografik ve Patolojik Bulguları.....	44
4.1.1. Hastaların Demografik Bilgileri.....	44
4.1.2. Hastaların Patolojik Bulguları.....	45
4.2. İzole Edilen DNA' ların Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları.....	45
4.3. Mikrosatellit Markırlar Kullanılarak Yapılan PCR Sonuçları.....	47
4.4. Heterozigotluk Kaybıyla (LOH) İlişkili Bulgular.....	50
4.4.1. D20S481 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular.....	50
4.4.2. D20S465 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular.....	52
4.4.3. D20S118 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular.....	53
4.4.4. D20S891 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular.....	54
4.4.5. D20S171 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular.....	56
4.4.6. D20S174 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular.....	57
4.4.7. D20S468 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular.....	58
4.4.8. D20S872 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular.....	60
4.4.9. D20S443 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular.....	61
BÖLÜM V TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
KAYNAKLAR.....	69

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. Mesane tümörü TNM evrelendirilmesi.....	19
Tablo 1.2. Mesane kanseri tümör evrelerinin gruplandırılması.....	20
Tablo 1.3. Mesane tümörü tanısında kullanılmaya aday belirteçlerin duyarlılık ve özgüllüğü.....	25
Tablo 3.1. PCR döngüsü yapılan mikrosatellit markırların baz dizilimleri ve ürün büyüklükleri.....	40
Tablo 3.2. PCR reaktifleri ve kullanılan konsantrasyon miktarları.....	40
Tablo 3.3. Primerler için belirlenen optimum PCR koşulları.....	41
Tablo 3.4. Gümüş boyama için kullanılan solüsyonlar ve süreleri.....	42
Tablo 4.1. Hastaların TNM evrelerine göre dağılımı.....	45
Tablo 4.2. Hastaların tümör derecesine göre dağılımı.....	45
Tablo 4.3. Hastalara ait tümörlü ve normal dokulardan elde edilen DNA' ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları.....	46
Tablo 4.4. D20S481 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatistiksel ilişki.....	51
Tablo 4.5. D20S481 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki.....	51
Tablo 4.6. D20S465 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatistiksel ilişki.....	52
Tablo 4.7. D20S465 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki.....	52
Tablo 4.8. D20S118 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatistiksel ilişki.....	53
Tablo 4.9. D20S118 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki.....	54
Tablo 4.10. D20S891 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatistiksel ilişki.....	55

Tablo 4.11. D20S891 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatıksel ilişki.....	55
Tablo 4.12. D20171 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatıksel ilişki.....	56
Tablo 4.13. D20S171 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatıksel ilişki.....	56
Tablo 4.14. D20174 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatıksel ilişki.....	57
Tablo 4.15. D20S174 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatıksel ilişki.....	58
Tablo 4.16. D20468 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatıksel ilişki.....	59
Tablo 4.17. D20S468 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatıksel ilişki.....	59
Tablo 4.18. D20872 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatıksel ilişki.....	60
Tablo 4.19. D20S872 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatıksel ilişki.....	60
Tablo 4.20. D20443 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatıksel ilişki.....	61
Tablo 4.21. D20S443 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatıksel ilişki.....	62
Tablo 4.22. Mesane kanserli hastalarda her bir markırda gözlenen sonuçlar...	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Normal epitel hücresinin karsinoma dönüşüm süreci.....	3
Şekil 1.2. Sporadik ve kalıtsal tümörlerde meydana gelen çift vuruş hipotezi.....	6
Şekil 1.3. Heterozigotluk kaybı oluşum mekanizmaları	8
Şekil 1.4. Mesane anatomisi ve histolojisi.....	10
Şekil 1.5. Mesane kanserli olguların derecelendirmeye göre dağılım yüzdesi.....	13
Şekil 1.6. Mesane kanseri görülme sıklığının yaşa göre dağılımı.....	14
Şekil 1.7. Mesane tümörü derecelendirme-G0.....	21
Şekil 1.8. Mesane tümörü derecelendirme-G1.....	21
Şekil 1.9. Mesane tümörü derecelendirme-G2.....	22
Şekil 1.10. Mesane tümörü derecelendirme-G3 ve tümörün metastaz yaptığı organlar.....	23
Şekil 4.1. Örnek alınan hastaların yaşa göre dağılımı.....	44
Şekil 4.2. D20S481 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	47
Şekil 4.3. D20S465 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	47
Şekil 4.4. D20S118 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	48
Şekil 4.5. D20S891 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	48
Şekil 4.6. D20S171 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	48
Şekil 4.7. D20S174 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	49

Şekil 4.8. D20S468 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	49
Şekil 4.9. D20S872 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	49
Şekil 4.10. D20S443 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	50
Şekil 4.11. D20S481 bölgesinde LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	51
Şekil 4.12. D20S465 bölgesinde LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	53
Şekil 4.13. D20S118 bölgesinde LOH ve heterozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri	54
Şekil 4.14. D20S891 bölgesinde LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	55
Şekil 4.15. D20S171 bölgesinde LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	57
Şekil 4.16. D20S174 bölgesinde LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	58
Şekil 4.17. D20S468 bölgesinde LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	59
Şekil 4.18. D20S872 bölgesinde LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	61
Şekil 4.19. D20S443 bölgesinde heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	62
Şekil 4.20. Mikrosatellit markırlarda LOH dağılımının grafiksel olarak gösterimi.....	63
Şekil 4.21. 20q11-13 bölgesinde bulunan markırların lokalizasyonu ve aralarındaki uzaklık.....	64

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat derece
AJCC	Amerika Kanser Katılım Komitesi
APC	Adenomatosis poliposis koli
APS	Amonyum persülfat
BCG	Bacillus calmette-guerin
BCL2L1	B hücre lenfoma 2
bç	Baz çifti
BLCA- 4	Mesane kanseri spesifik çekirdek matriks proteini 4
BPH	Benign prostat hiperplazisi
BTA	Mesane tümör antijeni
cM	Santimorgan
CDC91L1	Hücre bölünme siklusu 91
CDH1	Kaderin-1
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
CDKN2B	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2B
CGH	Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
CI	Güven aralığı
CIS	Karsinoma in situ
CN-LOH	Doğal kopya-heterozigotluk kaybı
DBC1	Deleted in bladder cancer 1
DBH	Dopamin beta hidroksilaz
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit

EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
ELISA	Enzim bağımlı immünosorben testi
EtBr	Etidyum bromür
FGFR3	Fibroblast büyüme faktör reseptörü 3
FHIT	Frajl histidin üçlüsü
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
GDF15	Büyüme farklılaşma faktör 15
hBUB1	Mitotoik kontrol noktası serin/treonin kinaz
HLA	İnsan lökosit antijeni
HNF4A	Hepatosit nükleer faktör 4
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilo dalton
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
L	Litre
LOH	Heterozigotluk kaybı
Mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
miRNA	Mikro RNA
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NCI	Milli Kanser Enstitüsü
NCOA3	Nükleer reseptör koaktivatör 3
NF1	Nörofibromatozis tip 1
NID1	Nidogen 1
NIDDM3	İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus 3
NIH3T3	Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
Nm	Nanometre
NMP-22	Çekirdek matriks proteini-22
OR	Olasılık oranı
P	Kısa kol

p15	Protein 15
p16	Protein 16
p21	Protein 21
p53	Protein 53
PBS	Fosfat tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pg	Pikogram
PTCH1	Patched homologue 1
Q	Uzun kol
RACK	Aktive protein kinaz reseptör
RASSF1A	Ras ilişkili etki alanı ailesi 1 izoform A
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
SSCP	Tek iplik konformasyon polimorfizmi
SSR	Basit Ardışık Tekrarlar
STR	Kısa Ardışık Tekrarlar
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris borat EDTA tamponu
TEMED	Tetrametilendiamin
TGF- β	Transforme büyüme faktör beta
THSK	Türk Halk Sağlığı Kurumu
TMEFF2	EGF benzer transmembran proteini
TNM	Tümör- Lenf Nodülü-Metastaz
TP53	Tümör protein 53
TSC1	Tüberoz skleroz kompleks 1
TSG	Tümör baskılayıcı gen
TTK	TTK protein kinaz
TUR	Transüretal rezeksiyon
TWIST1	Bükülme proteini 1
UICC	Uluslararası Kansere Savaş Birliği
UV	Ultraviyole
V	Volt
W	Güç

WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WHO-ISUP	Dünya Sağlık Örgütü-Uluslararası Ürolojik Patoloji Topluluğu
XKR7	Kell kan grup kompleksi altünitesi ile ilişkili gen ailesi 7
ZMYND8	Çinko parmak MYND 8

BÖLÜM I

GİRİŞ

Sanayileşmenin ilerlediği gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kimyasal ve radyolojik ajanlara maruz kalma gibi kötü çevresel koşulların büyük ölçüde tetiklediği kanser hastalığının ve bu hastalıktan ölümlerin insidansı gün geçtikçe hızla artmaktadır. Bu durum bilim insanlarını kanserin tanı ve tedavisinde hızlı, kolay ve duyarlılığı yüksek olan yeni yöntemlerin geliştirilmesine teşvik etmiştir. Bu sebeple cerrahi ve makro çalışmaların yanı sıra moleküler araştırmalar da hız kazanmış olup özellikle kanserin hangi moleküler süreçlerden geçerek oluştuğunun bilinmesi erken tanıda ve hedefe yönelik tedavilerde önemli rol oynamaktadır.

Çeşitli etyolojik faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan mesane kanseri ülkemizde erkeklerde 3. ve kadınlarda 11. en sık görülen kanser olarak rapor edilmiştir (THSK, 2008). Sigara kullanımı, mesleki faktörler ve *Schistosomia haematobium* gibi enfeksiyonal durumlarla ilişkilendirilen mesane kanserinin gelişiminde kromozomal anomaliler, onkogen aktivasyonu, tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu ve epigenetik değişiklikler gibi bazı moleküler süreçler rol almaktadır. Mesane kanserinde en sık görülen kromozom anomalilerinden biri 9. kromozomun uzun kolunda (9q) ortaya çıkan kayıplardır. Mesane tümörü ile 9q kayıpları arasındaki bu ilişki, etkilenen bölgede farklı tümör baskılayıcı genlerin varlığını düşündürmüş olup TSC1, PTCH1 ve DBC1 genleri bu bölge ile ilişkilendirilen tümör baskılayıcı genlerdir (Pollard ve ark., 2010).

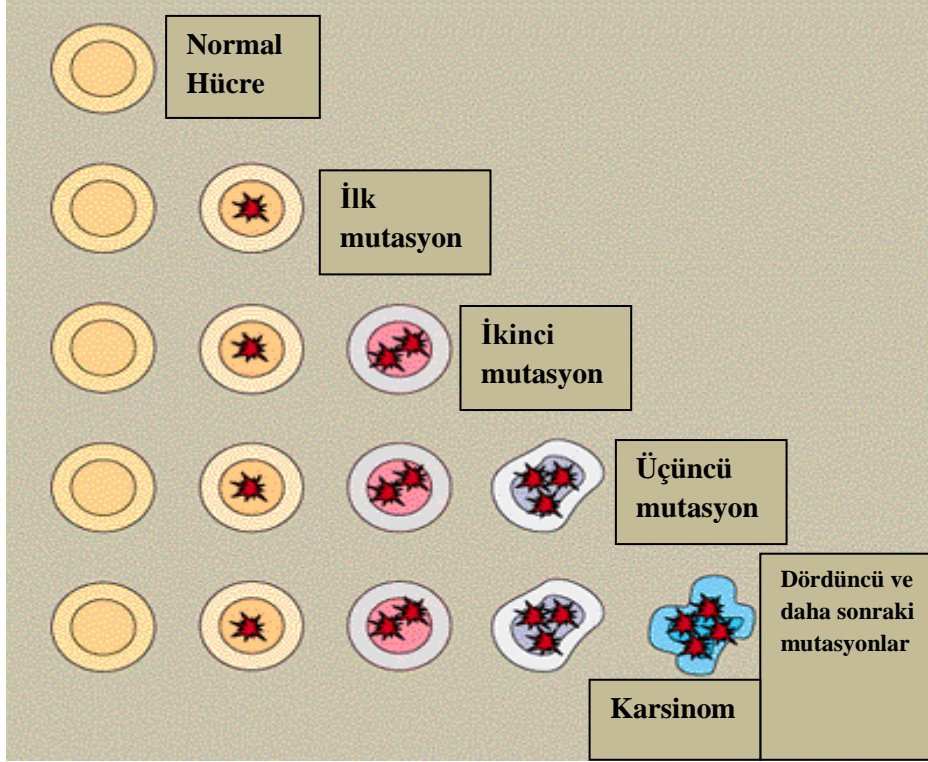
Kromozomal kayıpların ve özellikle tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun tespitinde kullanılan mikrosatellit analizlerden biri insan kanserlerinde en sık gözlemlenen moleküler değişikliklerden biri olan heterozigotluk kaybı (LOH) analizidir. Mesane kanserinde 3., 5., 8., 9., 10., 13., 15. ve 17. kromozomlarda

mikrosatellit markırlar kullanılarak heterozigotluk kaybı analizi yapılmış ve mesane kanseri ile bu kromozomlarda meydana gelen heterozigotluk kayıpları ilişkilibulunmuştur (Böhm ve ark., 2000; Sengelov ve ark., 2000; Wada ve ark., 2000; Försti ve ark., 2001; Natrajan ve ark., 2003; Stoehr ve ark., 2004).

1.1. Kanser Oluşum Mekanizmaları

Kanserleşme, kanser hücrelerinin gelişimi, hızlı bölünme kapasitesi, canlı kalma süresi, istila ve metastaz yeteneği ile hücreler için mutasyon ve seleksiyonu içeren çok basamaklı bir süreci kapsamaktadır (Lüleyap, 2008). Kontrolsüz çoğalma esas özellik olmakla birlikte kanser hücresinin; hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyarılara gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçabilme, anjiogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme gibi karakteristik özellikleri vardır (Çefle, 2009). Onkogenez ya da karsinogenez olarak adlandırılan kanserleşme sürecinde hangi mekanizmaların rol oynadığı yakın zamanlarda ve kısmen anlaşılabilmiştir (Nussbaum ve ark., 2006). Buna göre onkogenez sporadik olarak bireylerde izlenmesine ya da herediter bir özellik göstererek bir ailenin bazı fertlerinde tekrar edilmesine bakılmaksızın genetik değişiklikler üzerinden gelişen bir hastalıktır (Nussbaum ve ark., 2006; Çefle, 2009). Kanserin genetik ile bağlantılı olabileceği düşüncesi ilk kez 20. yy' ın başlarında ortaya atılmıştır ve bu fikir kanser araştırmalarının kaynağı olarak rol oynamıştır. Hangi durumda olursa olsun kanser hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir (Cummings ve Klug, 2002). Kanser genetiğinin amacı, invaze olan ve çoğalan kanser hücre popülasyonunu oluşturmak için normal somatik bir hücrenin izin verdiği çok basamaklı mutasyonel ve seçici yolları anlamaktır. Anahtar moleküler olayların ortaya çıkarılması için patoloğlara yeni prognostik indikatörler sağlanmıştır (Strachan, 2004). Uzun yıllar önce yapılan yaşa bağımlı kanser çalışmalarında, normal bir epitel hücresinin invaziv bir karsinoma dönüşmesi için yaklaşık 6-7 başarılı mutasyona ihtiyacı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1.1) (Strachan, 2004). Bu şekilde genetik açıdan çok basamaklı bir süreç olan onkogenez sırasında oluşan mutasyonlar kendiliğinden ya da mutajenik etkilere bağlı olarak gelişebilmektedir. Bu mutasyonların hedefleri olan genler incelendiğinde iki geniş kategori ayırt edilmektedir. Bunlar yapısal değişikliğe uğramaları ya da kopya sayıları arttığı zaman hücrenin denetimsiz çoğalmasına destek olan onkogenler ve hücrenin kontrol dışına çıkmasına karşı görev yapan tümör baskılayıcı genlerdir

(Strachan, 2004). Hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki denge bu gen grupları sayesinde kontrol edilir. İdeal olan bu oranın “1” olmasıdır. Hücre döngüsü kontrol proteinleri, DNA onarım genleri, büyüme faktörleri, reseptörler, onkoproteinler, programlı hücre ölümü bileşenleri, hücre membran yapıtaşları, anjiogenez proteinler kanser oluşum sürecinden sorumlu olarak ortaya konmuş gen ürünleridir (Türkeri, 2012).



Şekil 1.1. Normal epitel hücrenin karsinoma dönüşüm süreci (Strachan, 2004)

Onkogenler, proto-onkogen adı verilen normal hücre bölünmesini kontrol eden, sinyal iletim yollarında görev yapan proteinleri şifreleyen önemli hücre regülatör genlerinin mutant formlarıdır. Bu değişimin sonucu olarak onkogenler anormal hücre bölünmesini ve tümör oluşumunu teşvik etmektedir (Lüleyap, 2008). Onkogen aktivasyonu gen amplifikasyonu, nokta mutasyonu, kromozomal yeniden düzenlemeler gibi mekanizmalarla gerçekleşmektedir (Strachan, 2004; Çefle, 2009). Onkogenler 1960’ larda virüslerin sebep olduğu özellikle lösemi ve lenfoma gibi kanserlerin fark edilmesiyle keşfedilmiştir (Strachan, 2004).

İlk onkogen 1970 yılında keşfedilmiştir ve kökeni sarkomadan gelen anlamında src olarak adlandırılmıştır. Bu ilk onkogen retrovirüs genomlarının ters transkripsiyonu ile oluşan DNA’larının hücreleri enfekte etmesi ile tanımlanmıştır. Konakçı genine entegre olan gen (provirüs) replikasyonla çoğalır ve hücreden hücreye enfekte ederek

yayılır. Retroviral onkogenler değişmiş konakçı proto-onkogenlerdir, onkogenik genetik materyal doğrudan konakçı DNA'sına entegre olur; entegrasyon sonrası gen transkripsiyona ve translasyona uğrar ve tümör formasyonuna sebep olur. Bu süreç enfekte hücrede DNA provirüsün konakçı DNA'sı ile entegrasyonu ile sonuçlanır. Nadiren provirüs protoonkogenin yakınına yerleşir. Protoonkogenlerin ekspresyonu, provirüslerin uzun terminal tekrarlarından oluşan transkripsiyonel düzenleyici elemanlarının etkisiyle anormal şekilde ilerler. Proviral entegrasyon mutajenik olaylara sebep olur ve protoonkogenler aktive olur (Türkeri, 2012).

İnsan tümörlerinde aktive olan protoonkogenlerin gösterilmesi ilk defa DNA aracılı transformasyon teknikleri ile olmuştur. Gen transfer veya transfeksiyon ölçümü olarak isimlendirilen bu tekniklerde, bir tümörden verici DNA'sının rodent hücrelerinin (NIH3T3) alıcı zincirine dönüşür. Dönüşen NIH3T3 hücrelerinin seri gelişimi sonrası insan tümör onkogeni ilişkili olduğu insan tekrarlayıcı DNA dizileri ile klonlanabilir. İlk insan onkogeni mesane kanseri kökenli gen transfer tekniği ile izole edilmiştir. Ayrıca Ras onkogen ailesi gibi birçok onkogen farklı tümöral dokularda ve bu teknikle tanımlanabilmiştir (Türkeri, 2012).

Tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasında negatif yönde rol oynayan genlerdir. Artan aktivite ya da deregülasyonla onkogenler tümör gelişimini desteklerken tümör baskılayıcı genler tümör gelişimi için fonksiyon kaybına uğramak zorundadır. Proliferasyonu doğrudan baskılayan tümör baskılayıcı genlere bekçi tipi genler denilmektedir ve hücre döngüsünü denetleyen ve hücreyi apoptoza yönlendiren genler bu grupta yer alır. Proliferasyona dolaylı etki gösteren tümör baskılayıcı genler ise bakıcı tipi tümör baskılayıcı gen adını alır ve bunlar genomun bütünlüğünden sorumlu DNA tamir genleridir. Bunların kendileri işlev kaybettirici bir mutasyona uğradığında genom boyunca mutasyonlar ortaya çıkmaya başlar yani genomik instabilite gelişir (Çefle, 2009; Nussbaum ve ark., 2006).

İlk tümör baskılayıcı gen (TSG) bir çocukluk çağı göz tümörü olan retinoblastoma çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır. İkinci tanımlanmış tümör baskılayıcı gen ise 53 kDa ağırlığında olmasından dolayı p53 olarak tanımlanmış bir gendir. Genom gardiyanı olarak da tanımlanan bu TSG, tüm kanserlerin %50'sinde rol oynayabilmektedir. p53 proteini hücre döngüsü kontrolü ve apoptozda oynadığı önemli rolden dolayı genomun bekçisi olarak fonksiyon görür. p53 düzeyi normal hücrelerde düşüktür (Lüleyap, 2008).

Tümör baskılayıcı genlerin bulunmasının iki yolu vardır:

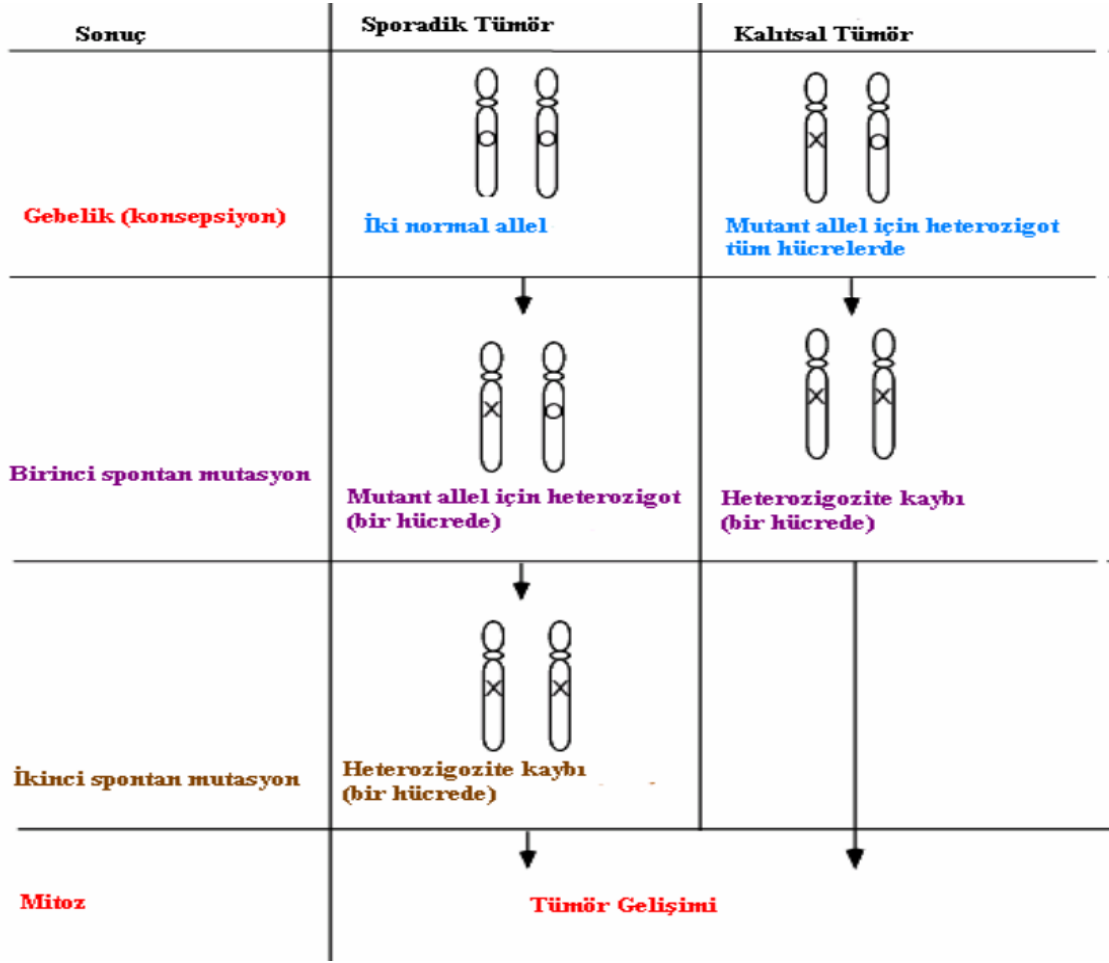
- 1- Ailesel kanserler için sorumlu genlerin haritalanması ve pozisyonel klonlama
- 2- Spesifik kromozomal materyal kayıpları için tümörleri tarama (Strachan, 2005).

Tümör baskılayıcı genler nokta mutasyonları ya da delesyonlarla susturulur ancak çok yaygın olan üçüncü bir mekanizma ise promotorların metilasyonudur. Tümör hücre DNA'sı normal hücre DNA'sı ile karşılaştırıldığında hipometillenmiştir, ancak genin promotorlarındaki CpG dinükleotitlerinin metilasyonu insan neoplazmalarının tüm tiplerinde bulunur ve genin uygunsuz transkripsiyonel suskunluğuyla ilişkilidir (Strachan, 2005). DNA'nın artmış metilasyonunun sahip olduğu DNA suskunluğu (silencing), tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybının açıklanmasında önemli bir alternatif moleküler mekanizma olarak bulunmuştur (Nussbaum ve ark., 2006).

1.1.1. Kanserın Çift- Vuruş Orijini

Tümör baskılayıcı genlerin kansere yol açtığı bazı herediter kanser formlarında bir germline mutasyon için heterozigot olan bir kişinin ikinci bir somatik mutasyona uğramasıyla yani tümör baskılayıcı gende fonksiyon kaybı oluşturan mutasyon için homozigot olmasıyla tümör geliştiği ilk kez 1960' lı yıllarda Knudson tarafından öne sürülmüştür. Tümör baskılayıcı genlerin iki allelinin kaybı pek çok sporadik kanserin patogeneğinde de önemli rol oynar. Bu durumda aynı hücrede iki somatik olayın oluşmasıyla her iki allel inaktif hale getirilir. Bu çift vuruş hipotezi ilk kez retinoblastoma gibi kanserlerin hem herediter hem de sporadik formlarında nasıl oluştuğunu açıklamak için kullanılmıştır (Nussbaum ve ark., 2006). Ancak bu hipotez günümüzde de ailesel polipozis koli, ailesel meme kanseri, nörofibromatozis tip 1 (NF1), ailesel polipsiz kolon karsinomu ve Li-Fraumeni sendromu gibi pek çok ailesel kanserler için önemli bir model olarak kabul edilmektedir (Nussbaum ve ark., 2006).

Bir mutasyon için heterozigot olan hücreler tek bir fonksiyonel tümör baskılayıcı kopyasına halen sahip olup bu da onların normal hücresel fenotipini sağlamada yeterlidir; bununla birlikte bir kopyası herediter olarak zaten mutasyona uğramışsa diğer normal allelin fonksiyonunun bir şekilde sonradan kaybolması tümörü baskılama yeteneğini ortadan kaldırmış olur (Şekil 1.2). Bu ikinci vuruş, genellikle somatik bir mutasyon olmasına rağmen bazı kanser hücrelerinde izlenen transkripsiyonel suskunluktaki gibi mutasyon olmadan fonksiyon kaybı da gözlenebilir. Bu ikinci vuruşun bir dokunun tek bir hücresinde olması tümör oluşumu için yeterlidir (Nussbaum ve ark., 2006).



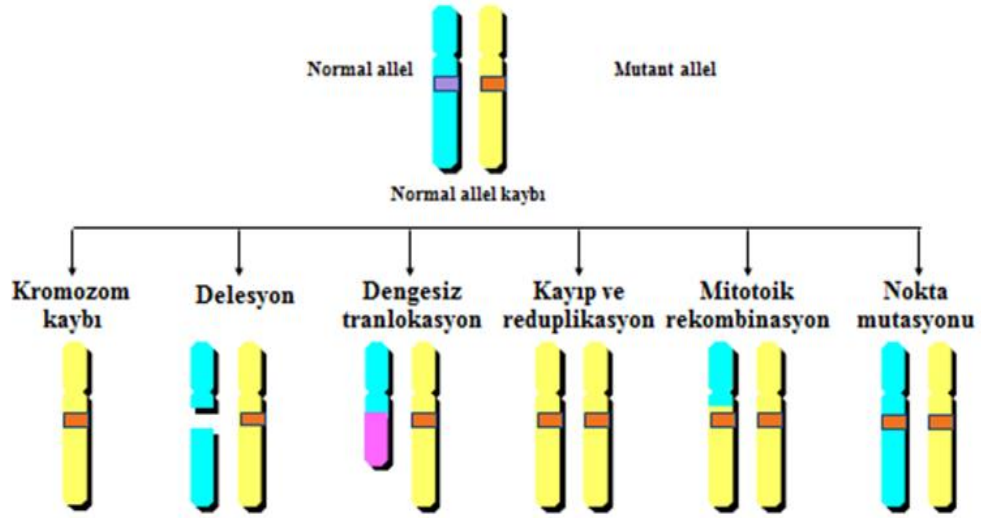
Şekil 1.2. Sporadik ve kalıtsal tümörlerde meydana gelen çift vuruş hipotezi (Çefle, 2009)

1.1.2. Heterozigotluk Kaybı (LOH)

Heterozigotluk kaybı (LOH) insan kanserlerinde gözlemlenen en yaygın moleküler genetik değişikliklerden biridir (Zheng ve ark., 2005). Bir canlının somatik hücrelerinin yapısal genotipi heterozigot iken, çeşitli mekanizmalarla homozigot ya da hemizigot konuma gelmesi heterozigotluk kaybı olarak tanımlanır (Yakut, 2007). Bu durum yaygın olarak Knudson'ın çift-vuruş hipotezi ile açıklanmaktadır. Mutasyona uğramış tümör baskılayıcı genleri taşıyan kromozomal bölgelerin heterozigotluğunun kaybı, mezenkimal ve epitelyal tümörlerin değişiminde anahtar role sahiptir (Lindblad- Toh ve ark., 2000). LOH tümör hücrelerinde ya da malignensiye doğru ilerleyen malign öncesi hücrelerde gözlenen bir olaydır (Spandidos ve ark., 1997). Kromozomal bir bölgedeki LOH sıklığı aday bir tümör baskılayıcı genin varlığının bir göstergesi olarak düşünülmektedir (Gündüz ve ark., 2002; Ozaslan ve Aytekin, 2009).

Spesifik bir lokustaki allellerden birinin kaybı olan LOH, bir delesyonla ya da bir kromozom parçasının kaybıyla meydana gelir (Ozaslan ve Aytekin, 2009). Kromozomal ayrılmamanın fiziksel delesyonu, mitotik ayrılmama, mitotik rekombinasyon ve gen konversiyonu gibi çeşitli genetik mekanizmalar LOH oluşmasına neden olur (Şekil 1.3) (Zheng ve ark., 2005). Kayıp mekanizması hem kromozom hem de tümör spesifik olmalıdır (Devilee ve ark., 2001; Zheng ve ark., 2005). Bazen bir kromozomun tamamı kaybolurken bazen de kromozomun sadece bir parçasının kaybıyla ilişkilidir. LOH allelik dengesizliğin yaygın bir şeklidir ve tümör baskıyıcı genlerin lokalize olduğu genomik bölgelerin tespiti ve farklı tümör tiplerini, patolojik evrelerini ve tümörleşme sürecini karakterize etmek için LOH analizi kullanılır (Zheng ve ark., 2005). Her kromozom kolundan polimorfik genetik markırlar seçilerek tümörlerin allelotiplendirilmesi ile LOH analizi yapılabilir (Zheng ve ark., 2005).

LOH analizi polimorfik mikrosatellit markırlar kullanılarak PCR yöntemi ile yapıldığı gibi RFLP, Southern blotlama, SSCP, FISH, CGH ve karyotip analizi gibi teknikler kullanılarak da yapılabilir. RFLP markırları düşük heterozigotluk oranına sahiptir ve az sayıda mevcuttur. Southern blotlamanın ise otomatikleştirilmesi zordur ve kolayca ölçeklendirilemez. Mikrosatellit markırlar LOH çalışmak için güvenilir genetik markırlardır ancak yöntemin southern analizi gibi otomatikleştirilmesi zordur ve kolayca ölçeklendirilemez (Zheng ve ark., 2005). LOH analizi için kullanılan bu yöntemlerin belirtilen bu sınırlılıklarından dolayı günümüzde daha geniş genom veri tabanında çalışmayı mümkün kılan “SNP array testi” kullanılmaktadır. Diğer adı CN-LOH (copy neutral loss of heterozygosity) olan bu yöntem tümör hücrelerindeki LOH’ nı geniş genomda tarayan doğru ve verimli bir yöntemdir (Lindblad-Toh ve ark., 2000).



Şekil 1.3. Heterozigotluk kaybı oluşum mekanizmaları (NCI, 2013).

1.2. Mesane

1.2.1. Mesane Embriyolojisi

Mesane gestasyonun ilk 12 haftasında gelişir. Embriyonel hayatın 4. ve 7. haftaları arasında ürogenital septum, kloakayı anorektal kanal ve primitif ürogenital sinüs şeklinde böler. Kloakal septum önde ürogenital membran, arkada anal membran kalacak şekilde ikiye bölünür. Primitif ürogenital sinüs üç kısımdan oluşmakta olup üstte olan en büyük parçası mesanedir. Kloakanın bölünmesi sırasında mezonefrik kanalların kaudal kısımları, mesane duvarı içine doğru çekilir ve mezonefrik kanalların birer çıkıntısı halindeki üreterler mesaneye ayrı ayrı girerler. Hem mezonefrik kanallar hem de üreterler mezodermal kaynaklı olduğu için, bu kanalların birleşmesi ile oluşan mesane trigonundaki mukoza mezodermal kaynaklıdır. Zamanla trigondaki mezodermal epitel, endodermal epitelle yer değiştirir ve sonuçta tüm mesane mukozası endodermal kaynaklı epitelle döşeli hale gelir (Çetin, 2006; Yıldırım, 2008).

1.2.2. Mesane Anatomisi

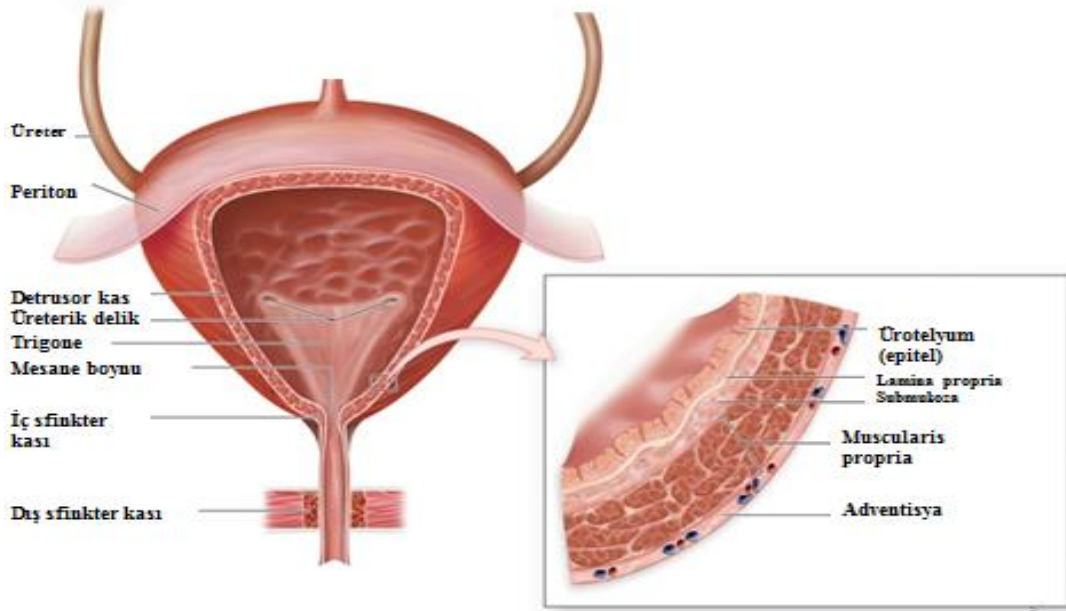
Mesane, dört kenarlı ters piramid biçimindedir ve pelviste pubis kemiklerinin hemen arka tarafında yer alır. İdrarın biriktirildiği bir depodur ve erişkindeki hacmi maksimum 500 ml kadardır. Mesanenin boyu, pozisyonu ve şekli içindeki idrar

miktarına, cins ve yaşa bağlı olarak değişikliğe uğramaktadır (Çetin, 2006). Güçlü bir kas duvara sahiptir. Erişkinde boş olduğu zaman pelvis içindedir; dolduğu zaman ise üst duvarı hipogastrik bölgeye doğru yükselir. Küçük çocuklarda mesane boş iken de pelvis giriminin üstünde kalır; daha sonra pelvis boşluğu genişledikçe mesane pelvis içine doğru gömülür ve erişkindeki konumuna gelir (Karademir, 2007 ve Yıldırım, 2008). Mesanenin tepesi sinfızis pubisin üst kenarının arkasında ön tarafa yakın olarak bulunur. Mesanenin arka yüzü mesane tabanı olarak bilinir ve yüzü üçgen seklindedir. Kadında vajen proksimali ve uterin serviksle, erkekte vas deferens ampullası ve vezikula seminalisle rektumdan ayrılır (Dönmez, 2007). Üst dış köşeler üreterlerle birleşir, alt köşeden ise üretra başlar. Arka duvarın üst kısmı ise peritonla kaplıdır. Mesane arka duvar komşulukları klinik olarak çok önemlidir çünkü neoplazilerin çoğu üreter orifislerine komşu arka duvardan çıkar ve invaziv tümörler komşu yumuşak doku ve organlara yayılırlar. Erkeklerde vezikula seminalis tutulumu mesane kanserlerinde kötü prognoz ve ileri evre göstergesidir (Çetin, 2006). Mesanenin üst yüzü tamamen peritonla kaplıdır (Şekil 1.4) ve sigmoid kolonla komşudur (Dönmez, 2007). Mesane dolduğu zaman yuvarlak bir şekil alır ve üst yüz karın boşluğuna doğru yükselir. Karın ön duvarının alt kısmındaki periton örtüsünü de kaldırdığı için mesanenin ön yüzü doğrudan karın ön duvarı ile temas eder hale gelir. Trigon, mesane tabanında yer alır ve mesane boynunun arkasına uzanır. Trigonun yan ve proksimal kısımlarında üreterler mesane içine oblik olarak girerler. Mesanenin en distal kısmı mesane boynu olarak adlandırılır. Mesane boynu, erkekte puboprostatik, kadında pubovezikal bağlarla sıkı bir şekilde korunur. Erkeklerde mesane boynu prostat bezi ile birleşir. (Dönmez, 2007). Mesane boynunun üzerinde bulunduğu yapı (erkeklerde rektum, kadında vajina) mesane yatağı olarak bilinir (Kuzey, 2007). Mesanenin kanlanması arteria iliaca internanın dalları olan a. vezikalis superior ve inferior tarafından sağlanır. Mesanenin venleri aşağıda prostatik pleksus ile bağlantısı olan pleksus venozus vesikalis'ten gelen venler vena iliaca internaya drene olur. Mesanenin lenfatik drenajı eksternal ve internal iliak lenf nodlarına olmaktadır (Kuzey, 2007; Dönmez, 2007; Yıldırım, 2008). Mesane, T11-L2 sempatik sinirler ve S2-4 parasempatik sinirler ile inerve olur (Dönmez, 2007; Yıldırım, 2008).

1.2.3. Mesane Histolojisi

Mesane duvarı, içten dışa doğru sırasıyla, ürotelyum olarak adlandırılan epitel, lamina propria, muskularis propria ve adventisyadan oluşur (Şekil 1.4). Mesane, üst

yüzeyinde, paryetal peritonla temas ettiği yerde serozaya sahiptir. Bu tabakalar ürotelyal karsinomlu hastaların evrelemesi için kullanıldığından, mikroskopik olarak doğru tanınmaları önemlidir. (Dönmez, 2007)



Şekil 1.4. Mesane anatomisi ve histolojisi (NCI, 2013)

1.2.3.1. Ürotelyum

Mesane mukozası kısmen düz görümlü çok katlı değişken (transizyonel) epitel ile döşelidir. (Yıldırım, 2008). En üstteki hücreler daha geniştir ve glandüler mukozaya benzer şekilde az miktarda müsin salgılar (Çetin, 2006). Transizyonel epitel terimi, epitelin histolojik görünümünün non-keratinize skuamöz ve psödostratifiye kolumnar epitel arasında bir geçiş göstermesi nedeniyle kullanılmıştır. WHO/ISUP 1998 toplantısında, transizyonel hücre terminolojisinin ürotelyal hücre olarak değiştirilmesi gerektiğini belirtmiş, ancak transizyonel hücre teriminin bir sinonim olarak kullanılabileceği kabul edilmiştir (Epstein ve ark., 1998).

Mesane boş iken epitel kalınlığı 5-6 sıradır, dolu olduğu zaman ise epitel kalınlığı 3-4 sıra olur ve yüzeydeki hücreler yassılaştır. Epitelde, yüzeyel hücreler, intermediyer hücreler ve bazal hücreler olmak üzere üç hücre tabakası vardır (Yıldırım, 2008). En üstte bulunan yüzeyel hücreler, üriner boşluk ile ilişkili olup asidik sitoplazmalı, büyük, eliptik ve şemsiye benzeri görünümde olan ve bu nedenle şemsiye hücreleri olarak adlandırılan hücrelerdir (Dönmez, 2007). Primer görevleri genişleme ve kasılma durumlarında mukozal bütünlüğü sağlamak ve idrar geçişini önlemektir (Çetin, 2006). Bu hücrelerde kan grubu antijenleri ve keratin görülsede epidermal

büyüme faktör reseptörü (EGFR) görülmez. İntermediyer hücrelerden daha küçük olan bu hücreler, çift çekirdekli ve yoğun eozinofilik sitoplazmaya sahiptirler (Çetin, 2006; Yıldırım, 2008). İntermediyer hücreler boş mesanede beş hücre kalınlığındadırlar ve bazal membran uzunluğuna dik olarak uzanırlar. Nükleusları, yuvarlak olup ince granüler kromatine sahiptir. Sitoplazmaları geniş ve vakoullü olabilir. Bu hücreler desmozomlarla birbirleri ile bağlantılı olup sitoplazmik membranları belirgindir. Mesanenin dolu olduğu bölgelerde ise bu tabaka seçilemeyebilir veya sadece bir hücre kalınlığında ve düzleşmiş olarak görülür (Yıldırım, 2008).

Bazal hücre tabakası mesane epitelinin rezerv hücreleri olup, benign mesane epitelinde bu tabakada nadir mitotik figürler görmek mümkündür. Bazal hücreler mesane boş iken kolumnar morfolojide olup, mesane doldukça esneyerek küboidal şekil almaktadır (Gürel, 2007).

Normal ürotelyumun yaklaşık olarak bir yıllık bir yenilenme süresi vardır ve mitoz görmek olağan değildir (Çetin, 2006).

Değişici epitel hücreleri birbirlerine elastik bağlar ve çok sayıda sıkı bağlantılarla bağlıdır. Böylece, mesane epiteli hücreleri mesane idrar ile doldukça esneyerek ve birbirleri üzerinden kayarak epitelin mesane duvarı ile beraber genişleyebilmesini, mesane boşaldığı zaman da hızla eski haline dönmesini mümkün kılmaktadır. Epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, mesane içerisindeki konsantre toksik maddelerin kana karışmasını engelleyen bir “kan-idrar bariyeri” oluşturmaktadır (Gürel, 2007).

1.2.3.2. Lamina Propria

Lamina propria, mukozal bazal membran ile muskularis propria arasında uzanır. Damar yapılarından zengin olup lenfatik kanallar, duysal sinirler ve bir miktar elastik lif içeren gevşek bağ dokusundan meydana gelir. Mesane ve üreterde lamina propria gevşek olduğundan mesanenin kasılması kalın mukozal katlanmalara neden olur. Mesanenin lamina propriasının orta kısmında ise orta büyüklükte arter ve venler bulunur. Lamina propriada bulunan düz kas demetleri sıklıkla bu damarlar ile ilişkili olup muskularis propria ile ilişkili değildir. Bunlar izole bantlar şeklinde görülebileceği gibi sürekli kalın bir kas tabakası şeklinde de görülebilirler (Dönmez, 2007; Yıldırım, 2008). Muskularis mukozanın ince ve devamlılık göstermeyen kas lifleri muskularis proprianın kalın fasikülleri ile karıştırılmamalıdır. Lamina propriadaki bu kas lifleri yaklaşık olarak orta bölgede yerleşirler, yüzeye paralel uzanırlar ve sıklıkla ince duvarlı damarlar ile birlikte dirler. Tümörün evresini ve

tedavisini etkilemesi nedeniyle cerrahi ve biyopsi materyallerinde muskularis propria ve yüzeyel kas demetlerinin ayırımı önemlidir (Yıldırım, 2008).

1.2.3.3. Muskularis Propria

Muskularis propria, içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler olmak üzere üç tabaka halinde düz kas demetlerinden oluşur. Gerçekte bu tabakalar sadece mesane boynunda devamlılık gösterir. Diğer bölgelerde bu longitudinal ve sirküler tabakalar birbirlerine karışır halde bulunur ve uzanımları belirsizdir. Erkeklerde mesane boynunda muskularis propria demetleri, prostatın fibromusküler dokusuna kadar devam ederken, kadınlarda üretra duvarı içinde kas fibrilleri ile devam eder. Diğer tabakalarda olduğu gibi muskularis proprianın kalınlığı kişiden kişiye, yaşa ve dolgunluğunun derecesine bağlı olarak değişiklik gösterir (Yıldırım, 2008). Evreleme için muskularis proprianın yüzeyel ve derin olarak iki segmente ayrılmasında anatomik bir belirteç yoktur (Yıldırım, 2008).

1.2.3.4. Adventisya/Seroza

Mesanenin en dış tabakası bağ dokudan oluşan adventisya'dır. Sadece üst tarafta üzeri pelvik periton tarafından çevrilidir (Yıldırım, 2008).

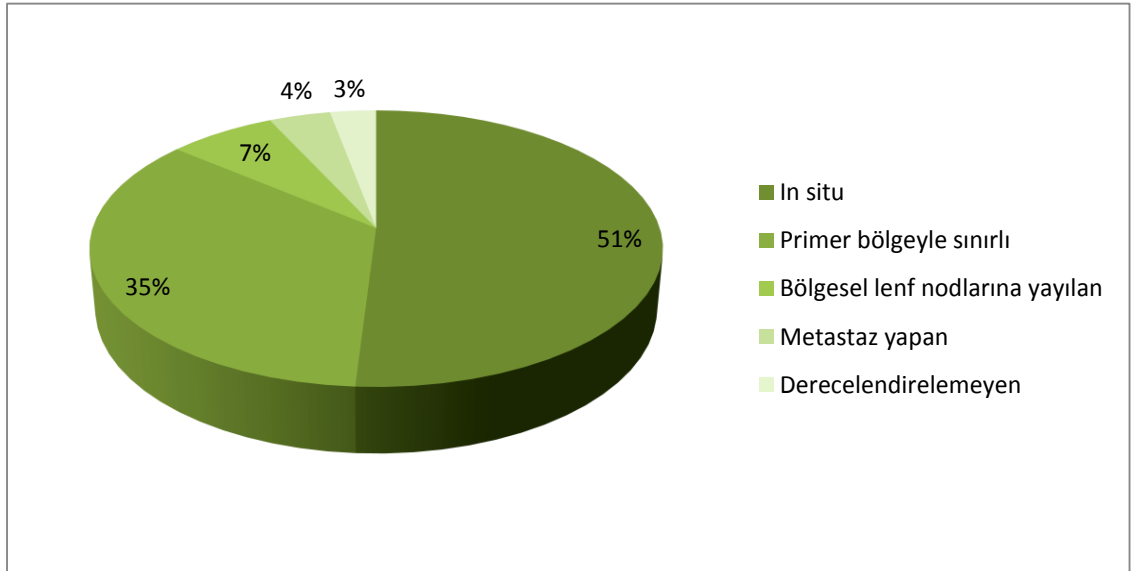
1.3. Mesane Kanseri

Mesane kanseri ürotelyumdan kaynaklanan karsinomların jenerik ismidir (Schulz, 2005).

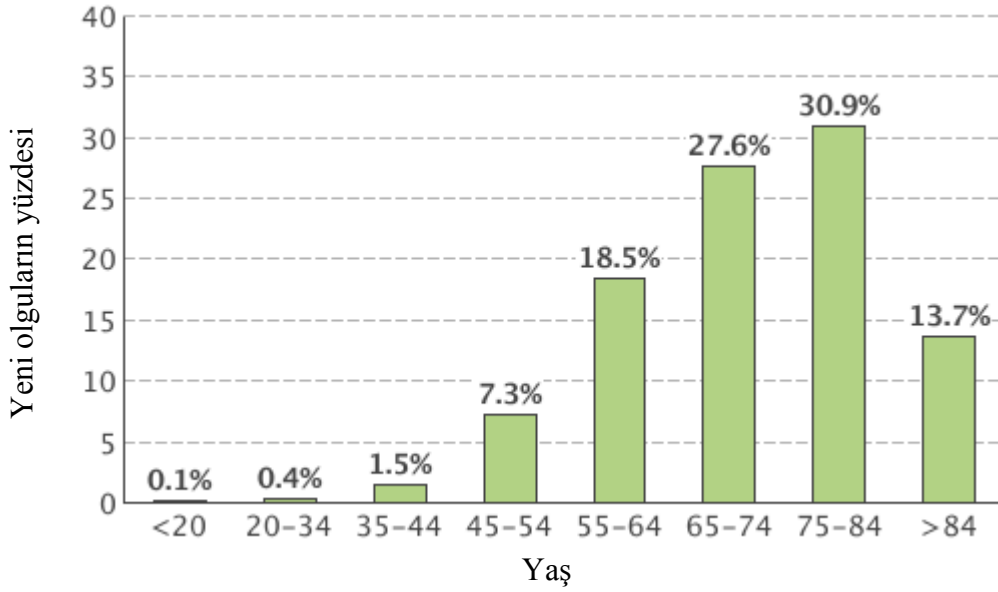
1.3.1. Epidemiyoloji

Mesane kanseri dünya genelinde tüm kanserden ölümler içerisinde % 2.1 oranına sahiptir (WHO, 2011). Mesane kanserinin Amerika Birleşik Devletleri'nde 2013 yılındaki tahmini yeni tanı sayısı 72.570 olup tüm yeni kanser olguları içindeki oranı % 4,4'dür. 2013 yılındaki tahmini ölüm sayısı 15.210 olup tüm kanserlerden ölümler içindeki oranı % 2,6'dır. ABD' deki prevalansı değerlendirildiğinde 563.640 insan bu kanserle yaşamaktadır. 2003-2009 yılları arasında gözlenen mesane kanserli olguların derecelendirmeye göre dağılım yüzdesi Şekil 1.5'de verilmiştir (NCI, 2013). 2013 yılı için tahmini kanserden ölümlerde prostat, meme, akciğer, kolon ve melanomadan sonra gelerek 6. sırada yer almaktadır. Mesane kanseri en sık 75-84 yaşları arasında görülmektedir (Şekil 1.6) (NCI, 2013). Ancak son 50 yılda endüstriyel ve çevresel karsinojenlerin artışıyla birlikte mesane tümör insidansında artma, görülme yaşında ise gençleşme gözlenmiştir (Yenice, 2008). 1950 li yıllardan beri özellikle son 20 yıl içerisinde mesane tümörü insidansı yılda %0.8 artmaktadır. İnsidanstaki bu artışa rağmen mortalitesi azalma eğilimindedir. Mortalitedeki

azalma; yüzeysel mesane kanserlerinde intravezikal tedavi uygulanmasının yanında ilerlemiş ve metastaz yapmış mesane kanserinde kombine kemoterapinin yaygın olarak kullanılmasına bağlanmaktadır (Sarı, 2007). Mesane kanserinin erkeklerde görülme sıklığı kadınlardan yaklaşık 4 kat daha fazladır (NCI, 2013). Türkiye’ de yapılan kanser istatistiklerine göre mesane kanseri, prostat ve akciğer kanserinden sonra erkeklerde en sık görülen 3. kanser türü olup insidans hızı 21.7’ dir. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri içinde ise 11. sırada yer almaktadır ve insidans hızı 3.0’ dır (THSK, 2008). Mesane tümörlerinin ülkemizde daha çok Karadeniz Bölgesi’nde görüldüğü belirtilmişse de; son yıllardaki istatistiklerle bunu İç Anadolu ve Ege Bölgesi ile paylaşmaktadır. Bu bölgelerdeki mesane tümörü insidansı Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgeleri’ne göre belirgin Şekil de yüksek bulunmuştur (Yenice, 2008).



Şekil 1.5. Mesane kanserli olguların derecelendirmeye göre dağılım yüzdesi (NCI, 2013).



Şekil 1.6. Mesane kanseri görülme sıklığının yaşa göre dağılımı (NCI, 2013).

1.3.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

1.3.2.1. Sigara: Sigara ürotelyal kanserlerin % 45' i ile ilişkili bulunmuştur ve en iyi dökümente edilmiş risk faktörüdür (Sarı, 2007). Sigara içenlerde mesane kanseri insidansı 4 kat artmaktadır. Riskin tütünden değil, sigarada bulunan aromatik aminler, 4-aminobifenil ve O-toludine'den kaynaklandığı düşünülmektedir (Ataus, 2008). Sigara içeriğindeki kimyasal ajanların bir kısmı akciğerlerden absorbe olur ve kan yoluyla uzak organlara gider; sigara içenlerin özellikle idrarında bu maddelerin atılma ürünleri yoğun miktarda bulunur. Sigara dumanı direk olarak mesaneye etki edemez; önce kana absorbe edilir ve mesaneye taşınır; sonra burada mesane hücreleri bu bileşiklerin karsinojenik etkilerine dayanmaya çalışır (Tuncer, 2007).

1.3.2.2. Mesleki Faktörler: Mesane kanseri, Almanya'da Ludwig Rehn tarafından yapılan bir çalışmanın sonucunda anilin boyaları üreten boya fabrikası işçileri üzerinde saptanmış olup endüstrileşme ile ilgisi gösterilen ilk kanserdir (Schulz, 2005; Sarı, 2007). İlk kez 1895 yılında Almanya'da gözlemlenen bu ilişkiden sonra amino kökenli aromatik hidrokarbon, beta-naftilamin, 2-naftilamin, ksenilamin, 4-nitro-difenil, 4-aminobifenil, 2-asetil aminofluoran gibi kanserojen olduğu kanıtlanan maddeler çalışanların idrarında yoğun olarak saptanmıştır (Ataus, 2008; Yenice, 2008). Yine ilk kez Japon kimono boyacılarında da benzidinin mesane tümörüne yol açtığı gösterilmiştir. Boya sanayi, kuru temizleme, tekstil, lastik ve kauçuk, alüminyum, kimya sanayi işçileri, boyacılar, petrol işçileri, dış teknisyenleri,

kuaförler gibi pek çok meslek grubu bu kimyasallar nedeni ile risk altındadır (Ataus, 2008).

1.3.2.3. Enfeksiyon ve Enflamasyon: Tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonları, taşlar ve uzun süre kateterizasyon epitelde skuamöz metaplazi, glandular metaplaziye neden olarak adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom gelişimine neden olmaktadır (Yenice, 2008). *Schistosomia haematobium*'un neden olduğu schistosomiazis epitelde metaplazik değişikliğe neden olarak skuamöz hücreli karsinom oluşumuna neden olabilmektedir (Ataus, 2008). Erkeklerde şistosomiazisin endemik olduğu Mısır'da mesane skuamöz hücreli karsinomu en sık görülen malignensidir. Sistitle indüklenmiş mesane kanserleri, ana etken ne olursa olsun çoğunlukla uzun süreli ciddi enfeksiyonlarla ilişkilidir (Yıldırım, 2008). Bakterilerden proteuslar ve E.coli mesane oluşumundan sorumlu tutulurken genitoüriner tüberkülozda mesane kanser riskinin arttığı bildirilmiştir (Yenice, 2008).

1.3.2.4. İlaçlar ve Radyoterapi: Bir analjezik olan fenasetin ile kemoterapötik bir ajan olan siklofosamid riskli ilaçlardır. Fenasetinin aşırı kullanımı pelvis renaliste transizyonel hücreli karsinom riskini arttırdığı gösterilmiştir (Yenice, 2008). Siklofosamid alan hastalarda 6-13 yıllık bir dönemde mesane kanserine yakalanma riski yaklaşık 9 kat artmaktadır (Sarı, 2007). Yine siklofosamidin üriner bir metaboliti olan akrolein hem hemorajik sistitten hem de mesane kanserinden sorumlu tutulmaktadır (Yıldırım, 2008). Pelvik maligniteler nedeniyle pelvik ışınlamaya maruz kalanlarda örneğin serviks uteri kanseri nedeniyle radyoterapi uygulanan kadınlarda mesane kanseri insidansı iki ile 4 kat artmaktadır (Atasun, 2008).

1.3.2.5. Gıda Maddeleri: Allen ilk kez 1957'de yapay tatlandırıcıların karsinojenik etkilerinden söz etmiştir. Sakarin ve siklamidin etkileri tartışmalı olmakla birlikte uzun süreli yüksek doz kullanımda tümör oluşabilmektedir. Yağ ve kolesterolden zengin diyetle beslenmenin, aşırı çay ve kahve tüketiminin mesane tümör riskini arttırdığı öne sürülmektedir (Yenice, 2008). Armstrong ve Doll yağdan zengin diyetle, artmış mesane kanseri insidansı arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir (Armstrong ve Doll, 1975). Japonya'da mesane kanseri oranının düşüklüğü, yağdan fakir diyetle ilişkili olabilir (Yıldırım, 2008).

1.3.3. Patogenez

1.3.3.1. Normal Mesane Ürotelyumu

Normal mesane ürotelyumu 3 ile 7 katman kalınlığındadır. Bir ya da daha fazla tabakadan oluşan ara hücreler bazal hücre tabakasının üzerinde yer alır. En yüzeysel tabaka ise büyük, düz ve şemsiye hücrelerinden oluşur. Ürotelyum lamina propria bazal membranı üzerinde yerleşir. Lamina propria, içinde düz kas lifleri bulunan tunika muskularis mukozayı içerir.

Renal pelvisten üretra içindeki mesaneye doğru üriner sistem yapısı birkaç yönüyle deri ve diğer organlardaki skuamöz epitelden farklı olan ürotelyum adı verilen özelleşmiş ara (transisyonel) epitel ile kaplıdır. Ürotelyum idrar bileşenlerini vücut içine geri sızmadan hatta sudan koruyan az geçirgen bariyer şeklindedir. Transizyonel bir epitelde birkaç tabaka şeklinde olan hücreler bazal membranla bağlantıyı korur. Bu onlara dolum durumuna bağlı olarak birbirleri arasında geçiş izni verir (Schulz, 2005).

Mesane tümörlerinin % 98'i epitelyal kökenlidir. Bunların da % 90' ı değişici epitel karsinomu, % 5-7'si yassı hücreli karsinom ve % 1-2'si de adenokarsinom türündedir. Ancak bunların öncesinde çoğu tümörde epitelyal displazi gelişir (Karademir, 2007).

1.3.3.2. Epitelyal Hiperplazi ve Metaplazi

Epitelyal hiperplazi terimi nükleer ya da yapısal anormallikler olmaksızın hücre sayısında artışı ifade eder. Ürotelyal metaplazi genellikle mesane tabanında, sıklıkla fokal alanlarda epidermoid (skuamöz metaplazi) ya da glandular (adenomatöz metaplazi) gelişim şeklinde, nontranzisyonel epitelyal görünümündedir. Hücresel atipiden yoksun skuamöz metaplazi ya da belirgin keratinizasyon benign bir durumdur (Karademir, 2007). Endemik şistomiyozisin bulunduğu ülkelerde yaygın olan farklı histolojiye sahip bir alt tip ürotelyal farklılaşmayı kaybeder ve skuamöz hücreli karsinom ortaya çıkar. Bu durum metaplaziye örnektir (Schulz, 2005).

1.3.3.3. Ürotelyal Displazi

1.3.3.3.1. Preneoplastik Proliferatif Anormallikler: Atipik hiperplazi epidermal hiperplaziye benzer, farklı olarak nükleer anormallikler ve şemsiye hücrelerinde parsiyel yer değişiklikleri bulunur (Karademir, 2007).

1.3.3.3.2. Displazi: Displazi terimi normal ürotelyum ve karsinoma in situ (şiddetli displazi) arasındaki epitelyal değişikliktir. Displastik hücreler büyük, yuvarlak, çentikli normal epitelyal polaritede saptanmayan bazal yerleşimli nukleuslara sahiptir (Karademir, 2007).

1.3.3.3.3. Inverted Papilloma: Inverted papilloma kronik inflamasyona ya da mesane çıkısındaki obstruksiyona bağlı gelişen benign proliferatif bir lezyondur. Papiller çıkıntılar mesane lümeninden çok fibromüsküler stromaya doğru ilerler. Lezyon genellikle ince bir normal ürotelyum tabakası ile kaplıdır. Inverted papillomalar skuamöz metaplazi alanları içerebilir. Inverted papillomaların malign transformasyonu nadir olarak bildirilmiştir (Karademir, 2007).

1.3.3.3.4. Vezikal Lökoplaki: Lökoplaki belirgin keratinizasyon, aşağıya doğru büyüyen çıkıntılar (akontozis), sellüler atipi ve displazi ile karakterize skuamöz metaplazidir. Normal ürotelyumun zararlı uyarana cevabı olarak ortaya çıktığına inanılmaktadır ve genel olarak hastaların % 20'sinde skuamöz hücreli karsinomaya ilerleyebilen premalign bir lezyon olarak kabul edilebilir (Karademir, 2007).

1.3.3.3.5. Psödosarkom (Postoperatif İğ Hücreli Nodül): Postoperatif iğ hücreli nodül mesane sarkomuna benzeyen nadir bir lezyondur. Alt üriner sistem girişimi ya da enfeksiyonundan birkaç ay sonra iğ hücrelerinin reaktif poliferasyonuyla oluşur. Bu lezyonlar yanlış olarak malign olarak yorumlanmıştır ve uygunsuz olarak radikal cerrahi uygulanmıştır (Karademir, 2007).

1.3.3.4. Ürotelyal Karsinom

1.3.3.4.1. Karsinoma In Situ

Karsinoma in situ mukozanın eritemli kadifemsi yama şeklindeki lezyonu olarak görünürse de, sıklıkla endoskopik olarak tanınmaz. Histolojik olarak az diferansiye transizyonel hücreli karsinomdan oluşur. Tümör hücrelerinin zayıf tutunmaları nedeniyle idrarın sitopatolojik çalışmalarında %80-90 olguda pozitif sonuç alınır. Erkeklerde daha sık görülür. Semptomlar prostatizm, üriner sistem enfeksiyonu veya nörojenik mesane veya interstisyel sistit şeklinde yanlış yorumlanabilir (Çakır, 2006). Yüksek dereceli yüzeysel tümörü olan hastaların % 25 ya da daha fazlasında karsinoma in situ mevcuttur ve bunların % 40 ile % 83'ü ilerleyerek kasa invaziv kansere dönüşür (Karademir, 2007).

1.3.3.4.2. Transizyonel Hücreli Karsinom

Mesane kanserlerinin % 90'dan fazlası transizyonel hücreli karsinomdur. Tekrarlamayan küçük benign lezyonlardan, düşük veya "intermediate" derecede malign potansiyelli tümörlere veya mesane duvarını invaze eden ve sıklıkla metastaz yapan lezyonlara kadar uzanır. Birçoğu başlangıçta multifokaldir (Mitchell, 2008). Histopatolojik olarak epitelyal hücre tabakalarında artma, mukozada papiller kıvrıntılar, dev hücreler, nükleer yoğunlaşma, nükleus/stoplazma oranında artma,

belirgin nükleolus ve artmış mitoz ile karakterizedir (Karademir, 2007). Ürotelyal karsinomlar, tümör büyüme şekilleri yönünden bir takım farklılıklar gösterir, bunlar arasında; papiller, sesil, çevreye yayılan, nodüler, mikst ve yassı, epitel içine doğru büyüyen (karsinoma in situ) sayılabilir. Papiller transisyonel hücreli karsinom kolayca invaziv olmaz, ancak tekrarlama eğilimindedir (Schulz, 2005). Ürotelyumun büyük bir metaplastik potansiyeli vardır; bu nedenle, ürotelyal karsinomalar iç hücreli skuamoz ya da adenokarsinomatöz elemanlar içerebilir. Bu elemanlar kasa invaziv mesane kanserlerinin yaklaşık olarak üçte birinde bulunmaktadır ve tek bir kanserde birçoğu bir arada bulunabilir. Mesane tümörlerinin yaklaşık %70' i papiller, % 10' u nodüler ve % 20' si de mikst tiptedir (Karademir, 2007).

1.3.3.4.3. Skuamoz Hücreli Karsinom

Dünyanın çeşitli bölgelerinde mesanenin skuamoz hücreli karsinomunun prevalansı değişiklik göstermektedir. İngiltere'de mesane kanserlerinin %1' ini oluşturmaktadır iken Amerika Birleşik Devletleri'nde bu oran %3-7 arasında değişmekte, Mısır'da ise oran % 75'e kadar çıkmaktadır (Karademir, 2007). Mısır'daki skuamoz hücreli karsinomaların çoğu kronik *S. hematobium* enfeksiyonu ile ilişkilidir. Bu tür kanserler transisyonel hücreli kansere yakalanmış kişilere oranla ortalama 10 ile 20 yaş daha genç kimselerde görülmektedir. *S. hematobium* enfeksiyonuna bağlı olmayan skuamoz hücreli kanserler genellikle üriner taşların ya da uzun süreli kateterizasyonun kronik irritasyonuna, kronik üriner enfeksiyonlara ya da mesane divertikülüne bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Sigara kullanımının da mesanede skuamoz hücreli kanser gelişimi riskini artırdığı bildirilmiştir. Skuamoz hücreli karsinoma karakteristik olarak skuamoz inciler adı verilen birbirinden ayrık hücre topluluklarından oluşan keratinize adalar şeklindedir. Bunlar ekzofitik, nodüler lezyonlardır ve genelde lenf nodu ve uzak organ tutulumu yapmazlar. Çoğunlukla prognozu kötüdür çünkü çoğu hastada tanı anında hastalık yeterince ilerlemiş durumda olmaktadır (Karademir, 2007).

1.3.3.4.5. Adenokarsinoma

Adenokarsinoma birincil mesane kanserlerinin %2'sinden daha azını oluşturur. Adenokarsinomalar genellikle mesane tabanında ya da kubbede görülürler fakat mesanenin herhangi bir bölgesinde de yer alabilirler. Ekstrofik mesanelerde en sık görülen kanser türüdür. Bu tümörler kronik enflamasyon ya da irritasyona bağlı olarak gelişirler. Histolojik olarak gastrointestinal sistemde gözlenen adenokarsinomlarla özdeştir (Mitchell, 2008). Vezikal, urakal veya metastatik

olabilirler. Enterik adenokarsinomaların tüm histolojik çeşitleri mesanede görülebilir. Çoğu musin üretir ve glandüler, kolloid veya yüzük hücreli örnekleri vardır. Tanı konulduğunda genellikle kas invazyonu vardır. Tanı konulduğunda genellikle ileri aşamada olurlar ve bu nedenle prognozları kötüdür (Karademir, 2007).

1.3.4. Evreleme ve Derecelendirme

1.3.4.1. Evreleme

Günümüzde mesane tümörlerinin evrelendirilmesinde International Union Against Cancer (UICC) ve American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından ortaklaşa geliştirilmiş ve daha sonra düzeltilmiş olan Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sistemi kullanılmaktadır (Yenice, 2008). Birincil tümörün invazyonu (T), bölgesel lenf düğümlerinde metastaz mevcudiyeti ve bunun seviyesi (N), uzak organ ve doku metastaz mevcudiyeti ve bunun seviyesi (M) olarak değerlendirilmektedir (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Mesane tümörü TNM evrelendirilmesi

T – PRİMER TÜMÖR	
TX	Birincil tümör değerlendirilemiyor.
T0	Birincil tümöre ait kanıt yok.
Ta	İnvaziv olmayan papiller karsinom.
Cis	Karsinoma in situ.
T1	Tümör epitel altı dokuyu tutmuş.
T2	Tümör kas dokusunu tutmuş.
T2a	Tümör yüzeysel kas (iç yarı) dokusunu tutmuş.
T2b	Tümör derin kas (dış yarı) dokusunu tutmuş.
T3	Tümör perivezikal dokuyu tutmuş.
T3a	Mikroskopik olarak.
T3b	Makroskopik olarak (ekstravezikal kitle).
T4	Tümör; prostat, uterus, vajen, pelvik duvar, abdominal duvar gibi yapıları tutmuş.
T4a	Tümör prostat, uterus veya vajeni tutmuş.
T4b	Tümör pelvik duvar veya abdominal duvarı tutmuş.
N – LENF NODLARI	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
N1	Tek bir lenf nodunda 2cm veya daha küçük metastazlar.
N2	Tek bir lenf nodunda 2 cm'den büyük, 5 cm'den küçük metastazlar, ya da birden fazla lenf nodunda 5 cm'den büyük olmayan metastazlar.
N3	Bir lenf nodunda 5 cm'den büyük metastazlar.
M – UZAK METASTAZLAR	
MX	Uzak metastazlar değerlendirilemiyor.
M0	Uzak metastaz yok.
M1	Uzak metastazlar.

Mesanein metastatik tümörleri çoğunlukla komşu organ tümörlerinin direk invazyonu sonucu oluşur. En sık serviks ve prostat olmak üzere kolon, over, uterus ve komşu yumuşak doku tümörleri metastaz yapar. Mesane tümörünün uzak metastatik bölgeleri ise lenf düğümleri, akciğer, karaciğer ve kemiktir (Dillioğlugil, 2001). Lenfatik metastazlar %75 oranla obturator, %64 oranla eksternal iliaka yapar. Vasküler metastazları ise %38 oranla karaciğer ve %536 oranla akciğere yapmaktadır. Lenfatik veya vasküler metastazlar daha çok grade II – III tümörlerde saptanır (Penbegül, 2006). Mesane kanseri tümör evrelerinin gruplandırılması ise Tablo 1.2’ de gösterilmektedir (Dillioğlugil, 2001).

Tablo 1.2. Mesane kanseri tümör evrelerinin gruplandırılması

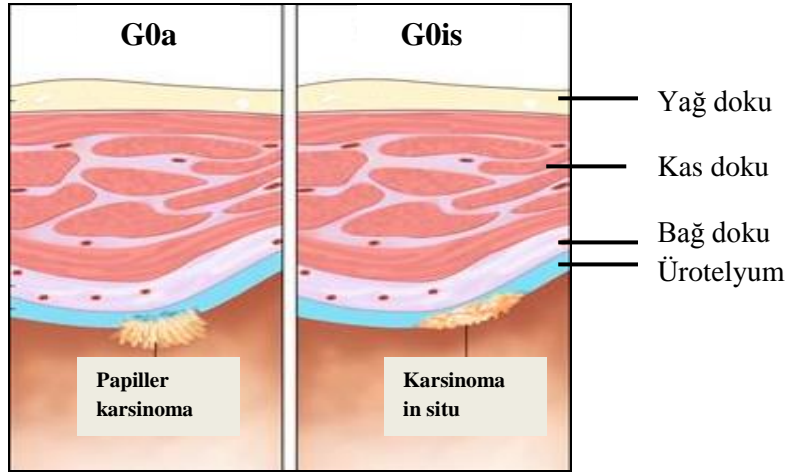
Evre 0a	Ta	N0	M0
Evre 0is	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0
Evre III	T3a	N0	M0
	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Evre IV	T4b	N0	M0
	Herhangi bir T	N1	M0
	Herhangi bir T	N2	M0
	Herhangi bir T	N3	M0
	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

1.3.4.2. Derecelendirme

Mesane kanseri için üzerinde uzlaşmış tek bir derecelendirme sistemi bulunmamaktadır. Sıklıkla kullanılan sistem tümör hücrelerinin anaplazi derecesini esas alır. Buna göre karsinomlar iyi, orta ve kötü diferansiye tümörler olarak gruplandırılır. Tümörün derecesi ve evresi arasında sıkı bir ilişki vardır. Tümör hücresinde anaplazinin kriterleri; epitelial hücre tabakası sayısının artması, anormal hücre olgunlaşması, dev hücreler, çekirdek/sitoplazma oranında artma, çekirdekçiğin belirginleşmesi, kromatin kümeleşmesi, hücre polaritesinin kaybı, mitotik bölünme sayısının artmasıdır. Mesane kanserlerinde en sık kullanılan dereceleme Dünya Sağlık Örgütü (WHO) dereceleme sistemidir (Yenice, 2008).

1.3.4.2.1. Papilloma (Derece 0 / G0)

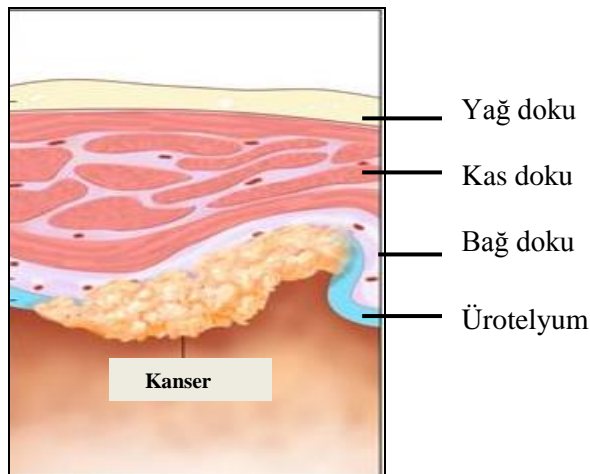
Normal mesane mukozasının ince fibrovasküler bir çekirdeği örtmesi ile oluşmuş papiller bir lezyondur. Papillomların yediden fazla epitelyal hücre tabakası yoktur ve histolojik olarak bir anormallik göstermezler (Yenice, 2008). G0 derecesi G0a (papiller karsinom) ve G0is (karsinoma in situ) olarak ikiye ayrılır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Mesane tümörü derecelendirme-G0 (NCI, 2013).

1.3.4.2.2. İyi Differansiye Tümörler (Düşük derece / G1)

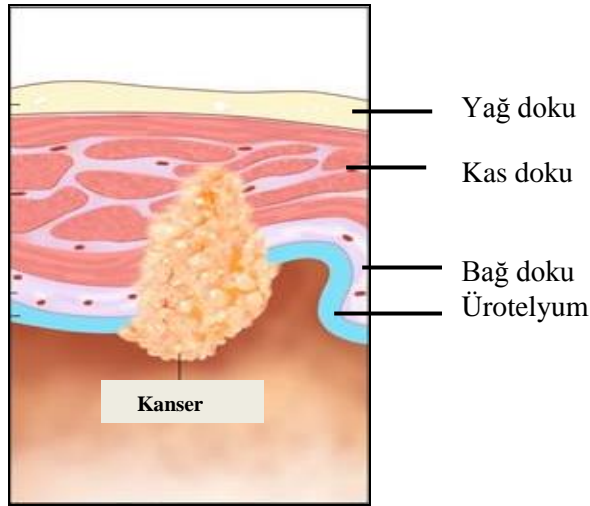
Tümör bağ dokuya yayılmıştır (Şekil 1.8). İnce fibrovasküler bir sap ve 7 tabakadan fazla hücreden oluşan kalınlaşmış epitel içerir. Hücreler sadece belirgin anaplazi ve pleomorfizm gösterirler. Çekirdek/sitoplazma oranı artmıştır. Nükleer membran belirgindir. Nadir mitotik şekillere rastlanır. Mukoza tarafından çevrelendikleri takdirde bunlar düşük malign potansiyeli olan papiller ürotelyal tümörler olarak adlandırılmaktadır (Yenice, 2008).



Şekil 1.8. Mesane tümörü derecelendirme-G1 (NCI, 2013).

1.3.4.2.3. Orta Derecede Diferansiye Tümörler (G2)

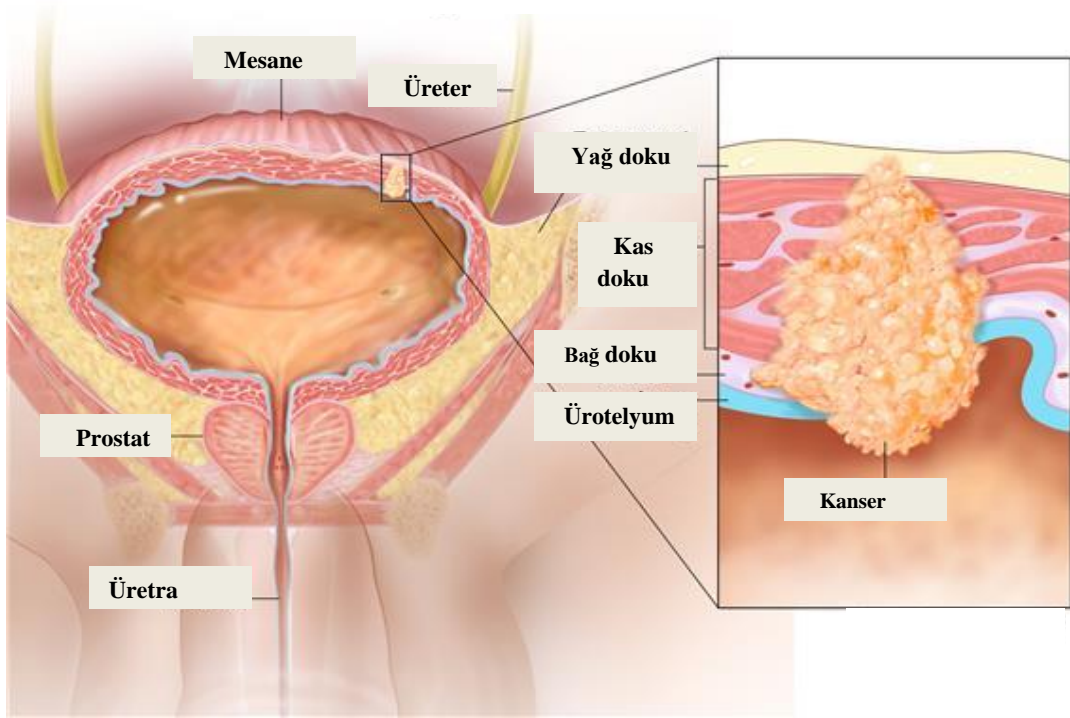
Tümör kas tabakasına invaze olmuştur (Şekil 1.9). Geniş fibrovasküler bir çekirdek içerirler. Tabandan yüzeye doğru hücresel olgunlaşma dağılımı daha fazla olan ve hücre polarite kaybı daha yüksek olan tümörlerdir. Çekirdek/sitoplazma oranı daha fazla olmakla birlikte, daha fazla nükleer pleomorfizm görülür ve çekirdekçik daha belirgindir. Mitotik Şekil lere daha sık rastlanır (Yenice, 2008).



Şekil 1.9. Mesane tümörü derecelendirme-G2 (NCI, 2013).

1.3.4.2.4. Kötü Diferansiye Tümörler (Yüksek derece /G3)

Tümör yağ tabakasına yayılmıştır (Şekil 1.10). Prostat, vajina, uterus gibi komşu organlara metastaz gerçekleşebilir. Tabandan yüzeye doğru gidildikçe hücrelerde farklılaşma görülmez. Yüksek çekirdek/sitoplazma oranıyla birlikte belirgin nükleer pleomorfizm göze çarpar. Mitotik şekillere sık rastlanır (Yenice, 2008).



Şekil 1.10. Mesane tümörü derecelendirme-G3 ve tümörün metastaz yaptığı organlar (NCI, 2013).

1.3.5. Mesane Kanseri Tümör Belirteçleri

Mesane kanseri tanısında altın standart yöntemi sistoskopi ve biyopsidir. Ancak sistoskopi pahalı ve invaziv bir yöntemdir. Bu özellikleriyle sistoskopi kasa invaze olmayan mesane kanserli hastaların takibinde hem maliyeti artırmakta hem de invazivliği ile hastaların kontrollere gelmek istememelerine neden olmaktadır. Bu sebeple farklı tümör belirteçlerinin bulunmasına yönelik araştırmalar artmıştır (Türkeri, 2012). Mesane tümörü tanısında kullanılmaya aday belirteçlerin duyarlılık ve özgüllüğü Tablo 1.3’de verilmiştir.

Mesane tümörü tanısında kullanılan idrar sitolojisi idrar ya da mesane yıkama sıvısında bulunan dökülmüş tümör hücrelerinin mikroskop altında tespitine dayanır. Özellikle mesane karsinoma in situ (CIS) olgularında, epiteldeki tümör hücreleri arasındaki bağlantıların kaybı sonucu çok sayıda atipik hücre idrarda yüzer halde bulunur. Bu da sitolojinin özellikle CIS olgularında ve yüksek dereceli mesane tümörlerinde yüksek duyarlılıkta tanı koymasını sağlar. Ancak düşük dereceli tümör tanısında bu denli başarılı değildir ve bu olgularda sitoloji sıklıkla negatiftir. Sitoloji ayrıca değerlendiren kişiye bağlı olup taze idrarda bakılmalıdır. Üriner enfeksiyonlar, intravezikal ilaç uygulamaları ve taş hastalığı idrar sonucunu etkilemektedir.

Öncesinde hasta hazırlığı gerektirmemesi, pahalı kitlere ihtiyaç duyulmaması ve kısa sürede yapılabilmesi bu yöntemin avantajlarından (Türkeri, 2012).

İdrarda insan kompleman faktör H bağımlı proteinin tespitine dayanan yöntemlerden biri olan BTA (mesane tümör antijeni) stat immünassay prensipleri ile idrar örneğinin kitin üzerine damlatılması ile yapılmakta ve kalitatif bir analizle protein tespiti yapılmaktadır. BTA-TRAK ise iki aşamalı bir ELISA testi olup kantitatif bir analiz yapılmaktadır. Her iki testin de duyarlılığı düşük olduğu için kullanım alanları kısıtlıdır (Türkeri, 2012).

Bir diğer mesane tümör belirteci olarak kullanılan yöntem NMP-22 (çekirdek matriks proteini) testidir. NMP hücre çekirdeğinin yapısal elemanlarından ve çekirdeğin bütünlüğünün korunmasında yardımcı olur. DNA replikasyonu ve gen ekspresyonunda görev alır. Tümör hücrelerinde nükleer mitotik aktivite artar ve NMP-22 hücrelerden salınır. Bu sebeple mesane kanserli hastaların idraraında sağlıklı kişilere oranla 25 kat fazla NMP-22' ye rastlanmaktadır. NMP-22 iki antikoru mikroliza testidir. Basit ve kolay kullanımı avantajıdır. Ancak taş hastalığı, benign prostat hiperplazisi (BPH), enflamasyon ve üriner sistem hastalığı testin özgüllüğünü düşürmektedir (Türkeri, 2012).

BLCA- 4 (Bladder cancer specific nuclear matrix protein 4) bir transkripsiyon faktörü olup fazla ekspresyonu hücrenin büyüme hızını artırır. Mesane tümörlü hastalarda mesanenin hemen tamamında bulunmaktadır. Ancak mesane tümörü olmayan hastalarda bulunmamaktadır. BLCA-4 uygulaması için özgüllüğü ve duyarlılığı oldukça yüksek olan indirekt eliza testi uygulanmaktadır. BLCA-1 yalnızca tümör alanlarında bulunan bir NMP' dir. İmmünassay yöntemi ile idrarda tespit edilmektedir. Duyarlılığı ve özgüllüğü BLCA-4 belirtecinden düşüktür (Van Le ve ark., 2005).

HA-HAase testi, hyaluronik asit ve hyaluronidazın idrardaki miktarını ölçen bir testtir. HA bir glikozaminoglikan olup pek çok tümör tipinde seviyesi artmıştır. HAase'ın HA'ı parçalamasıyla anjiojenik özellikli parçalar ortaya çıkar. Ha ölçümü ile tüm derecedeki mesane tümörleri tespit edilebilirken HAase ile yalnızca yüksek dereceli tümörler tespit edilebilmektedir. Bu testlerin duyarlılığı oldukça yüksek olmakla birlikte yüksek dereceli tümörlerde daha da artmaktadır (Lee ve ark., 2000).

Mesane tümörlerinde belirteç olarak kullanıma aday olan bir diğer yöntem ise mikrosatellit analizleridir. Mikrosatellitler genellikle 2-4 bç içeren DNA tekrarlarıdır. Mikrosatellitlerin yapısının bozulmasında heterozigotluk kaybı ve mikrosatellit

tekrar sayısının değişmesi gibi genetik değişiklikler rol oynamaktadır. Mesane kanserinde en sık görülen genetik değişiklik 9. kromozomdaki heterozigotluk kaybıdır. Mikrosatellit analizlerinde ne kadar fazla sayıda mikrosatellit araştırması kombine edilirse duyarlılık o kadar yüksek olacaktır (Türkeri, 2012).

ImmunoCYT, bir immünohistokimya yöntemi olup ürotelyal kanser hücrelerinde görülen antijenlerin monoklonal antikorlar ile tespit edilmesidir. Bu yöntem günümüzde en sık kullanılan yöntem olup floresan ile işaretlenmiş M344 ve LDQ10 antikorları kullanılmaktadır (Türkeri, 2012).

Tablo 1.3. Mesane tümörü tanısında kullanılmaya aday belirteçlerin duyarlılık ve özgülüğü (Türkeri, 2012)

Test	Duyarlılık (%)	Özgülük (%)
Sitoloji	11-76	➤ 90
BTA-stat	36-89	50-70
BTA-TRAK	57-83	50-90
NMP-22	47-100	60-90
BLCA-4	96,4	100
HA-HAase	83-94	77-84
Mikrosatellit DNA testi	72-97	80-100
ImmunoCYT	38-100	75-90

1.3.6. Mesane Kanserinde Moleküler Süreçler

Mesane kaynaklı malign tümörlerin çoğunluğu epitel kaynaklıdır ve histolojik olarak *ürotelyal karsinom* olarak tanımlanmıştır. Ürotelyal karsinom birbirinden farklı genetik özelliklere, biyolojik davranışa ve prognoza sahip farklı fenotipik gruplardan oluşan heterojen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır.

1.3.6.1. Kromozomların Sayısal ve Yapısal Anomalileri

Sayısal kromozom anomalileri çeşitli genetik alanların kopya sayısındaki değişiklikleri tanımlamaktadır. Mesanenin ürotelyal kanserlerinde kopya sayısındaki değişiklikler en çok 1., 8., 9., 10., 11., 13. ve 14. kromozomlar üzerinde saptanmıştır. Yapısal kromozom anomalileri ise kromozom üzerinde gen lokusu düzeyinde DNA kopya sayısında değişikliklere yol açan kromozom kayıplarını (delesyonlar), kazanımlarını (insersiyonlar), translokasyonlarını ve daha karışık düzenlemeleri içermektedir (Cheng ve ark., 2011).

Kromozom 9' un kısa ve uzun kolundaki delesyonlar mesane karsinogenezinde erken gerçekleşen olaylardır ve hiperplazi ve displazi fenotipik grupları arasında kromozom 9 delesyonları açısından fark saptanmamaktadır (Abraham ve ark., 2007). Kromozom 9 kayıplarının potansiyel tümör baskılayıcı genler nedeniyle önemli olduğu, her iki allelde ortaya çıkan kayıp sonrası tümör baskılayıcı proteinlerin üretiminin durması ile malign dönüşümün ortaya çıktığı savunulmaktadır (Abraham ve ark., 2007).

Mesane kanserinde en sık görülen kromozom anomalilerinden biri 9. kromozomun uzun kolunda (9q) ortaya çıkan kayıplardır. Mesane tümörü ile 9q kayıpları arasındaki bu ilişki, etkilenen bölgede farklı tümör baskılayıcı genlerin varlığını düşündürmüş olup, TSC1, PTCH1 ve DBC1 genleri bu bölge ile ilişkilendirilen tümör baskılayıcı genlerdir (Pollard ve ark., 2010). TSC1 (tüberoz skleroz kompleksi 1) geni 9q34 bölgesinde yer alır ve hamartin isimli proteinin sentezinden sorumludur. TSC1 geninde meydana gelen missense mutasyonların mesane kanser hücrelerinde TSC1 proteinin yerleşimini bozduğu ortaya çıkarılmıştır (Pymar ve ark., 2008). Gorlin Sendromu geni olarak da isimlendirilen PTCH1 (patched homologue 1) geni 9q22 bölgesinde lokalizedir. Mesane kanserinde yapılan 9q22.3-q31 bölgesine yönelik mikrosatellit analiz çalışmalarında PTCH1 geninin lokalize olduğu 9q22.3 bölgesinde delesyonların yoğunlaştığı gösterilmiş olup bu tümör baskılayıcı genin ürotelyal kanserin gelişimi için önemli olabileceği vurgulanmıştır (Pollard ve ark., 2010). DBC1 (deleted in bladder cancer gene 1) geni ise non-apoptotik hücre ölümünü ve hücrelerin G1 fazında tutulmasını düzenleyen bir gendir. 9q32-q33 lokusunda bulunan bu tümör baskılayıcı genin ürotelyal karsinomda parsiyel delesyonlara uğradığı, mRNA ekspresyonunu yitirdiği ve hatta bu genin hipermetilasyonunun ortaya çıktığı daha önce yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Pollard ve ark., 2010 ve Habuchi ve ark.,1998).

9. kromozom kısa kolu üzerinde ortaya çıkan delesyonların da mesane kanseri gelişiminde rol oynadığı tespit edilmiştir. Özellikle 9p21 bölgesinde lokalize olan CDKN2A ve CDKN2B genleri tümör baskılayıcı gen ailesinden olup homozigot delesyon ile inaktive olmaktadır. Bu inaktivasyon ile hücre döngüsünü kontrol eden p16 ve p15 proteinlerinin sentezi bozulmaktadır. Bu proteinler önemli potansiyel tümör baskılayıcılarıdır, çünkü her ikisi de hücre döngüsünde negatif düzenleyiciler olarak görev almakta olup, siklin D-siklin bağımlı kinaz-4 kompleksinin aktivitesini inhibe ederek hücre çoğalmasını G1 fazında

durdurmaktadır. CDKN2A ve CDKN2B genlerindeki tek ya da her iki alleldeki delesyonlar mesanenin hem ürotelyal karsinomu hem de skuamöz hücreli karsinomunda görülmektedir. Mikrosatellit belirleyiciler ile yapılan kromozom haritalama çalışmalarında karsinoma in situ lezyonlarında yüksek oranda 9p21 bölgesinde yer alan tümör baskılayıcı gen kaybı olduğu gösterilmiştir (Türkeri, 2012). Kromozom 9 üzerinde yapılan mesane kanseri ile ilgili çalışmalara genel bakıldığında 9q' da meydana gelen heterozigotluk kayıplarının 9p' deki kayıplara oranla daha fazla prognostik değer taşıdığını göstermektedir (Türkeri, 2012).

Mesane kanseri ile ilişkili diğer kromozom anormalilerinin başında izokromozom 5p, 17p delesyonu ve trizomi 15 gelmektedir. Ayrıca karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda 2., 4. ve 5. kromozomlarda kayıplar; 7 ve 22. kromozomlarda kazanımlar ortaya çıktığı ve bu değişimlerin yüksek dereceli histopatolojik derece ile ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır (Nishiyama ve ark., 2011).

1.3.6.2. DNA Dizilim Anomalileri

Genomun DNA dizilimindeki değişikliklerin ortaya çıkışı mutasyonlar sonucu oluşmakta ve işlev kaybına ya da işlev kazanımına sebep olmaktadır. Ürotelyal karsinom ile ilişkili mutasyonlar arasında en önemlileri p53' ün işlev kaybı ve FGFR3' ün işlev kazanımı ile sonuçlanan mutasyonlarıdır.

Mesane kanseri ile ilişkisi gösterilmiş mutasyonlardan biri H-ras geninin 12, 13, 59 ve 61. kodonlarında oluşan mutasyonlar, ürotelyal kanserlerde % 30-40 oranında görülmektedir ve bu mutasyonlar arasında en sık görüleni 12. kodonda guanin yerine timin gelmesi (G-T) ile oluşan nokta mutasyonudur. Bu mutasyonlar sonucunda gen aktifleşmekte, genin ürününün aşırı üretimi meydana gelmekte ve hücre çoğalması hızlanmaktadır. H-ras geninde meydana gelen bir diğer mutasyon ise D intronu bölgesinde 2719. pozisyonda adenin yerine guanin gelmesi (A-G) ile oluşan nokta mutasyonu olup ras geni ürünü olan p21 proteini düzeyinde 10 kat artışa sebep olmakta ve bu mutasyonu gösteren mesane kanserinin büyük kısmı kasa invaze tümörlerden oluşmaktadır (Türkeri, 2012).

FGFR3 (fibroblast büyüme faktör reseptörü 3); embriyolojik gelişim, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, hücre çoğalması ve anjiyogenez için kritik öneme sahip yapısal olarak korunan tirozin kinaz reseptör gen ailesinin 4 üyesinden birisidir ve 4p16.3 kromozomu üzerinde lokalizedir. Bu genin kodladığı 806 aminoasitlik protein fibroblast büyüme faktörü reseptör ailesine aittir. Ürotelyal karsinomlar

arasında düşük dereceli kasa invaze olmayan papiller tümörlerin % 70' inden fazlasında FGFR3 mutasyonları saptanırken invaze tümörlerde ise bu oran sadece %20-30' dur. Aktive olmuş FGFR3 mutasyonu en sık G1 dereceli mesane tümörlerinde gözlenmiş olup düşük dereceli tümörlerle FGFR3 ekspresyonu arasında güçlü bir korelasyon saptanmıştır (Lindgren ve ark., 2006).

Bir tümör baskılayıcı gen olan p53 mutasyonları birçok tümörün gelişiminde rol oynadığı gibi mesane tümörlerinde de en sık görülen genetik değişikliklerden biridir. P53 geni 17p13.1 bölgesinde lokalizedir ve kodladığı 363 amino asitlik protein hücre döngüsünün G1/S geçişinde anahtar rol oynayarak DNA tamirini ve apoptozu düzenler. Mesane kanserindeki p53 inaktivasyonu özellikle 5-11. ekzonlarda ve 280. ile 285. kodonlarda olan değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Ürotelyal kanserlerdeki p53 mutasyonları genellikle işlev kaybına yol açan mutasyonlar şeklinde gerçekleşmekte ve p53' ün hedef DNA bölgesine bağlanmasını engelleyerek etki etmektedir (Türkeri, 2012). Kromozom 17p kayıpları ve p53 mutasyonları özellikle ileri evre ve yüksek dereceli tümörlerde görülmekte, yüzeysel tümörlerde daha az saptanmaktadır. Ancak yüzeysel tümörlerde p53 mutasyonlarının varlığı prognoz açısından çok önemli görülmektedir.

Retinoblastoma geni (RB1); hücre gelişiminde, farklılaşmasında, hücreler arası etkileşimde, hücre yaşlanması ve apoptozda önemli rol oynayan 13q14 bölgesinde lokalize olan bir gendir. RB1 de ortaya çıkan mutasyonlar hücre döngüsü kontrolünün kaybı ile sonuçlanır. RB1 tümör baskılayıcı geninin kaybı primer mesane kanserlerinin %20-30' unda gözlenmekte ve bu durum özellikle invaziv ve yüksek dereceli tümörlerde dikkati çekmektedir. Heterozigotluk kaybı gibi RB1 genine ait somatik defektler ürotelyal kanserlerde sıkça rastlanmakta olup özellikle de invaziv tümörlerle ilişkilidirler (Türkeri, 2012).

1.3.6.3. Mikro-RNA Regülasyon Kaybı

Mikro-RNA (miRNA), 22 nükleotid uzunluğunda gen ekspresyonuyla ilgili RNA parçaları olup protein kodlamasından bağımsızdırlar. Bu farklı özellikteki RNA' ların aşırı üretimi farklı genler üzerinde etki göstererek tümör oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. miRNA' ların bir kısmı tümör baskılayıcı gen olarak hareket ederken bir kısmı ise onkogen olma özelliğine sahiptir. Ürotelyal kanserlerde miRNA anormalliklerinin sık görülen ve erken dönemde ortaya çıkan değişiklikler olduğu saptanmıştır (Catto ve ark., 2009). Düşük dereceli tümörlerde birçok miRNA molekülü ekspresyon düzeylerinde düşük saptanmaktadır. Düşük dereceli tümörlerde

özellikle miRNA 99a/100 kayıplarının mutasyondan önce FGFR3 molekülünde artışa yol açtığını göstermiştir. Yüksek dereceli tümörlerde ise en önemli değişikli miRNA 21’de olup sonuçta p53 işlevinde baskılanma gerçekleşmektedir.

1.3.6.4. Mesane Kanserinde Epigenetik Değişiklikler

Mesane kanserine ilişkin epigenetik değişiklikler organda yerleşik tümör dokusunda ve idrar, serum ve mesane yıkama sıvısında tespit edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda mesane kanseri tanısına yönelik değerlendirmede, idrarda DNA metillenmesinin tespitini idrar sitolojisinden daha duyarlı olduğu bulunmuştur (Dulaimi ve ark., 2004 ve Renard ve ark., 2010). Yakın zamanda idrar örneklerinde TWIST1 ve NID2 genlerindeki promotor metillenmesinin çok yüksek oranda duyarlılık ve özgüllükle tanı için kullanılabileceği gösterilmiştir (Costa ve ark., 2010). Bir zar proteini olan NID1 doku yapısı, hücre polarizasyonu, invazyonla ve bir transkripsiyon faktörü olan TWIST1 antiapoptotik ve prometastatik özellikleriyle bilinen moleküllerdir ve farklı epitel kanserlerinde normal dokuya göre daha yoğun ifade edildikleri rapor edilmiştir. Bunların yanı sıra, hücre çoğalmasının denetiminde görevli TMEFF2 adlı transmembran protein, hücre iskeleti bileşenlerinden intermedyan filament olan vimentin-VIM geni ve homeostaz, normal embriyonik gelişim ve farklılaşmada görevli bir molekül ailesi olan TGF- β 'nın bir üyesini sentezleyen GDF15' in metillenmesinin yine mesane kanserinde belirteç olabileceği belirtilmiştir (Maruyama ve ark, 2001). Çalışmada bu üçlü panelin mesane kanseri hastalarını sağlıklı bireylerden ayırt etme duyarlılığı ve özgüllüğü % 90'ı aşmış olarak bildirilmiştir. Bu nedenle idrarda rutin tarama için kullanımının uygun olabileceği öne sürülmüştür.

Mesane kanserinde erken tanı dışında prognoza yönelik olarak da epigenetik değişikliklerin kullanılabileceğini gösteren sonuçlar elde edilmiştir. CDH1, CDH13, APC ve RASSF1A genlerinde promotor metillenmesinin kötü prognoza işaret eden histolojik belirteçlerle anlamlı olarak ilişkili olduğu bildirilmiştir (Schneider ve ark., 2011).

DNA metillenmesinin yanı sıra histon değişikliklerinden histon 3 4. pozisyondaki lizinde monometillenme (H3K4me1), histon 4 20. pozisyondaki lizinde mono-, di- ve trimetillenmenin (H4K20me1, H4K20me2 ve H4K20me3) ileri patolojik evreyle ilişkili olduğu, H4K20me3'ün kasa invaze olmuş mesane kanserinde hastalısız sağkalım yönünde anlamlı bir prognoz belirteci olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (Jeronimo ve ark., 2011).

1.4. Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları

Mikrosatellitler basit olarak nükleotid dizi tekrarlarının rastgele düzenlenmiş çok sayıda kopyalarından meydana gelir. Bu dizilerdeki nükleotit sayısı 2–6 arasında değişmektedir (CA, ACA, GATA gibi). Yüksek derecede polimorfiktirler ve önemli bir genetik işaretleme sistemini oluştururlar (Aksakal ve ark., 2008). STR (Kısa Ardışık Tekrarlar) ya da SSR (Basit Ardışık Tekrarlar) olarak da adlandırılan mikrosatellitler 80’li yılların sonlarından itibaren çalışmalarda genetik belirleyici (marker) olarak kullanılmaktadır (Meydan, 2008).

Mikrosatellitler kromozomların bütün bölgelerinde dağılmışlardır. Bunlar genleri kodlayan bölgeler, DNA’nın kodlanmayan intron bölgeleri ve gen olmayan nükleotid diziler içerisinde bulunur. Birçok mikrosatellit bölgesi bir kaç bazdan birkaç yüz baza kadar değişen küçük nükleotid dizi tekrarlarıdır. Çalışma amacına göre kullanılacak mikrosatellit bölgelerin seçiminde dikkate alınan bazı kriterler vardır. Çalışılan mikrosatellit bölgelerin farklı kromozom bölgeleri üzerinde ve polimorfizm düzeyinin yüksek olması, heterozigotluk düzeylerinin yüksekliği, allel sayısı ve uzunluklarının birbirine olan uzaklıkları göz önüne alınarak seçilmelidir. Özellikle tür bazındaki mikrosatellit bölgeler çok benzerlik göstermektedir (Aksakal ve ark., 2008). Mikrosatellitler genom içerisinde mono, di, tri ya da tetra nükleotid permütasyonların herhangi bir formu şeklindedir ve omurgalılarda mikrosatellitlerin büyük çoğunluğu (%30-67) dinükleotid tarzında bulunur. Primatlarda ise mononükleotid olarak bulunurlar (Meydan, 2008). Mikrosatellitler prokaryot ve ökaryot genomun herhangi bir bölgesinde bulunabilmektedir. Prokaryotlarda birçok biyolojik fonksiyona sahip olduğu halde ökaryot hücrelerde rolü tam olarak bilinmemektedir. Mikrosatellit belirleyiciler, yaygın olarak 2 nükleotidli tekrarlardan [(CA)_n] oluşmakla birlikte farklı formlarda da bulunabilmektedir (Özşensoy ve Kurar, 2012).

Mikrosatellitlerle ilgili en belirgin dezavantaj, bir türe ait yeni mikrosatellitlerin elde edilmesidir. Bu işlem çoğunlukla zaman alıcı olup fazla miktarda emek gerektirir (Ün ve ark. 2000).

Mikrosatellitler yüksek oranda polimorfik olmalarından ve her bir test için küçük miktarlarda DNA’nın yeterli olmasından dolayı linkage haritalarında ana marker olarak kullanılmaktadır (Ün ve ark. 2000).

Mikrosatellitlerde tekrar sayıları her bireyin kendine özgüdür. Bu nedenle bireylerin tanımlanmasında kullanılırlar. Aynı zamanda mikrosatelit allelleri biri anadan diğeri

babadan olmak üzere ikisi de dominant karakterde olan allellerdir. Bu nedenle mikrosatellitler ebeveyn tayinlerinde kullanılmaktadır (Ün ve ark. 2000).

Kanser taramalarında, mikrosatellitlerde meydana gelen yapısal değişiklikler kullanılarak hızlı ve güvenilir metodlar geliştirilebilmiştir (Ün ve ark. 2000). Mesane, kolon, mide kanseri gibi birçok kanser türünün teşhisinde mikrosatellit markırlara başvurulmaktadır.

Bu çalışmada, mesane kanserinde 20q11-13 bölgesinde meydana gelen heterozigotluk kayıplarının analiz edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen verilere göre bu bölgede görülen heterozigotluk kaybı ile mesane kanserinin patojenitesi arasındaki korelasyonun saptanması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda mesane kanseri teşhisi konan 33 hastanın mesanesinden cerrahi yöntemle alınan tümörlü ve komşu normal dokular karşılaştırılarak 20q11-13 bölgesindeki LOH profili analiz edilmiş ve bu bulgularla hastaların klinik-patolojik bilgileri arasındaki korelasyon belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen veriler ve yapılan istatistiksel analizler sonucunda, 20q11-13 bölgesinde mesane kanseri ile ilişkili olabilecek inaktive olmuş aday tümör baskılayıcı genlerin saptanmasına yönelik ileriki çalışmalara ön veri sunulmuş ve böylece mesane kanserinde moleküler tanı tekniklerinin ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi için başvurulabilecek bir kaynak olarak literatüre eklenmiş olacaktır.

BÖLÜM II

KAYNAK ÖZETLERİ

Mesane tümörü progresyonunda 5. kromozom kısa kolu üzerindeki delesyonların kritik bölgelerini tespit etmek amacıyla 33 mesane tümöründe 7 mikrosatellit markırıyla LOH analizi yapan Böhm ve ark. (2000), 5p15 bölgesine ait markırlarda LOH gözlendiğini rapor etmişlerdir.

Louhelainen ve ark. (2000) 5 multifokal mesane tümöründe 1., 3., 5., 7., 9., 11., 13., 17. ve 18. kromozomları kapsayan 87 mikrosatellit markır kullanarak ardışık allelik kayıpları çalışmışlardır. Multifokal mesane tümörlerinin gerçek anlamda monoklonal olup olmadığını test etmek için yapılan bu çalışmada kapsamlı bir istatistiksel analiz neticesinde multifokal mesane tümörlerinin çoğunun monoklonal orijine sahip olduğu rapor edilmiştir.

Sengelov ve ark. (2000) tarafından ileri ürotelyal kanser görülen hastalardaki spesifik genetik değişikliklerin tanımlanması ve bu değişikliklerle kemoterapi duyarlılığı arasındaki ilişkinin analiz edilmesi amacıyla yapılan çalışmada, kemoterapi altındaki 56 hastadan alınan kasa invaze mesane tümöründe 6 mikrosatellit markır kullanılarak 1p, 8p, 10p, 13q ve 17p bölgelerinde heterozigotluk kaybı analizi yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda en yüksek LOH oranı 17p (%50) bölgesinde bulunmuştur. 13q bölgesinde meydana gelen kayıplar tek başına olmamakla birlikte ya 8p (%35) ya da 10p (%31) deki kayıplar ile birlikte gözlenmiştir. 1p bölgesinde ise %20 oranında kayıp gözlenmiştir. Saptanan bu kayıplar ile kemoterapi duyarlılığı veya prognoz arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Uchida ve ark., (2000) 45 transizyonel hücre karsinomu olan mesane tümöründe 18q21.1, 9p21-22 ve 17p13.1 bölgelerine ait toplam 8 markırıyla LOH çalışmış ve bunları klinik sonuçlarla karşılaştırmışlardır. Yapılan bu mikrosatellit analizi sonuçları 18q21.1, 9p21-22 bölgelerinde tespit edilen heterozigotluk kayıpları ile klinik veriler arasında anlamlı ilişki bulunmuş olup mesane kanserli hastalarda LOH analizinin prognostik faktörlerin tespiti için klinik açıdan yararlı olabileceği görüşünü bildirmişlerdir

RB tümör baskılayıcı geni inhibisyonunun üriner mesane tümörü patogenezindeki öneminin ortaya çıkması üzerine 13q11-32 bölgesindeki allelik kayıpların mesane kanseri ve tümör derece ve evresiyle ilişkisini açıklayan bir çalışma yapan Wada ve ark. (2000), 236 transizyonel hücre karsinomunda LOH analizi yapmışlardır. 13q14.3 bölgesinde tespit edilen LOH ile T_a G₂ derece ve evresindeki tümörler arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak önemli olduğunu rapor etmişlerdir.

Yang ve ark. (2000), 25 mesane tümöründe yüksek dansiteli mikrosatellit markırlar kullanarak tümör baskılayıcı gen adayı olan DBH genini içeren 9q bölgesinde LOH analizi yapmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda DBH geni ve komşu gen bölgesi olan 9q34 bölgesindeki değişikliklerin mesane kanseri onkogenezinde önemli rol oynadığı vurgulanmıştır.

Försti ve ark., (2001) meme ve mesane tümörlerinin mikroskopik olarak normal olan çevre dokularında ve tümörlü dokularda heterozigotluk kayıplarını tespit ederek tümör oluşumunda öncü olup olmadığını rapor etmişlerdir. 6 mesane tümöründe 3. ve 9. kromozoma ait toplam 49 mikrosatellit markırlarla LOH çalışılmıştır. Hem normal hem de tümörlü dokuda 3. kromozomda 10 örnekte, 9. kromozomda 27 örnekte LOH gözlenmiştir ve bu değişikliklerin tümörleşme sürecinde öncülük eden ilk değişiklikler olduğunu rapor etmişlerdir.

81 ileri transizyonel hücreli mesane karsinomunda 9q bölgesinin heterozigotluk kaybı analizi yapan Kimura ve ark. (2001), tümör örneklerini yaklaşık % 51 lik kısmında LOH tespit etmiştir ve meydana gelen LOH ile tümör derecesi ve evresi arasında anlamlı ilişkiye rastlanmadığını rapor etmişlerdir.

Kromozomal instabilitenin mesane kanserinde yaygın olarak görülmesi ve bu instabilitenin mitotik kontrol noktasındaki genlerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanması bilgisi doğrultusunda Olesen ve ark. (2001), 15 mesane tümöründe ve 6 anöploid mesane kanseri hücre hattında mitotik kontrol noktası genleri olan hBUB1, hBUB1B, hBUB3 ve TTK genlerindeki mutasyonları ve genetik stabiliteyi analiz etmişlerdir. Bu dört gende herhangi bir mutasyon gözlenmemesine rağmen hBUB1B, hBUB3 ve TTK genlerinde LOH' a rastlanmadığı rapor edilmiştir.

Yoon ve ark. (2001) 16. kromozom üzerinde yaptıkları LOH analizi sonucunda 28 invaziv mesane tümöründe 16q12.1 bölgesinde LOH saptamıştır.

FHIT geni 3. kromozom kısa kolu üzerinde bulunan üçlü histidin gen ailesinin bir üyesidir. Akciğer kanseri, renal hücreli karsinom, meme kanseri, over kanseri ve

özofagus skuamoz hücreli karsinom gibi bazı kanser türleriyle *FHIT* geninin inaktivasyonu ilişkili bulunmuştur. Wada ve ark. (2001) *FHIT* genini de içeren 3p bölgesine ait 7 mikrosatellit markırla 151 mesane tümöründe LOH analizi yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda LOH 3p11-12, 3p22-24.2 ve *FHIT* genini içeren 3p14.1 bölgelerinde en sık bulunmuştur. Ayrıca 3p11-12 bölgesinde tespit edilen kayıplar ile mesane kanseri progresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Natrajan ve ark. (2003), farklı derece ve evredeki 51 mesane tümöründe 26 polimorfik markırla 15q bölgesinin LOH analizini yaparak delesyonları haritalamışlardır. 15q14-q15.3 bölgesinde 20 (%39) tümörde LOH saptanmıştır. Delesyon haritalama ile 15q15.1-15q15.3 ve 15q14 bölgelerinde yoğun olarak bulunan delesyonları tanımlamışlardır.

99 mesane tümöründe 8. kromozom kısa kolu üzerinde LOH ve FISH analizlerini çalışan Stoehr ve ark. (2004), invaziv tümör gelişimi ile 8p kayıpları arasında önemli bir korelasyon saptamışlardır.

Adams ve ark. (2005), mesane kanserli hastalardan alınan tümör dokularında 8p nin proksimal bölgesinde LOH analizi; 13' ü transizyonel hücre karsinomu olan toplam 14 hücre hattında ise FISH analizi yapmıştır. Bu analizler sonucunda 8p' nin proksimalinde heterozigotluk kaybına rastlanmış ve 8p bölgesindeki sitogenetik bozulmalar FISH analizi ile desteklenmiştir.

Jones ve ark. (2005) 24 mesane kanserli hastada lenf nodüllerine metastaz yapmış mesane tümörlerinin klonal kökenini araştırmış ve aynı hastalardan alınan primer tümörlerin kökeni ile karşılaştırmıştır. 9p21, 9q32 ve 17p13 bölgelerine ait mikrosatellit markırlar kullanılarak tespit edilen allelik kayıplar ve X kromozomu inaktivasyon testi doğrultusunda primer mesane tümörleri ile lenf nodüllerine metastaz yapmış tümörlerin aynı klonal orijine sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Mısır' da hiperendemik olarak görülen ve yüksek oranda mortalite ve morbiditeye sahip *Schistosoma haematobium* türü parazitle taşınan şistozomiyozis enfestasyonunun sonuçlarından birisi ise mesane kanseri insidansında görülen artıştır. Şistozomal enfestasyonla mesane kanseri arasındaki ilişkiyi temel alan çalışmada Wahab ve ark. (2005), 42 mesane tümörü (şistozomal olan ve şistozomal olmayan) ile 8 ve 9. kromozomda 8 polimorfik markır kullanarak LOH analizi yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda en yüksek LOH insidansını D8S84 ve D9S126 bölgelerinde tespit etmişlerdir. 8. kromozomda meydana gelen LOH ların %67' si şistozomal bağımlı iken %80' i şistozomal olmayan mesane kanserinde görülmüştür.

Nitekim 9. kromozomda tespit edilen kayıpların %30' u şizozomal ve % 50' si şizozomal olmayan mesane kanserinde görülmüştür. İstatistiki açıdan ise mesane kanseri ile şiztomiyozis arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır.

Mesane kanserinde 6p21.3 bölgesindeki heterozigotluk kaybı ile HLA Sınıf I ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, Maleno ve ark. (2006), LOH ve HLA genomik tiplendirme metodlarının, HLA Sınıf I ekspresyonundaki farklı modifikasyonların tamiri için terapötik strateji geliştirmede önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Maleno ve ark., (2011) kolon, mesane, renal karsinom ve melanomadan oluşan tümör dokularında β 2-mikroglobulin geni ile ilişkili 15q21 lokusunda LOH analizi yapmışlardır. Mesane karsinomlarında 15q21 bölgesinde %44 oranında LOH saptamışlardır.

BÖLÜM III

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Mesane kanserli hastalarda 20q11-13 bölgesinde meydana gelen heterozigotluk kaybının analiz edilmesi için Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 10-2011/174 nolu karar ile izin alınmıştır. Çalışmaya Temmuz 2012-Nisan 2013 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda mesanelerine TUR (transüretral rezeksiyon) yapılmış ve mesane tümörü tanısı almış 33 olgu çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

- Sıvı azot tankı (Statebourne Bio 3, Amerika)
- Sıvı azot (Koçerler, Türkiye)
- Homojenizatör (IKA / Ultra-Turrax, Çin)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific, Amerika)
- Isı bloğu (Wealtec, Amerika)
- Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)
- UV translüminatör (Bio-Rad, Almanya)
- Gradyanlı termal döngü cihazı (Takara, Japonya)
- Yatay elektroforez sistemi (Cleaver, İngiltere)
- DNA sekans analiz sistemi (Sequi-Gen GT Electrophoresis System, Bio-Rad, Almanya)
- Ultrasonik sonikatör (Selecta, İspanya)
- Çalkalayıcı (Selecta, İspanya)
- Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Lab. Companion, Kore)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Dijital kamera (Sony, Japonya)
- Röntgen ışık kutusu (Seica, Amerika)

- Etanol (%96) (J.T. Baker, Amerika)
- DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya)
- 10X tampon (New England Biolabs, Amerika)
- MgCl₂ (New England Biolabs, Amerika)
- dNTPs (Vivantis, Amerika)
- Taq DNA polimeraz (New England Biolabs, Amerika)
- İleri ve geri primerler (Alpha DNA, Kanada)
- Formamid (Sigma, Amerika)
- Agaroz (peqGOLD, Amerika)
- Etidyum bromür (EtBr) (Merck, Amerika)
- 50 bç' lik DNA Ladder (Thermo Scientific, Amerika)
- Gümüş nitrat (Merck, Amerika)
- Sodyum hidroksit (Tekkim, Türkiye)
- Formaldehit (%37) (Tekkim, Türkiye)
- Asetik asit (%99) (Sigma, Amerika)
- Üre (8M) (Sigma, Amerika)
- TEMED (Roth, Almanya)
- Dimetildiklorosilan (Sigma, Amerika)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

- PBS tamponu:
 - NaCl (Merck, Amerika) 8 g
 - KCl (Merck, Amerika)0,2 g
 - Na₂HPO₄ (Merck, Amerika).....1,44 g
 - KH₂PO₄ (Merck, Amerika)0,24 g
 - 1000 ml distile suda çözünerek pH 7,4' e ayarlanır.
Otoklavlanarak +4 °C' de saklanır.
- 10X TBE Tamponu:
 - Tris (Amresco, Amerika)108 g
 - Borik asit (Scharlau, İspanya).....55 g
 - EDTA (Merck, Almanya)9,37 g
 - 1000 ml distile suda çözünerek pH 8,4' e ayarlanır.
Otoklavlanarak +4 °C' de saklanır.

- 6X Yükleme tamponu (Sambrook ve Russel, 2001):
 - Bromofenol mavisi (Merck, Amerika)%0,025
 - Ksilen siyanol FF(ABCR, Almanya).....%0,025
 - Süktroz (Fluka, Amerika).....%40
- Akrilamid stok solüsyonu (%30):
 - Akrilamid (Roth, Almanya).....29 g
 - Bis akrilamid (Vivantis, Amerika).....1g
 - Distile su100 ml
- APS stok solüsyonu (%10):
 - Amonyum persülfat (ABCR, Almanya)0,10 g
 - Distile su.....1 ml
- Bağlanma solüsyonu:
 - Asetik asit(%99) (Sigma, Amerika).....25µl
 - Metakriloksipropiltrimetoksilan(Merck, Almanya)....15 µl
 - Absölü etanol (J.T. Baker, Amerika)5 ml
- 6X Yükleme tamponu:
 - Bromofenol mavisi (Merck, Amerika).....%0,01
 - Ksilen siyanol FF(ABCR, Almanya).....%0,01
 - EDTA (Merck, Almanya)20 mM
 - Formamid (Sigma, Amerika).....%80

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Doku Örneklerinin Toplanması ve DNA İzolasyonu

Gaziantep Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı' nda mesane tümörü teşhisi konmuş hastalardan TUR ile alınan tümörlü ve biyopsi ile alınan komşu sağlıklı doku örnekleri kriyo tüplere alınarak direkt olarak sıvı azot tankına yerleştirilmiştir. Sıvı azot tankında Biyoloji Bölümü DNA Analiz Laboratuvarı'na getirilen doku örnekleri - 80 °C' de muhafaza edilmiştir. Taze doku örneklerinden DNA izolasyonu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- -80 °C' den alınan doku örnekleri tartılarak 25 mg' ı geçmeyecek Şekil de ependorf tüplerin içerisine alındı.
- Dokuların üzerine dokunun ağırlığına göre miktarı değiştirilerek PBS tamponu eklendi (25 mg için 80 µl PBS).

- PBS tamponu içinde dokular homojenizatörle homojenize edilip fiziksel parçalanma tam olarak gerçekleştikten sonra üzerine doku parçalama tamponu (25 mg için 100 µl) ve proteinaz K (25 mg için 20 µl) eklendi.
- Elde edilen karışım vortekslenerek ısı bloğunda 56 °C’ de bir gece inkübe edildi.
- Daha sonra kısa bir santrifüj edildi ve lizis tamponu eklenerek (25 mg için 200 µl) 15 sn ara ara vortekslendi ve 70 °C’ de 10 dk inkübe edildi.
- İnkübasyonu takiben %96’ lık etanol eklenerek (25 mg için 200 µl) 15 sn vortekslendi, kısa santrifüj edildi.
- Ependorf tüpteki örnekler 2 ml’ lik toplama tüpünde yer alan mini spin kolona dikkatlice aktarılıp 8000 devir/dk’da 1 dk santrifüj edildi. Mini spin kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.
- AW1 tamponu eklenerek (25 mg için 500 µl) 8000 devir/dk’da 1 dk santrifüj edildi. Mini spin kolon yeni bir toplama tüpüne alındı. AW2 tamponu eklenerek (25 mg için 500 µl) 14000 devir/dk’da 3 dk santrifüj edildi.
- Mini spin kolon yeni bir ependorf tüpe alındı ve yıkama tamponu eklenerek (25 mg için 500 µl) oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Ardından 8000 devir/dk’da 1 dk santrifüj edildi.
- Son basamak tekrar edildi ve ependorfta toplanmış olan çözünmüş DNA örnekleri – 20 °C’ de muhafaza edildi.

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA örneklerinin spektrofotometrede 260/320 nm’ de ölçüm yapılarak kantitatif olarak konsantrasyonları tayin edilmiştir.

3.2.2. PCR Amplifikasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi

DNA izolasyon aşamasını takiben polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile DNA örneklerinin amplifikasyonu sağlanmıştır. PCR çalışması yapılan polimorfik mikrosatellit markırlara ait baz dizilimleri NCBI veri tabanından (www.ncbi.nlm.nih.gov) elde edilmiştir. Bu markırların baz dizilimleri ve ürün büyüklükleri Tablo 3.1’ de verilmiştir.

Tablo 3.1. PCR döngüsü yapılan mikrosatellit markırların baz dizilimleri ve ürün büyüklükleri

Primer Adı		Primer Baz Dizisi	PCR ürün büyüklüğü (bp)
D20S118	İleri	5'-AGCTATATTTGTCAATGTGAGTTGT-3'	169-179
	Geri	5'-GTCCGTGATAGAGCAGAGTG- 3'	
D20S872	İleri	5'-GGTTCCCAAACAACATCCTG- 3'	180-218
	Geri	5'-AGGACTCTTCCAAAAGTGGCT- 3'	
D20S174	İleri	5'-GGCTGATTTCTATAACACAGCACAA- 3'	277-305
	Geri	5'-TCATACAGACCTACTGGGGCAC- 3'	
D20S465	İleri	5'-GACAAATTTCTGGGCTGGC- 3'	219
	Geri	5'-AAAATGTCCAGGCAACAGAG- 3'	
D20S481	İleri	5'-TGGGTTATGAGTGCACACAG- 3'	217-253
	Geri	5'-AACAGAAAAGACACACAGC- 3'	
D20S891	İleri	5'-GCAAGCATCTACAAGGCTCTTCAT- 3'	190-216
	Geri	5'-CTACAGGTGAGCGCCACCAT- 3'	
D20S468	İleri	5'-GGATATTGGGGCCACTGC- 3'	194-212
	Geri	5'-TACCTAGTGACCAAAGGTTTCC- 3'	
D20S171	İleri	5'-TATAGGTGAGGACCCTGAGG- 3'	123-149
	Geri	5'-ACACCAAGCCATGTAACCTG- 3'	
D20S443	İleri	5'-GAACCAAGGAAGTTGTTCAAC- 3'	140
	Geri	5'-TTGCTCCAACCAGGAGGCA- 3'	

Yapılan gradyanlı PCR çalışması sonucunda Tablo 3.2' de verilen PCR reaktiflerinin miktarları modifiye edilerek her primer için optimum PCR koşulları belirlenmiş olup; primer bağlanma sıcaklıkları ise yine gradyanlı PCR çalışması sonucu Tablo3.3' de verilen aralıklarda optimize edilmiştir.

Tablo 3.2. PCR reaktifleri ve kullanılan konsantrasyon miktarları

Reaktifler	Konsantrasyon
ddH ₂ O	-
10X Tampon	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1-4 mM
dNTP Karışımı (2 mM)	0.2 mM (herbiri için)
İleri Primer	0.1-1 µM
Geri Primer	0.1-1 µM
Taq Polimeraz (0,5 U)	1,25 u/50µl
Formamid	1 µl
DNA	10pg-1 µg/50 µl

Tablo 3.3. Primerler için belirlenen optimum PCR koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
94	5 dk	
94	45 sn	x35
55-70*	45 sn	
72	45 sn	
72	8 dk	

Elde edilen PCR ürünlerinin varlığının tespiti için %1.5' luk agaroz jel hazırlanmıştır. 1,5 g agaroz 100 ml 1XTBE tampon içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözündürülmüştür. Fırından alınan solüsyon içerisine 25 µl EtBr ilave edilip hava kabarcığı kalmayacak Şekil de jel tankına dökülmüştür. Tarak yerleştirildikten sonra jel 40 dk donmaya bırakılmıştır. Jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirilip üzerini örtecek Şekil de 1XTBE tampon solüsyonu ilave edilmiştir. Her bir kuyucuğa üzerine 6X yükleme tamponu eklenen PCR ürünleri yüklenmiştir. Belirleyici olarak 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. Örnekler 110 V'ta 45 dk yürütülmüştür. Bu işlemden sonra bantların UV ışık altında gözlenmesi sağlanmıştır.

3.2.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Agaroz jelde yürütülerek varlığı tespit edilen PCR ürünleri LOH tespiti için DNA sekans analiz sistemi (Sequi-Gen GT Electrophoresis System, Bio-Rad) kullanılarak denatüre edici üre poliakrilamid jelde yürütülmüştür. Jelin yüzdesi yürütülecek primerin bç büyüklüğüne göre modifiye edilmiştir.

3.2.3.1. Cihazın Hazırlanması:

DNA sekans analiz sistemine ait uzun ve kısa cam dikkatli bir Şekil de deterjan ve bol suyla yıkandıktan sonra % 70' lik alkolle iki kez silindi. Kısa cama jelin yapışmasını sağlamak amacıyla bağlanma solüsyonu camın her tarafına yayılacak Şekil de dikkatlice sürüldü. Uzun cama ise jelin bağlanmasını önleyici dimetildiklorosilan camın her tarafına yayılacak Şekil de dikkatlice sürüldü. 10 dk camların kuruması beklenip ayırıcılar ve tarak yerleştirilerek camlar kapandı. Sistemin dengesi ayarlandı ve jelin hazırlanmasına geçildi.

3.2.3.2. Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Yüklenmesi:

%7' lik poliakrilamid jel için 36 g üre, 15 ml distile su ve 32 ml formamidden oluşan çözeltide ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde çözüldü ve üzerine 10 ml 10XTBE ve 17,5 ml akrilamid:bisakrilamid (29:1) stok solüsyonundan eklenerek toplam hacim 75 ml' ye tamamlandı. Jelde çözünmüş olarak bulunan oksijeni uzaklaştırmak için karışım ultrasonik sonikatörde 5 dk bekletildi. Daha sonra taze olarak hazırlanan 1 ml APS stok solüsyonu ve 40 µl TEMED eklendi ve hızlı bir Şekil de jel camlar arasına şırınga ile döküldü.

1-2 saat arası jelin polimerizasyonu için beklendikten sonra 50 °C sıcaklıkta 60 W' da 45 dk ön yürütme yapıldı. 7 µl yükleme tamponu ve 5 µl PCR ürünü karıştırılarak kısa bir santrifüj edildi ve 95 °C' de 5 dk denatüre edildi. Denatürasyonun ardından örnekler direkt buz üzerine alınarak zaman kaybetmeden her kuyucuğa 6 µl yüklendi. Yükleme işleminin ardından 50 °C sıcaklıkta 1 buçuk saat 60 W' da yürütüldü.

3.2.4. Gümüş Boyama ile DNA Bantlarının Görünür Hale Getirilmesi

Jelin yürütme işlemi tamamlandıktan sonra uzun cam ve kısa cam birbirinden çok dikkatli bir Şekil de ayrılıp jelin bağlanmış olduğu kısa cam gümüş boyama solüsyonlarına tabi tutularak bantlar görünür hale getirilip LOH analizi yapılmıştır. Gümüş boyama aşamasında Benbouza ve ark. (2006) tarafından rapor edilen yöntem modifiye edilerek uygulanmış olup bu yöntem Tablo 3.4' de belirtilmiştir.

Tablo 3.4. Gümüş boyama için kullanılan solüsyonlar ve süreleri

Aşama	Kullanılan solüsyonlar	Süre
Fiksasyon	% 10 absolü etanol, % 0.5 asetik asit	5 dk
Emdirme	Bir litre için; 1.5 g gümüş nitrat, 1.5 ml formaldehit	6-7 dk
Yıkama	Distile su	10-15 sn
Geliştirme	Bir litre için; 15 g sodyum hidroksit, 2 ml formaldehit	3-5 dk
Durdurma	% 10 absolü etanol, % 0.5 asetik asit	2 dk

Tüm aşamalarda kullanılan solüsyonlar 2 L olarak hazırlanmıştır. Boyama işlemi cam küvetler içinde çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığının 22-24

⁰C olmasına dikkat edilmiştir. Durdurma basamağından sonra jel kurumaya bırakılmış ve yaklaşık bir saat sonra röntgen ışık kutusu üzerine alınarak jelde görünür haldeki DNA bantlarının fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.5. Verilerin İstatiksel Analizi

İstatistiksel analizler GraphPad InStat (version 3.05) program kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar standart sapma ya da yüzde olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmış olup, heterozigotluk kaybı görülme sıklığı, tümör derece ve evresi ile beraber değerlendirilmesi için Fisher's exact test kullanılmıştır.

BÖLÜM IV

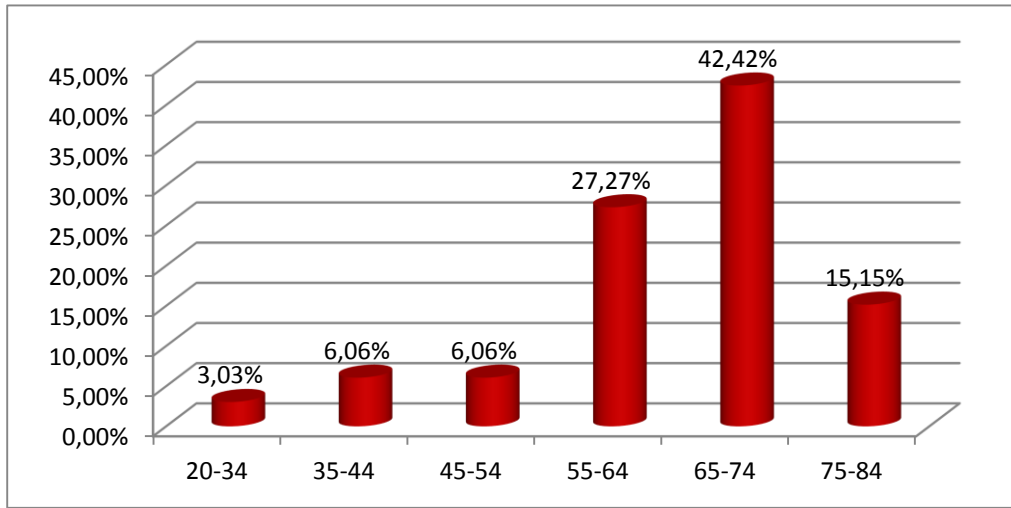
BULGULAR

4.1. Örnek Doku Alınan Hastaların Demografik ve Patolojik Bulguları

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda mesane kanseri teşhisi konmuş 33 hastanın yaş, cinsiyet, kan grubu, sigara kullanıp kullanmadığı bilgileri ve bu hastalara ait tümörlü dokuların patolojik bilgileri toplanmıştır.

4.1.1. Hastaların Demografik Bilgileri

Örnek alınan 33 hasta arasında 32 (% 96,97) birey erkek; 1 (% 3,03) birey bayandır. Erkek hastalar aktif sigara içicisi olup sadece bayan hasta sigara kullanmamaktadır. Hastaların en büyüğü 81 ve en küçüğü 34 yaşında olup yaş ortalaması ise $64,46 \pm 1,88$ olarak bulunmuştur. Hastaların yaşa göre dağılımını veren grafik Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Örnek alınan hastaların yaşa göre dağılımı

4.1.2. Hastaların Patolojik Bulguları

Hastalardan alınan tümörlü dokuların TNM sınıflandırılmasına göre evre ve derecesi Tablo 4.1 ve 4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların TNM evrelerine göre dağılımı

TNM Evreleri	Hasta Sayısı (n) (%)
T0	1 (3,03)
Ta	13 (39,40)
T1	4 (12,12)
T2	14 (42,42)
T3	1 (3,03)
Toplam	33 (100)

Tablo 4.2. Hastaların tümör derecesine göre dağılımı

Tümör Derecesi	Hasta Sayısı (n) (%)
G1	2 (6,06)
G2	8 (24,24)
G3	23 (69,70)
Toplam	33 (100)

4.2. İzole Edilen DNA' ların Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları

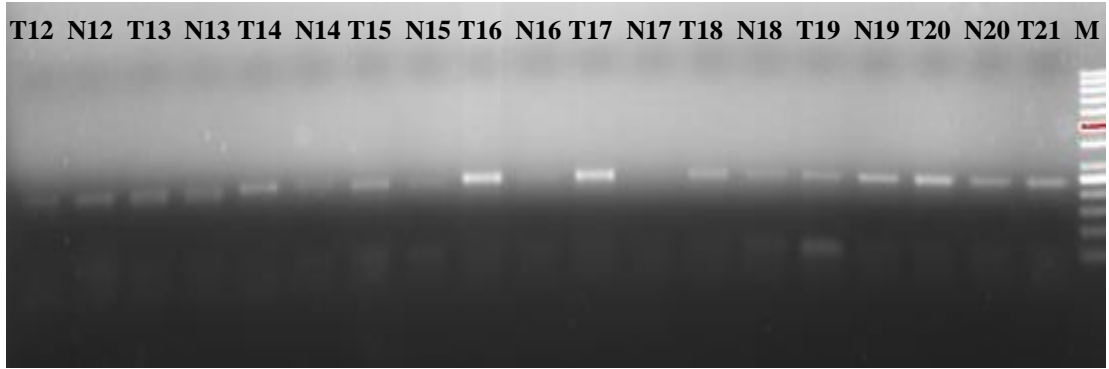
Mesane kanserli hastalara ait tümörlü ve normal dokulardan izole edilen DNA' ların konsantrasyonları ve absorbanı spektrofotometre ile tayin edilmiş olup sonuçlar Tablo 4.3' de verilmiştir. Sonuçlar heterojen olup genel olarak tümörlü doku konsantrasyonu normal dokulardan daha fazladır.

Tablo 4.3. Mesane kanserli hastalara ait tümörlü (T) ve normal (N) dokulardan elde edilen DNA' ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Tümör DNA	Konsantrasyon (ng/µl)	Absorbans (260-320 nm)	Normal DNA	Konsantrasyon (ng/µl)	Absorbans (260-320 nm)
T1	54,53	2,09	N1	36,98	2,13
T2	46,60	2,02	N2	46,32	2,06
T3	49,25	2,06	N3	75,19	2,13
T4	129,81	2,13	N4	55,00	2,06
T5	85,00	2,03	N5	74,43	2,09
T6	135,85	2,08	N6	42,74	1,98
T7	44,06	2,10	N7	28,21	2,17
T8	18,02	2,27	N8	22,74	2,19
T9	41,13	1,84	N9	17,36	2,19
T10	31,13	2,09	N10	16,51	2,40
T11	153,02	2,03	N11	20,94	2,85
T12	107,83	2,10	N12	22,64	2,07
T13	38,40	2,08	N13	20,57	1,88
T14	56,32	2,11	N14	20,66	2,28
T15	19,72	2,32	N15	20,28	2,15
T16	22,08	2,21	N16	30,75	2,20
T17	58,21	2,06	N17	22,55	2,46
T18	112,26	2,11	N18	17,45	2,26
T19	55,85	2,12	N19	12,74	2,55
T20	51,42	2,07	N20	36,60	1,99
T21	26,32	2,08	N21	25,57	2,28
T22	76,98	2,16	N22	20,94	2,24
T23	67,26	2,08	N23	57,17	2,05
T24	85,09	2,10	N24	24,81	2,10
T25	17,36	2,22	N25	46,51	1,93
T26	46,89	2,14	N26	97,36	2,02
T27	58,11	2,03	N27	32,74	2,16
T28	24,72	2,20	N28	22,45	2,13
T29	66,13	2,11	N29	25,28	2,06
T30	29,25	2,18	N30	20,09	2,20
T31	95,85	2,15	N31	17,45	2,37
T32	56,70	2,19	N32	21,60	2,31
T33	18,58	2,35	N33	16,32	2,40

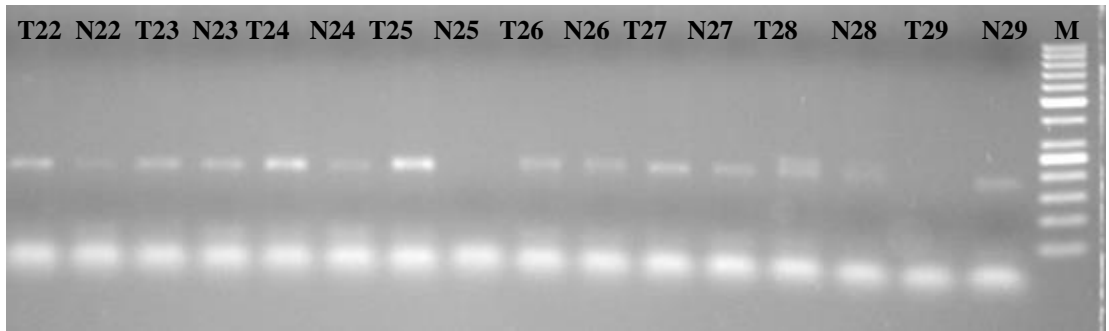
4.3. Mikrosatellit Markırlar Kullanılarak Yapılan PCR Sonuçları

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA örnekleri ile 20q11-13 bölgesinde lokalize 9 polimorfik mikrosatellit markır (D20S481, D20S465, D20S118, D20S891, D20S171, D20S174, D20S468, D20S872 ve D20S443) kullanılarak PCR çalışması yapılmıştır. D20S481 mikrosatellit markırı kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 217-253 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir (Şekil 4.2). PCR ürünleri % 1,5' luk agaroz jel elektroforezinde 110 V' da 45 dk yürütülmüş ve UV görüntüleyicisinde analiz edilmiştir (Şekil 4.2).



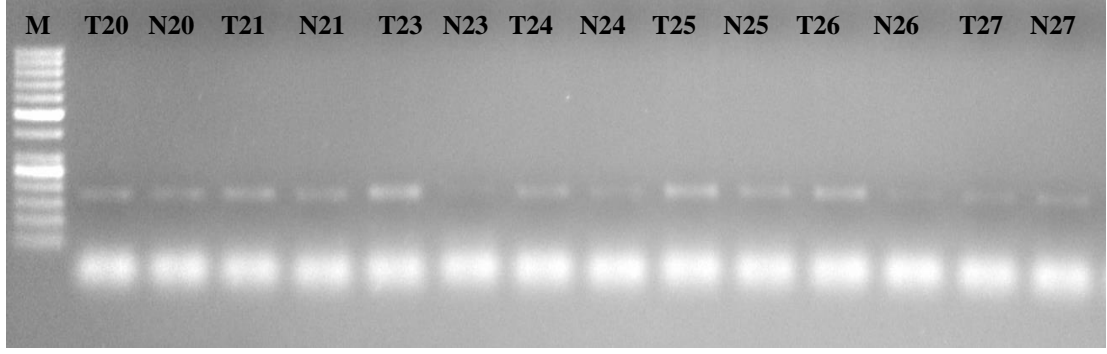
Şekil 4.2. D20S481 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır/50 bp, T: tümörlü doku, N: normal doku, T12: 12 nolu örneğe ait tümör dokusu, N12: 12 nolu örneğe ait normal doku).

D20S465 mikrosatellit markırı kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 219 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir (Şekil 4.3).



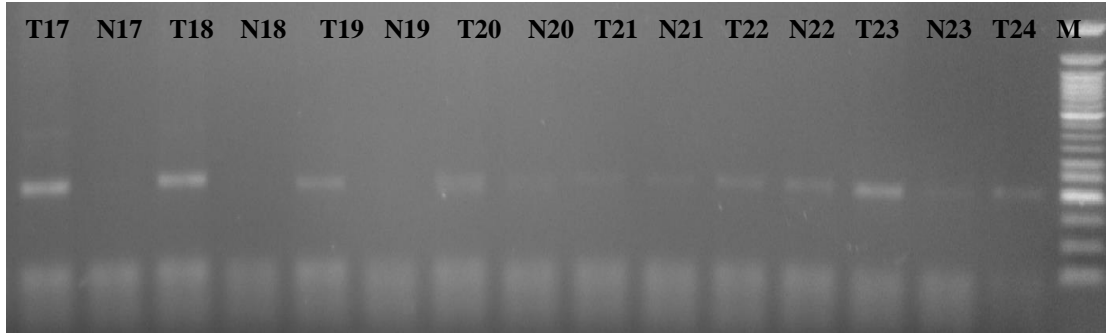
Şekil 4.3. D20S465 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

D20S118 mikrosatellit markırı kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 169-179 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir (Şekil 4.4).



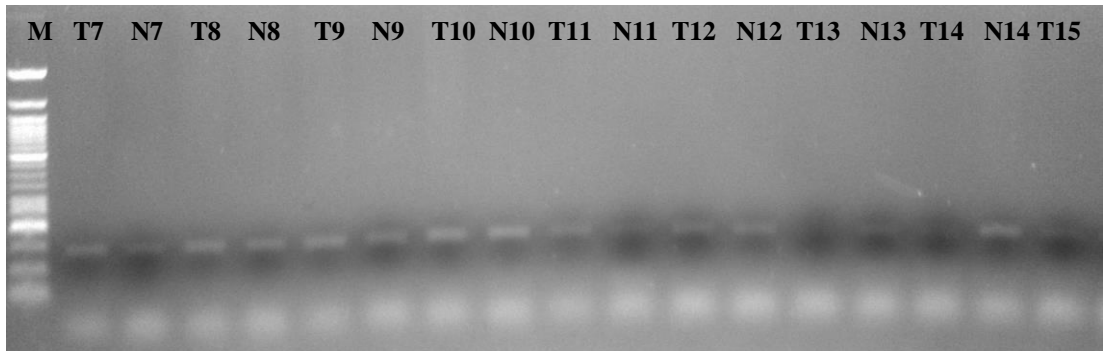
Şekil 4.4. D20S118 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

D20S891 mikrosatellit markırı kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 190-216 bç büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir (Şekil 4.5).



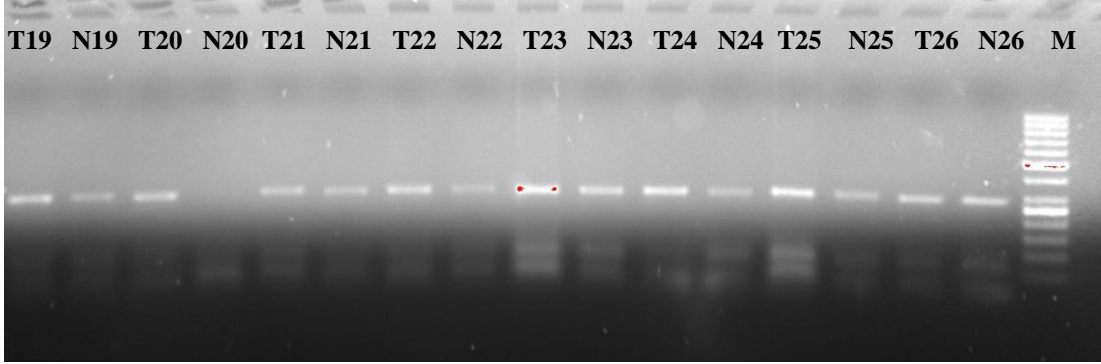
Şekil 4.5. D20S891 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

D20S171 mikrosatellit markırı kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 123-149 bç büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir (Şekil 4.6).



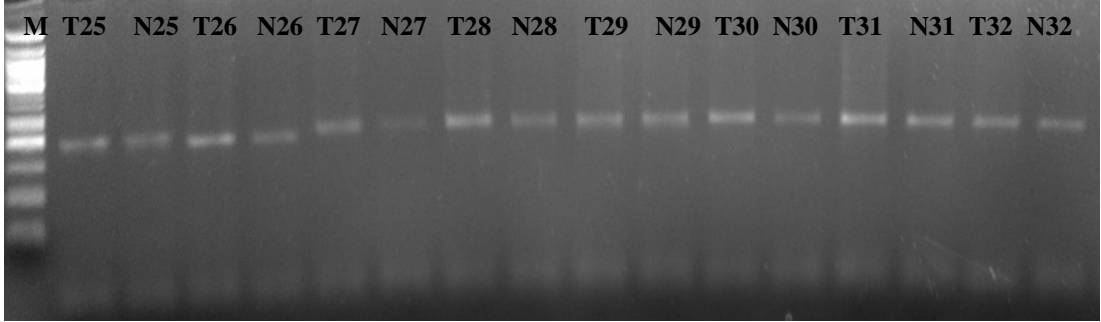
Şekil 4.6. D20S171 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

D20S174 mikrosatellit markırı kullanılarak yapılan PCR alışması sonucunda 277-305 b büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir (şekil 4.7).



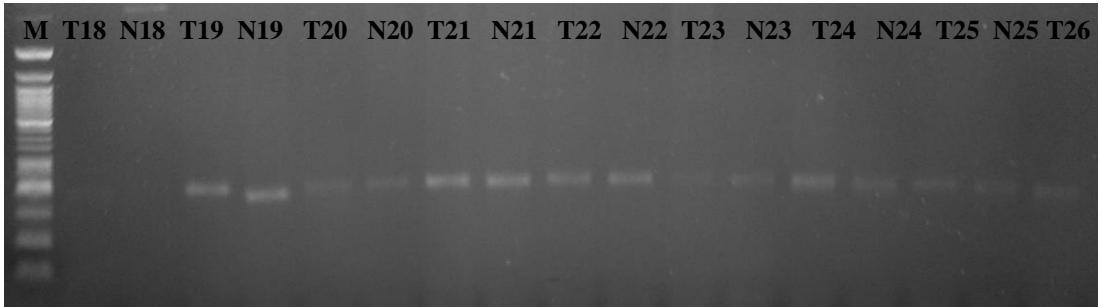
şekil 4.7. D20S174 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

D20S468 mikrosatellit markırı kullanılarak yapılan PCR alışması sonucunda 194-212 b büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir (şekil 4.8).



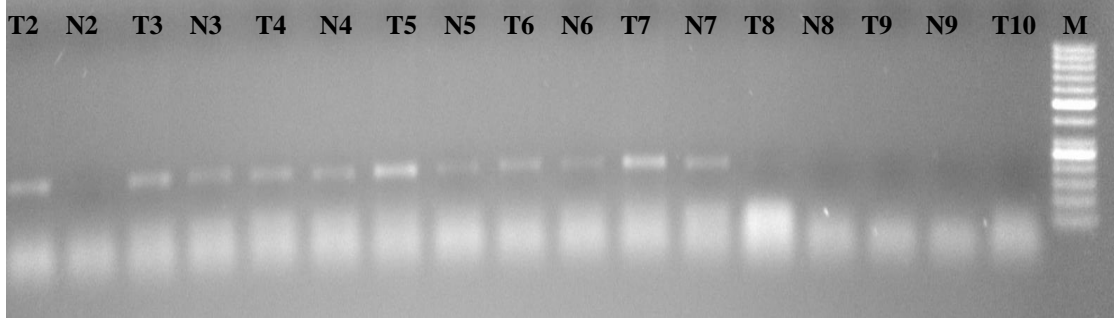
şekil 4.8. D20S468 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

D20S872 mikrosatellit markırı kullanılarak yapılan PCR alışması sonucunda 180-218 b büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir (şekil 4.9).



şekil 4.9. D20S872 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

D20S443 mikrosatellit markırı kullanılarak yapılan PCR alışması sonucunda 140 b büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir (şekil 4.10).



Şekil 4.10. D20S443 primerinin PCR' ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

4.4. Heterozigotluk Kaybıyla (LOH) İlişkili Bulgular

Mesane kanserli 33 hastaya ait tümörlü ve tümör dokusuna komşu normal dokulardan elde edilen DNA örneklerinde D20S481, D20S465, D20S118, D20S891, D20S171, D20S174, D20S468, D20S872 ve D20S443 mikrosatellit markırları kullanılarak 20q11-13 bölgesindeki heterozigotluk kaybı araştırılmıştır. LOH analizi için hastaların tümörlü doku DNA' ları ve normal doku DNA' ları birbiriyle karşılaştırılmıştır.

4.4.1. D20S481 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular

D20S481, 20q12 bölgesinde bulunan 217-253 bp uzunluğunda polimorfik bir dinükleik markırdır. %7' lik poliakrilamid jelde yürütülerek ayrıştırılmış ve gümüş boyama ile bantlar görünür duruma getirilmiştir. Mesane kanserli 33 hastanın 23'ü heterozigotluk hakkında bilgi verici olup bunların 6' sında (%26,1) LOH ve 17' sinde (%73,9) heterozigotluk korunmuştur. D20S481 markırına ilişkin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.11' de verilmiştir. D20S481 markırında meydana gelen LOH ile hastalığın patolojik evre ve derecesi arasındaki ilişki ise Tablo 4.4 ve Tablo 4.5' de verilmiştir.

D20S481 bölgesinde gözlenen LOH ile tümör derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.4). Ayrıca D20S481 primeri için en yüksek LOH frekansı (%17,4) T2 evresinde gözlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.4. D20S481 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatıksel ilişki

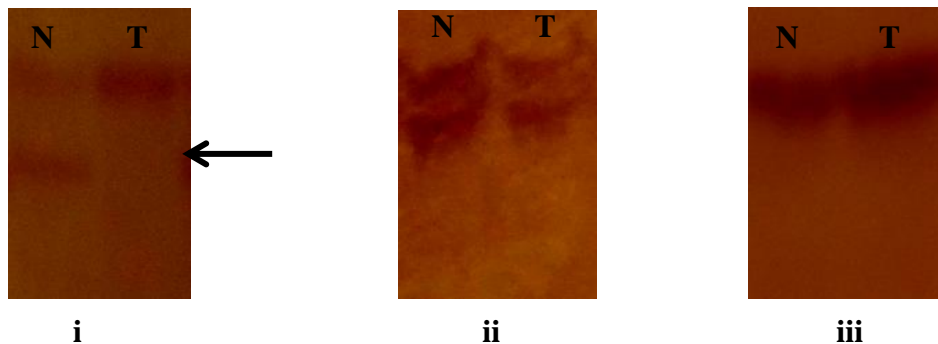
	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)
G1 ve G2 derecesi	2 (9)	3 (13)	5 (22)	0,576	2,333 (0,2838-19,182)
G3 derecesi	4 (17)	14 (61)	18 (78)		
Toplam (%)	6 (26)	17 (74)	23 (100)		

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; CI, güven aralığı; OR, odds oranı

Tablo 4.5. D20S481 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki ilişki

	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)
T0	0 (0)	1 (4,4)	1 (4,4)
Ta	2 (8,7)	5 (21,7)	7 (30,4)
T1	0 (0)	4 (17,4)	4 (17,4)
T2	4 (17,4)	6 (26,1)	10 (43,5)
T3	0 (0)	1 (4,4)	1 (4,4)
Toplam (%)	6 (26,1)	17 (73,9)	23 (100)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok



Şekil 4.11. D20S481 bölgesinde (i) LOH (1 nolu örnek), (ii) heterozigotluk (15 nolu örnek) ve (iii) homozigotluk (20 nolu örnek) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri (N: Normal doku, T: Tümörlü doku)

4.4.2. D20S465 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular

20q11.23 bölgesinde bulunan D20S465, 219 bç uzunluğunda polimorfik bir dinökleik markırdır. Mesane kanserli 33 hasta arasında 20 birey heterozigotluk hakkında bilgi vericidir. Bu 20 birey arasında 1 bireyde (%5) LOH gözlemlenirken 19 bireyde (%95) heterozigotluk korunmuştur. D20S465 markırına ilişkin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.12' de verilmiştir. D20S465 markırında meydana gelen LOH ile hastalığın patolojik derece ve evresi arasındaki ilişki ise Tablo 4.6 ve Tablo 4.7' de verilmiştir.

D20S465 bölgesinde gözlenen LOH ile tümör derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.6). Ayrıca D20S465 primeri için en yüksek LOH frekansı (%5) Ta evresinde gözlenmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.6. D20S465 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatistiksel ilişki

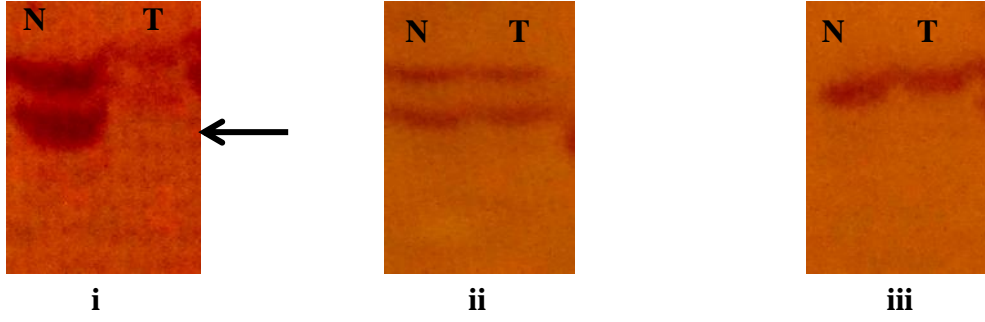
	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)
G1 ve G2 derecesi	0 (0)	4 (20)	4 (20)	1,000	3,444 (0,0928- 127,81)
G3 derecesi	1 (5)	15 (75)	16 (80)		
Toplam (%)	1 (5)	19 (95)	20 (100)		

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; CI, güven aralığı; OR, odds oranı

Tablo 4.7. D20S465 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki

	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)
T0	0 (0)	1 (5)	1 (5)
Ta	1 (5)	5 (25)	6 (30)
T1	0 (0)	3 (15)	3 (15)
T2	0 (0)	10 (50)	10 (50)
T3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Toplam (%)	1 (5)	19 (95)	20 (100)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok



Şekil 4.12. D20S465 bölgesinde (i) LOH (23 nolu örnek), (ii) heterozigotluk (1 nolu örnek) ve (iii) homozigotluk (17 nolu örnek) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri

4.4.3. D20S118 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular

169-179 bç uzunluğundaki D20S118 polimorfik mikrosatellit markırını 20q11.1 bölgesinde lokalizedir. Mesane kanserli 33 hastanın 26'sı heterozigotluk hakkında bilgi verici olup bunların 5' inde (%19,2) LOH saptanmış olup 21' inde (%80,8) heterozigotluk korunmuştur. D20S118 markırına ilişkin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.13' de verilmiştir. D20S118 markırında meydana gelen LOH ile hastalığın patolojik derece ve evresi arasındaki ilişki ise Tablo 4.8 ve Tablo 4.9' da verilmiştir. D20S118 bölgesinde gözlenen LOH ile tümör derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.8). Ayrıca D20S118 primeri için en yüksek LOH frekansı (%15,4) T2 evresinde gözlenmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4.8. D20S118 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatistiksel ilişki

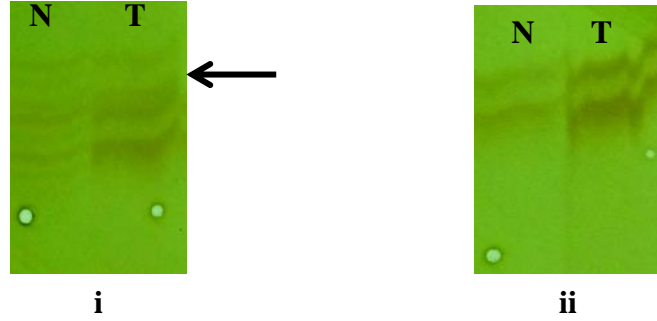
	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)
G1 ve G2 derecesi	1 (4)	5 (19)	6 (23)	1,000	0,800 (0,07178- 8,916)
G3 derecesi	4 (15)	16 (62)	20 (77)		
Toplam (%)	5 (19)	21 (81)	26 (100)		

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; CI, güven aralığı; OR, odds oranı

Tablo 4.9. D20S118 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatıksel ilişki

	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)
T0	0 (0)	1 (3,9)	1 (3,9)
Ta	1 (3,9)	6 (23,1)	7 (26,9)
T1	0 (0)	5 (19,2)	5 (19,2)
T2	4 (15,4)	8 (30,8)	12 (46,2)
T3	0 (0)	1 (3,9)	1 (3,9)
Toplam (%)	5 (19,3)	21 (80,8)	26 (100)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok



Şekil 4.13. D20S118 bölgesinde (i) LOH (18 nolu örnek) ve (ii) heterozigotluk (24 nolu örnek) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri

4.4.4. D20S891 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular

D20S891, 20q13.13 bölgesinde bulunan 190-216 bç uzunluğunda polimorfik bir dinükleik markırdır. Mesane kanserli 33 hastanın 12' si heterozigotluk hakkında bilgi verici olup bunların 3' ünde (%25) LOH gözlenmiş ve 9' unda (%75) heterozigotluk korunmuştur. D20S891 markırına ilişkin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.14' de verilmiştir. D20S891 markırında meydana gelen LOH ile hastalığın patolojik derecesi ve evresi arasındaki ilişki ise Tablo 4.10 ve Tablo 4.11' de verilmiştir.

D20S891 bölgesinde gözlenen LOH ile tümör derecesi arasında istatıksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.10). Ayrıca D20S891 primeri için Ta, T2 ve T3 evrelerinde aynı frekansta (%8,3) LOH gözlenmiştir (Tablo 4.11).

Tablo 4.10. D20S891 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatıksel ilişki

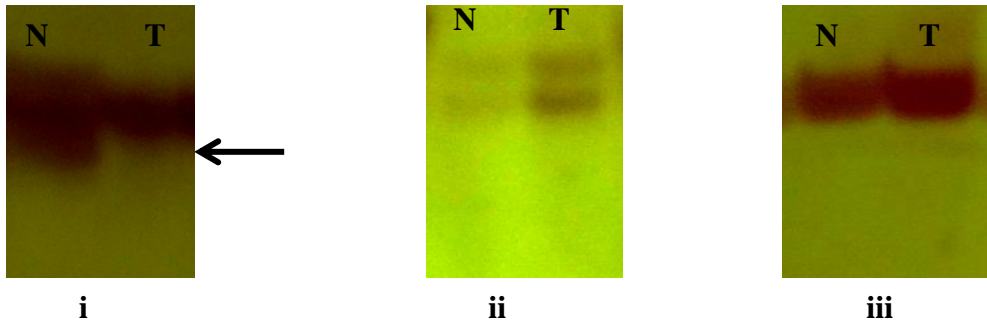
	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)
G1 ve G2 derecesi	1 (8)	3 (25)	4 (33)	1,000	1,000 (0,06251-15,998)
G3 derecesi	2 (17)	6 (50)	8 (67)		
Toplam (%)	3 (25)	9 (75)	12 (100)		

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; CI, güven aralığı; OR, odds oranı

Tablo 4.11. D20S891 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatıksel ilişki

	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)
T0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ta	1 (8,3)	4 (33,3)	5 (41,7)
T1	0 (0)	1 (8,3)	1 (8,3)
T2	1 (8,3)	4 (33,3)	5 (41,7)
T3	1 (8,3)	0 (0)	1 (8,3)
Toplam (%)	3 (25)	9 (75)	12 (100)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok



Şekil 4.14. D20S891 bölgesinde (i) LOH (25 nolu örnek), (ii) heterozigotluk (4 nolu örnek) ve (iii) homozigotluk (15 nolu örnek) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri

4.4.5. D20S171 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular

20q13.33 bölgesinde lokalize olan D20S171 polimorfik markırı 123-149 bç uzunluğundadır. Mesane kanserli 33 hasta arasında 18 birey heterozigotluk hakkında bilgi verici bulunmuştur. Bu hastalar arsından 3 bireyde (%16,7) LOH saptanmıştır. 15 bireyde (%83,3) ise heterozigotluk korunmuştur. D20S171 markırına ilişkin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.15' de verilmiştir. D20S171 markırında meydana gelen LOH ile hastalığın patolojik derece ve evresi arasındaki ilişki ise Tablo 4.12 ve Tablo 4.13' de verilmiştir.

D20S171 bölgesinde gözlenen LOH ile tümör derecesi arasında istatısel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.12). Ayrıca D20S171 primeri için Ta, T1 ve T2 evrelerinde aynı frekansta LOH (%5,5) gözlenmiştir (Tablo 4.13).

Tablo 4.12. D20171 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatısel ilişki

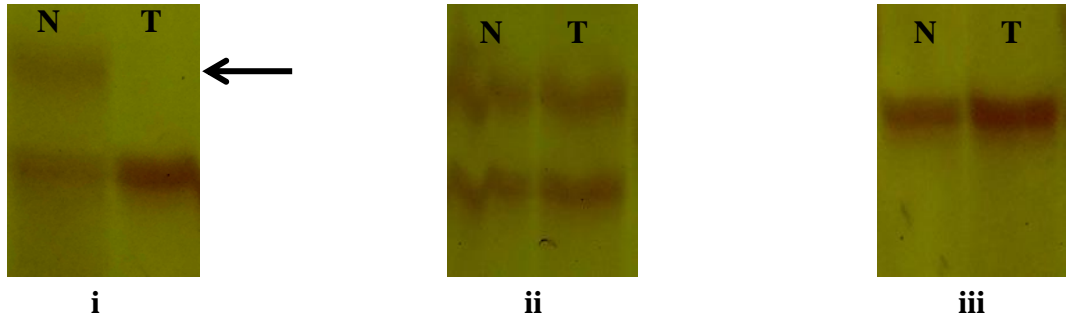
	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)
G1 ve G2 derecesi	1 (6)	3 (17)	4 (22)	1,000	2,000 (0,1325-30,183)
G3 derecesi	2 (11)	12 (67)	14 (78)		
Toplam (%)	3 (17)	15 (83)	18 (100)		

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; CI, güven aralığı; OR, odds oranı

Tablo 4.13. D20171 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatısel ilişki

	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)
T0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ta	1 (5,5)	4 (22,2)	5 (27,8)
T1	1 (5,5)	2 (11,1)	3 (16,7)
T2	1 (5,5)	8 (44,4)	9 (50)
T3	0 (0)	1 (5,5)	1 (5,5)
Toplam (%)	3 (16,7)	15 (83,3)	18 (100)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok



Şekil 4.15. D20S171 bölgesinde (i) LOH (3 nolu örnek), (ii) heterozigotluk (5 nolu örnek) ve (iii) homozigotluk (20 nolu örnek) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.

4.4.6. D20S174 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular

D20S174 primeri, 20q11.22 bölgesinde lokalize olup 277-305 bp büyüklüğündedir. Mesane kanserli 33 hastanın 18' i heterozigotluk hakkında bilgi verici olup bunların 2' sinde (%11,1) LOH saptanmış ve 16 bireyde (%88,9) heterozigotluk korunmuştur. D20S174 markırına ilişkin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.16' da verilmiştir. D20S174 markırında meydana gelen LOH ile hastalığın patolojik derece ve evresi arasındaki ilişki ise Tablo 4.14 ve Tablo 4.15' de verilmiştir.

D20S174 bölgesinde gözlenen LOH ile tümör derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.14). Ayrıca D20S171 primeri için en yüksek LOH frekansı (%5,3) Ta ve T2 evresinde gözlenmiştir (Tablo 4.15).

Tablo 4.14. D20S174 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatistiksel ilişki

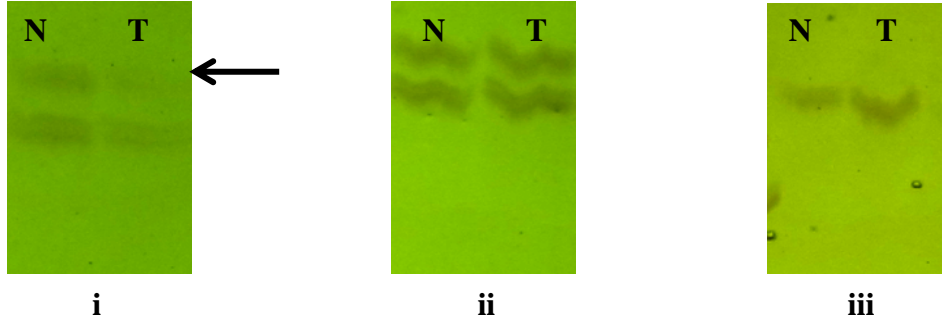
	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)
G1 ve G2 derecesi	1 (5)	4 (21)	5 (26)	0,468	3,250 (0,1633-64,662)
G3 derecesi	1 (5)	13 (68)	14 (74)		
Toplam (%)	2 (11)	17 (89)	19 (100)		

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; CI, güven aralığı; OR, odds oranı

Tablo 4.15. D20174 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatıksel ilişki

	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)
T0	0 (0)	1 (5,3)	1 (5,3)
Ta	1 (5,3)	7 (36,8)	8 (42,1)
T1	0 (0)	2 (10,5)	2 (10,5)
T2	1 (5,3)	6 (31,6)	7 (36,8)
T3	0 (0)	1 (5,3)	1 (5,3)
Toplam (%)	2 (10,5)	17 (89,5)	19 (100)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok



Şekil 4.16. D20S174 bölgesinde (i) LOH (21 nolu örnek), (ii) heterozigotluk (24 nolu örnek) ve (iii) homozigotluk (31 nolu örnek) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri

4.4.7. D20S468 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular

194-212 bç büyüklüğündeki D20S468 polimorfik markır 20q13.2 bölgesinde lokalizedir. Mesane kanserli 33 hastanın 11' i heterozigotluk hakkında bilgi verici olup bu hastalar arasından 2 bireyde (%18,2) LOH gözlenirken 9 bireyde (% 81,8) ise heterozigotluk korunmuştur. D20S468 markırına ilişkin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.17' de verilmiştir. D20S468 markırında meydana gelen LOH ile hastalığın patolojik derece ve evresi arasındaki ilişki ise Tablo 4.16 ve Tablo 4.17' de verilmiştir.

D20S468 bölgesinde gözlenen LOH ile tümör derecesi arasında istatıksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.16). Ayrıca D20S468 primeri için en yüksek LOH frekansı (%18,2) T2 evresinde gözlenmiştir (Tablo 4.17).

Tablo 4.16. D20468 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatıksel ilişki

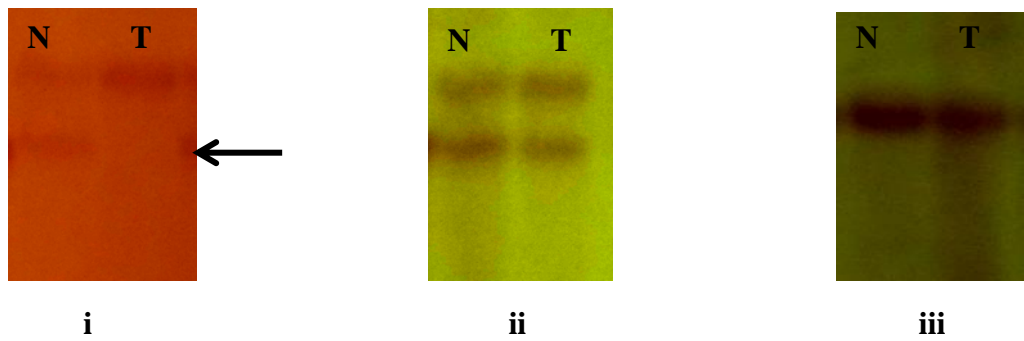
	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)
G1 ve G2 derecesi	0 (0)	1 (9)	1 (9)	1,000	1,933 (0,06007-62,225)
G3 derecesi	2 (18)	8 (73)	10 (91)		
Toplam (%)	2 (18)	9 (82)	11 (100)		

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; CI, güven aralığı; OR, odds oranı

Tablo 4.17. D20468 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatıksel ilişki

	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)
T0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ta	0 (0)	3 (27,3)	3 (27,3)
T1	0 (0)	2 (18,2)	2 (18,2)
T2	2 (18,2)	4 (36,4)	6 (54,5)
T3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Toplam (%)	2 (18,2)	9 (81,8)	11 (100)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok



Şekil 4.17. D20S468 bölgesinde (i) LOH (1 nolu örnek), (ii) heterozigotluk (21 nolu örnek) ve (iii) homozigotluk (26 nolu örnek) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri

4.4.8. D20S872 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular

D20S872 polimorfik markırı 180-218 bç büyüklüğünde olup 20q11.21 bölgesinde lokalizedir. Mesane kanserli 33 hastanın 20' si heterozigotluk hakkında bilgi verici olup bunların 6' sında (%30) LOH saptanmış olup 14' ünde (%70) heterozigotluk korunmuştur. D20S872 markırına ilişkin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.18' de verilmiştir. D20S872 markırında meydana gelen LOH ile hastalığın patolojik derece ve evresi arasındaki ilişki ise Tablo 4.18 ve Tablo 4.19' da verilmiştir.

D20S872 bölgesinde gözlenen LOH ile tümör derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.18). Ayrıca D20S872 primeri için en yüksek LOH frekansı (%15) T2 evresinde gözlenmiştir (Tablo 4.19).

Tablo 4.18. D20872 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatistiksel ilişki

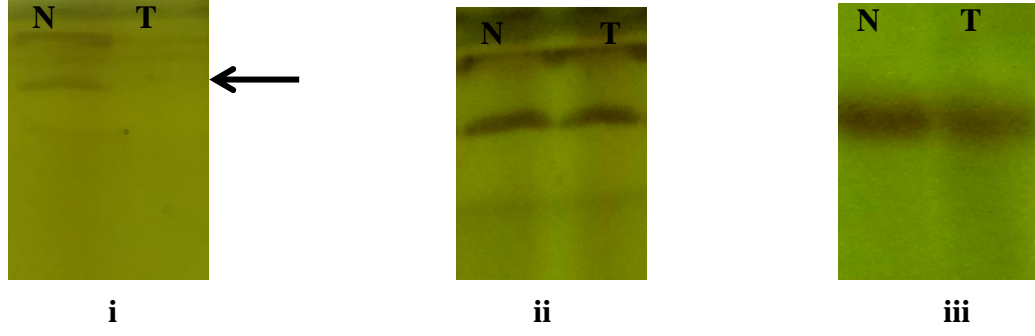
	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)
G1 ve G2 derecesi	1 (5)	4 (20)	5 (25)	1,000	0,500 (0,04355-5,741)
G3 derecesi	5 (25)	10 (50)	15 (75)		
Toplam (%)	6 (30)	14 (70)	20 (100)		

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; CI, güven aralığı; OR, odds oranı

Tablo 4.19. D20872 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki

	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)
T0	0 (0)	1 (5)	1 (5)
Ta	2 (10)	5 (25)	7 (35)
T1	1 (5)	2 (10)	3 (15)
T2	3 (15)	5 (25)	8 (40)
T3	0 (0)	1 (5)	1 (5)
Toplam (%)	6 (30)	14 (70)	20 (100)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok



Şekil 4.18. D20S872 bölgesinde (i) LOH (18 nolu örnek), (ii) heterozigotluk (22 nolu örnek) ve (iii) homozigotluk (8 nolu örnek) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri

4.4.9. D20S443 Mikrosatellit Markırına İlişkin Bulgular

140 bç büyüklüğündeki D20S443 polimorfik markırını 20q13.3 bölgesinde bulunmaktadır. Bu primer bölgesinde 11 hasta heterozigotluk hakkında bilgi verici bulunmuştur. 11 hastanın hiçbirinde (%0) LOH saptanmamıştır. D20S443 markırına ilişkin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.19' da verilmiştir. D20S443 markırında meydana gelen LOH ile hastalığın patolojik derece ve evresi arasındaki ilişki ise Tablo 4.20 ve Tablo 4.21' de verilmiştir.

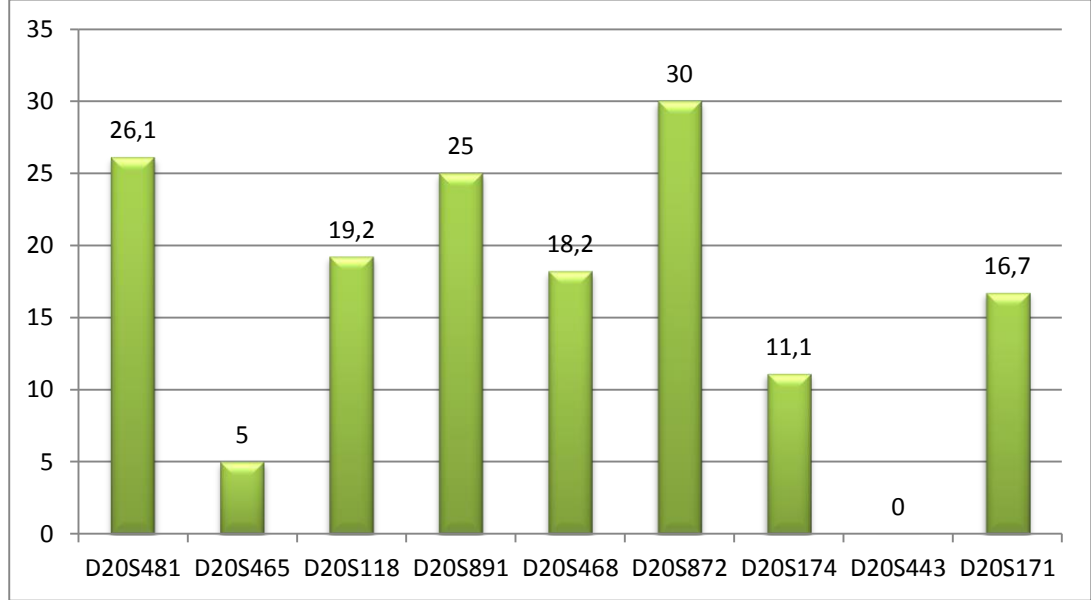
D20S443 bölgesinde gözlenen LOH ile tümör derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.20). Ayrıca tüm evrelerde LOH gözlenmediği için herhangi bir frekans verilememektedir (Tablo 4.21).

Tablo 4.20. D20443 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik derecesi arasındaki istatistiksel ilişki

	LOH+ (%)	LOH- (%)	Toplam (%)	<i>p</i> değeri	OR (95%CI)
G1 ve G2 derecesi	0 (0)	4 (36)	4 (36)	-	- (-)
G3 derecesi	0 (0)	7 (64)	7 (64)		
Toplam (%)	0 (0)	11 (100)	11 (100)		

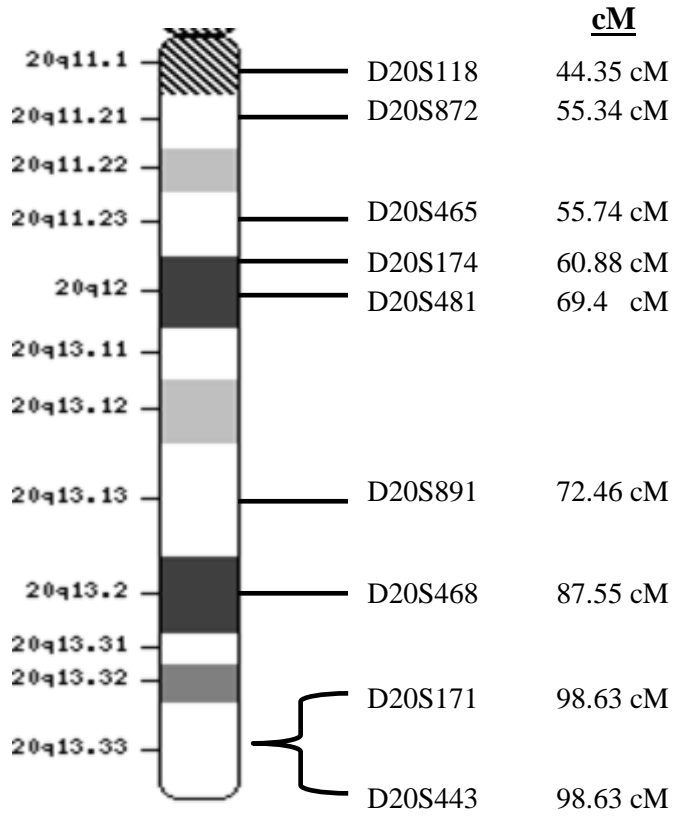
LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; CI, güven aralığı; OR, odds oranı

En yüksek LOH frekansı D20S872 (%30) lokusunda saptanmıştır. En düşük LOH frekansı (%5) D20S465 lokusunda saptanmış olup D20S443 lokusunda ise LOH saptanmamıştır. LOH frekansı D20S481 lokusunda %26,1; D20S468 lokusunda %18,2; D20S171 lokusunda %16,7; D20S174 lokusunda %11,1; D20S891 lokusunda %25; ve D20S118 lokusunda %19,2 oranlarında saptanmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Mikrosatellit markırlarda LOH (%) dağılımının grafiksel olarak gösterimi

Çalışma kapsamında LOH analizi yapılan mikrosatellit markırların 20. kromozom üzerindeki lokalizasyonu ve markırlar arası uzaklık Şekil 4.21’ de gösterilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).



Şekil 4.21. 20q11-13 bölgesinde bulunan markırların lokalizasyonu ve aralarındaki uzaklık (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık ölüm gözlenen hastalık olan kanser, kendiliğinden ya da çevresel bir faktörün etkisiyle gelişen çok aşamalı bir süreçtir. Özellikle değişen çevre koşullarının olumsuz etkileriyle gün geçtikçe sıklığı artan kanser türlerinden biri de mesane kanseri olup bu kanserin yaşa, cinsiyete, yaşanan coğrafi koşullara bağlı olarak insidansı değişmektedir. Ürogenital sistem kanserleri içerisinde en sık gözlemlenen ikinci kanser olan mesane kanseri, ülkemizde erkeklerde 3. ve kadınlarda 11. en sık görülen kanser türüdür.

Mesane kanserini tetikleyen risk faktörlerinin başında sigara kullanımı gelmektedir ve sigara içenlerde mesane kanseri insidansı 4 kat artmaktadır (Ataus, 2008). Yapılan bu çalışmada sigara kullanımı ile ilgili elde edilen bilgiler bu durumla paralellik gösterir niteliktedir. Örnek tümör dokusu alınan mesane kanserli hastaların %96,97'si aktif sigara içicisi olarak tespit edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması ise $64,46 \pm 1,88$ (n=33) olarak bulunmuş ve frekansı en yüksek aralık 65-74 yaş grubu (%42,42) olmuştur. Mesane kanserinin risk faktörleri arasında yaş ve cinsiyet de yer almakta olup mesane kanseri erkeklerde kadınlardan 4 kat fazla görülmektedir (NCI, 2013). Yine çalışma kapsamında tümürlü doku örneği alınan hastaların %96,97'sinin erkek ve %3,03'ünün bayan olması mesane kanseri riskinin erkeklerde daha sık gözlemlendiği bilgisini desteklemektedir. Milli Kanser Enstitüsü tarafından rapor edildiği üzere mesane kanseri en sık 75-84 yaşları arasında görülmektedir (NCI, 2013).

Mesane kanserinin gelişiminde çevresel risk faktörlerinin tetiklediği ya da spontan olarak gelişen birçok moleküler değişiklik söz konusudur. Bu moleküler değişiklikler arasında yer alan ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyon mekanizmalarından biri olan heterozigotluk kaybı (LOH) mesane kanserinde en sık rastlanan değişikliklerden biridir. Kromozomal bir bölgedeki bir allelin kaybı olarak tanımlanan LOH, inaktive olmuş tümör baskılayıcı genlerin tespitinde anahtar rol oynamaktadır (Peng ve ark., 2002). Özellikle kromozom 9p ve 9q üzerindeki heterozigotluk kayıpları mesane karsinomlarında en sık rastlanan genetiksel değişimdir (Higashi ve ark., 2000).

9. kromozomun yanı sıra 5p, 10q, 18q, 17p, 13q, 15q, 16q, 1p, 8p, 10p, 3p kromozomal bölgelerinde de mesane kanseri ile ilişkili heterozigotluk kayıpları olduğu bildirilmiştir (Cappellen ve ark., 1997; Sengelov ve ark., 2000; Uchida ve ark., 2000; Wada ve ark., 2000; Natrajan ve ark., 2003; Yoon ve ark., 2001; Jones ve ark., 2005). Literatürde yer alan çalışmalar arasında özellikle RB1 ve TP53 tümör baskılayıcı genlerinin lokalize olduğu 13. ve 17. kromozomlar üzerinde heterozigotluk kayıplarına sık rastlanmaktadır.

Başta myeloid ve lenfositik lösemiler olmak üzere kolorektal kanser, retinoblastoma, küçük hücreli akciğer kanseri, lobular meme karsinomu ve mide kanseri gibi birçok kanser türünde 20. kromozomda meydana gelen heterozigotluk kayıpları analiz edilmiştir (Huiping ve ark., 1999; Lindblad-Toh ve ark., 2000; Peng ve ark., 2002; Huang ve ark., 2003; Lee ve ark., 2003; Yang ve ark., 2005; Huh ve ark., 2011). Mesane kanserinde de 20. kromozomla ilgili çalışmalar yapılmış olup bu kromozom üzerinde CDC91L1 geni gibi mesane kanseriyle ilişkili onkogenlerin varlığı ortaya konmuştur (Guo ve ark., 2004). Ayrıca mesane kanserinde diğer kromozomlar üzerinde saptanan heterozigotluk kayıpları bu kromozomda da benzer kayıpların olabileceği ve mesane kanseri ile ilişkili tümör baskılayıcı genlerin varlığının tespit edilmesi düşünülmüştür. Nitekim Higashi ve ark., (2000) üriner sistemin transizyonel hücreli karsinomlarında 20p ve 20q allelik dengesizliklerini araştırmış olup bu bölgelerde toplam %57,1 oranında allelik dengesizlik tespit etmişlerdir.

9 mikrosatellit markır kullanılarak 33 mesane kanserli hastada 20q11-13 bölgesinde LOH analizi yapılması amaçlanan bu çalışmada sıklığı %30 ve % 5 arasında değişen heterozigotluk kayıpları tespit edilmiştir. Benzer Şekil de Peng ve ark. (2002) tarafından sporadik kolorektal kanserde yapılan çalışmada 20q11.1-q13.1 bölgesinde yüksek frekansta LOH saptanmıştır. Yine Huang ve ark. (2003) retinoblastoma üzerinde yaptıkları çalışmada 20q11-13 bölgesinde meydana gelen heterozigotluk kaybının retinoblastoma progresyonu ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Lee ve ark. (2003) kronik lenfositik lösemili hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada 20q12 lokusunda %61,1 oranında LOH saptamışlardır.

Çalışma sonucunda en yüksek LOH frekansı D20S872 (%30) lokusunda saptanmıştır. 20q11.21 bölgesinde lokalize olan D20S872 primeri XKR7 geni ile ilişkilendirilmiştir. Bu gen 579 amino asitten oluşan bir transmembran proteinini kodlamaktadır. XK ailesinden olan bu protein nötral aminoasitlerin ve

oligopeptidlerin sodyum bağımlı taşınmasında görevli olup eksikliğinde McLeod sendromu oluşmaktadır. Ayrıca D20S872 primerine yakın lokusta bulunan BCL2L1 geni izoformunun uzunluğuna göre anti-apoptotik ya da pro-apoptotik olarak görev alan BCL2L1 proteinini kodlar.

Yüksek LOH frekansına sahip bir diğer markır ise D20S481 (%26,1) primeridir ve bu primer NIDDM3 geninin markırlarından birisidir. 20q12 lokusunda ifade edilen bir diğer gen olan NCOA3 D20S481 markırının yakınında bulunan nükleer hormon reseptörlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu artıran koaktivatör proteinleri kodlamaktadır. D20S891 primeri ise LOH sıklığı açısından 3. sırada (%25) yer almaktadır. 20q13.12 lokusunda yer alan bu primer ZMYND8 geninin markırıdır. Bu gen tarafından kodlanan ürün C-kinaz (RACK) proteinini aktive eden bir reseptördür. Ayrıca bu protein kutanöz T-hücre lenfoma ile ilişkili antijendir ve transkripsiyonel düzenleyicidir. Yine aynı bölgede bulunan HNF4A geni tarafından kodlanan protein nükleer transkripsiyon faktörüdür. Karaciğer, böbrek ve ince bağırsağın gelişiminde rol oynayan bu genin mutasyona uğraması, insüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus tip I oluşumuyla ilişkilendirilmiştir.

LOH analizi yapılan D20S118 (%19,2), D20S468 (%18,2), D20S171 (%16,7), D20S174 (%11,1) ve D20S465 (%5) markırları ise daha düşük LOH frekansına sahiptir. D20S443 (%0) primerinde ise heterozgotluk kaybına rastlanmamıştır.

20q11-13 bölgesinde 9 mikrosatellit markırda saptanan LOH frekansları ile tümörün patolojik derece ve evresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$). Mesane kanseri hastalarının serum ve idrar DNA' larında floresan mikrosatellit analizi yapan Knobloch ve ark. (2001), hastalığın evresi ve tümör patojenitesi ile 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17p, 17q ve 20q bölgelerinde tespit edilen heterozgotluk kayıpları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir. Yine 81 ileri transizyonel hücreli mesane karsinomunda 9q bölgesinin heterozgotluk kaybı analizi yapan Kimura ve ark. (2001), meydana gelen LOH ile tümör derecesi ve evresi arasında anlamlı ilişkiye rastlanmadığını rapor etmişlerdir. Ancak bazı çalışmalarda tümör derece ve evresiyle kromozomal bölgede meydana gelen heterozgotluk kayıplarının önemli derecede ilişkili olduğunu bildirilmiştir. Örneğin Wada ve ark. (2000) tarafından 236 transizyonel hücre karsinomunda 13q14.3 bölgesinde LOH analizi yapılmış ve tespit edilen LOH ile T_a / G_2 derece ve evresindeki tümörler arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak önemli olduğunu rapor edilmiştir.

Mesane kanserli hastalarda 20q11-13 bölgesinin heterozigotluk kaybı analizi yapılan bu çalışmada 20q11.21, 20q12 ve 20q13.12 lokuslarında yüksek frekansta LOH saptanmıştır. Mesane kanserinin oluşum sürecinde 20q11-13 bölgesinde gözlenen heterozigotluk kayıpları bu bölgede inaktive olmuş tümör baskılayıcı genlerin varlığını işaret etmektedir. Yapılan bu çalışma ile mesane kanserinin erken tanısında moleküler analizlerin geliştirilmesine katkıda bulunulmuştur. LOH saptanan bu lokuslarda ileriye dönük tümör baskılayıcı gen varlığının tespit edilmesi çalışmalarına ön veri sunulmuştur. Özellikle analiz edilen markırlarla direkt ilişkili herhangi bir genin literatürde yer almaması, daha kompleks çalışmalara geçilmesi ve yeni aday tümör baskılayıcı genlerin literatüre kazandırılması çalışmaları hız kazanmış olacaktır.

KAYNAKLAR

Abraham, R., Pagano, F., Gomella, LG., Baffa, R. (2007). Chromosomal deletions in bladder cancer: shutting down pathways. *Front Biosci.* **1**, 826-38.

Adams, J., Williams, SV., Aveyard, JS., Knowles, MA. (2005). Loss of heterozygosity analysis and dna copy number measurement on 8p in bladder cancer reveals two mechanisms of allelic loss. *Cancer Res.* **65**, 66-75.

Aksakal, E., Ceyhun, SB., Erdoğan, O., Çiltaş, A. (2008). Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Mikrosatellit Markırların Seleksiyon Amaçlı Kullanımı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi.* **4**, 102-110.

Armstrong, B., Doll, R. (1975). Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special references to dietary practices. *Int J Cancer*, **15**: 617– 631, 1975.

Ataus, S. (2008). Mesane Kanseri. *Klinik Gelişim.* **21**(3), 130-135.

Benbouza, H., Jacquemin, JM., Baudoin, JP, Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **10**(2), 77 – 81.

Böhm, M., Kleine-Besten, R., Wieland, I. (2000). Loss of heterozygosity analysis on chromosome 5p defines 5p13-12 as the critical region involved in tumor progression of bladder carcinomas. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*. **89**, 194–197.

Cappellen, D., Diez de Medina, SG., Chopin, D., Thiery, JP., Radvanyi, F. (1997). Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene.* **14**, 3059-3066.

Catto, JW., Miah, S., Owen, HC., Bryant, H., Myers, K., Dudzic, E., Larré, S., Milo, M., Rehman, I., Rosario, DJ., Di Martino, E., Knowles, MA., Meuth, M., Harris, AL., Hamdy, FC. (2009). Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res.* **69**(21), 8472-81.

Cheng, L., Zhang, S., MacLennan, GT., Williamson, SR., Lopez-Beltran, A., Montironi, R. (2011). Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum Pathol.* **42**(4), 455-81.

Costa, VL., Henrique, R., Danielsen, SA., Duarte-Pereira, S., Eknaes, M., Skotheim, RI., Rodrigues, A., Magalhães, JS., Oliveira, J., Lothe, RA., Teixeira, MR., Jerónimo, C., Lind, GE. (2010). Three epigenetic biomarkers, GDF15,

TMEFF2, and VIM, accurately predict bladder cancer from DNA-based analyses of urine samples. *Clin Cancer Res.* **16**(23), 5842-51.

Cummings MR, Klug WS. (2001). Genetik Kavramlar. 6. Baskı. İstanbul: Palme Yayıncılık.

Çakır, H. (2006). Yüzeysel Mesane Kanseriinde Tekrarlanan Transüretal Rezeksiyonun Değeri. Uzmanlık Tezi, Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.

Çefle, K. (2009). Kanser Genetiği. *Klinik Gelişim.* **22**(3), 50-59.

Çetin, A. (2006). Düşük Malignite Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplaziler ile Noninvaziv Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinomlarda p53, Ki-67 ve Siklooksijenaz-2 (Cox-2) Ekspresyonu Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Patoloji Anabilim Dalı, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

Devilee, P., Cleton-Jansen, AM., Cornelisse, CJ. (2001). Ever since Knudson. *Trends in Genetics.* **17**(10), 569-573.

Dillioğlugil, Ö. (2001). Genitoüriner Knaserlerde Evrelendirme Prensipleri. İstanbul: Deomed Medikal Yayıncılık.

Dönmez, G. (2007). Mesanenin Ürotelyal Karsinomlarında VEGF, Mmp-9 ve Tsp-1 İfadesinin Tümör Derece ve Evresi ile İlişkisi. Uzmanlık Tezi, Patoloji Anabilim Dalı, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.

Dulaimi, E., Uzzo, RG., Greenberg, RE., Al-Saleem, T., Cairns, P. (2004). Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res.* **10**(6), 1887-93.

Epstein, JI., Amin, MB., Reuter, VR., Mostafi, FK. (1998). The World Health Organization/ international Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial(transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol.* **22** (12): 1435-1448.

Försti, A., Louhelainen, J., Söderberg, M., Wijkström, H., Hemminki, K. (2001). Loss of heterozygosity in tumour-adjacent normal tissue of breast and bladder cancer. *European Journal of Cancer.* **37**, 1372–1380.

Gunduz, M., Ouchida, M., Fukushima, K., Ito, S., Jitsumori, Y., Nakashima, T., Nagai, N., nishizaki, k., Kenji, S. (2002). Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers. *Oncogene.* **21**, 4462-4470.

Guo, Z., Linn, JF., Wu, G., Anzick, SL., Eisenberger, CF., Halachmi, S., Cohen, Y., Fomenkov, A., Hoque, MO., Okami, K., Steiner, G. (2004). CDC91L1 (PIG-U) is a newly discovered oncogene in human bladder cancer. *Nature Medicine.* **10**, 374-381.

Gürel, B. (2007). Mesane Ürotelyal Karsinomlarının Tanısı ve İzleminde İdrar Sitolojisi ve Floresan In Situ Hibridizasyon Yöntemlerinin Güvenilirliği. Uzmanlık Tezi, Patoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

Habuchi, T., Luscombe, M., Elder, PA., Knowles, MA. (1998). Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. *Genomics*. **48**(3), 277-88.

Higashi, S., Habuchi, T., Takahashi, T., Kamoto, T., Kakehi, T., Ogawa, O., Hiai, H. (2000). Allelic Imbalances on Chromosome 20 in Human Transitional Cell Carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 499–503.

Huang, Q., Choy, KW., Cheung, KF., Lam, DSC., Fu, WL., Pang, CP. (2003). Genetic alterations on Chromosome 19, 20, 21, 22, and X detected by loss of heterozygosity analysis in retinoblastoma. *Molecular Vision* **9**, 502-7.

Huiping, C., Sigurgeirsdottir, JR., Jonasson, JG., Eiriksdottir, G., Johannsdottir, JT., Egilsson V., Ingvarsson, S. (1999). Chromosome alterations and E-cadherin gene mutations in human lobular breast cancer. *Brit J of Cancer*. **8**, 1103–1110.

Huh, H., Mun, YC., Seong, CM., Chung, WS. (2011). Single nucleotide polymorphism array-based karyotyping shows sequential genomic changes from monosomy to copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 7 and 20q deletion within a balanced translocation t(14;20) in AML. *Cancer Genetics*. **204**, 682-686.

Jerónimo, C., Henrique, R. (2011). Epigenetic biomarkers in urological tumors: A systematic review. *Cancer Lett.* doi:10.1016/j.canlet.2011.12.026.

Jones,TD., Carr, MD., Eble, JN., Wang, M., Lopez-Beltran, A., Cheng, L. (2005). Clonal Origin of Lymph Node Metastases in Bladder Carcinoma. *Cancer*. **104**, 1901-1910.

Karademir, B. (2007). Mesane Tümörü Tanısında Üç Boyutlu Sanal Sistoskopinin Yeri. Uzmanlık Tezi, Radyodiyagnostik Anabilim Dalı, Zonguldak.

Kimura, F., Florl, AR., Seifert, HH., Louhelainen, J., Maas, S., Knowles, MA., Schulz, WA. (2001). Destabilization of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Brit J of Cancer*. **85**(12), 1887–1893.

Knobloch, R., Hegele, A., Brandt, H., Olbert, P., Heidenreich, P., Hofmann, R. (2001). Serum dna and urine dna alterations of urinary transitional cell bladder carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis. *Int. J. Cancer*. **94**, 67–72.

Kuzey GM, Özdamar SO, Zergeroğlu S. (2007). Temel Patoloji. Ankara: Güneş Kitabevi.

Lee, JY., Spicer, AP. (2000). Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol.* **12**(5), 581-6.

Lee, JN., Giles, F., Huh, YO., Manshour, T., O'Brien, S., Kantarjian, HM., Keating, MJ., Albitar, M. (2003). Molecular differences between small and large cells in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol.* **71**, 235–242.

Lindblad-Toh, K., Tanenbaum, DM., Daly, MJ., Winchester, E., Lui, WO., Villapakkam, A., Stanton, SE., Larsson, C., Hudson, TJ., Johnson, BE., Lander, ES., Meyerson, M. (2000). Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nature Biotechnology.* **18**, 1001-1005.

Lindgren, D., Liedberg, F., Andersson, A., Chebil, G., Gudjonsson, S., Borg, A., Månsson, W., Fioretos, T., Höglund, M. (2006). Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. *Oncogene.* **25**(18), 2685-96.

Louhelainen, J., Wijkström, H., Hemminki, K. (2000). Allelic losses demonstrate monoclonality of multifocal bladder tumors. *Int. J. Cancer.* **87**, 522–527.

Lüleyap U. (2008). Moleküler Genetiğin Esasları. Adana: Nobel Kitabevi.

Maleno, I., Romero, JM., Cabrera, T., Paco, L., Aptsiauri, N., Cozar, JM., Tallada, M., López-Nevot, MA., Garrido, F. (2006). LOH at 6p21.3 region and HLA class I altered phenotypes in bladder carcinomas. *Immunogenetics.* **58**, 503–510.

Maruyama, R., Toyooka, S., Toyooka, KO., Harada, K., Virmani, AK., Zöchbauer-Müller, S., Farinas, AJ., Vakar-Lopez, F., Minna, JD., Sagalowsky, A., Czerniak, B., Gazdar, AF. (2001). Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res.* **61**(24), 8659-63.

Meydan, NF. (2008). Mikrosatelitler Kullanılarak Sakız, İmroz, Kıvrıkcık Ve İvesi Koyun Irklarının Genetik Farklılıklarının Saptanması. Doktora Tezi. Biyokimya anabilim Dalı, İstanbul.

Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. (2008). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th Edition. Londra: Elsevier Saunders.

Maleno, I., Aptsiauri, N., Cabrera, T., Gallego, A., Paschen, A., López-Nevot, MA., Garrido, F. (2011). Frequent loss of heterozygosity in the β 2-microglobulin region of chromosome 15 in primary human tumors. *Immunogenetics.* **63**, 65-71.

Natrajan, R., Louhelainen, J., Williams, S., Laye, J., Knowles MA. (2003). High-resolution deletion mapping of 15q13.2-q21.1 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Research* **63**, 7657–7662.

NCI. National Cancer Institute. (2013). Cancer Topics: Understanding Cancer. NCI Intl.: <http://cancer.gov/cancertopics/understandingcancer>.

NCI. National Cancer Institute. 2013. SEER Stat Fact Sheets: Bladder Cancer. NCI Intl.: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html> 03.12.2013.

Nishiyama, N., Arai, E., Nagashio, R., Fujimoto, H., Hosoda, F., Shibata, T., Tsukamoto, T., Yokoi, S., Imoto, I., Inazawa, J., Kanai, Y. (2011). Copy number alterations in urothelial carcinomas: their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis*. **32**(4), 462-9.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel CF. (2005). Tıbbi Genetik. 6. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi.

Olesen, S., Thykjaer, T., Orntoft, T. (2001). Mitotic checkpoint genes hBUB1, hBUB1B, hBUB3 ve TTK in human bladder cancer screening for mutations and loss of heterozygosity. *Carcinogenesis*. **22**, 813-815.

Ozaslan, M., Aytakin, T. (2009). Loss of heterozygosity in colorectal cancer. *African Journal of Biotechnology*. **8**(25), 7308-7312.

Özşensoy, Y., Kurar, E. (2012). Markör Sistemleri ve Genetik Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanımları. *Journal of Cell and Molecular Biology*. **10**(2), 11-19.

Penbegül, N. (2006) Mesanenin Yüzeysel Ürotelyal Hücreli Karsinomlarında p53, bcl-2 ve CD37 Ekspresyonlarının Tümör Nüksü İle İlişkisi. Uzmanlık Tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. Üroloji Kliniği, İstanbul.

Peng, Z., Zhou, C., Zhang, F., Ling, Y., Tang, H., Bai, S., Liu, W., Qiu, G., He, L. (2002). Loss of heterozygosity of chromosome 20 in sporadic colorectal cancer. *Chinese medical journal*. **115**, 1529-1532.

Pollard, C., Smith, SC., Theodorescu, D. (2010). Molecular genesis of non-muscle-invasive urothelial carcinoma (NMIUC). *Expert Rev Mol Med*. **25**;12:e10.

Pymar, LS., Platt, FM., Askham, JM., Morrison, EE., Knowles, MA. (2008). Bladder tumour-derived somatic TSC1 missense mutations cause loss of function via distinct mechanisms. *Hum Mol Genet*. **17**(13), 2006-17.

Renard, I., Joniau, S., van Cleynenbreugel, B., Collette, C., Naômé, C., Vlassenbroeck, I., Nicolas, H., de Leval, J., Straub, J., Van Criekinge, W., Hamida, W., Hellel, M., Thomas, A., de Leval, L., Bierau, K., Waltregny, D. (2010). Identification and validation of the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples. *Eur Urol*. **58**(1), 96-104.

Sambrook J, russel DW. (2001). Molecular Cloning A Laboratory Manual. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sarı, U. (2007). Mesane Tümörü Tedavisinde Radikal Sistektomi Yaklaşımı ile Mesane Koruyucu Yaklaşım Sonuçlarının Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.

Schneider, AC., Heukamp, LC., Rogenhofer, S., Fechner, G., Bastian, PJ., von Ruecker, A., Müller, SC., Ellinger, J. (2011). Global histone H4K20 trimethylation predicts cancer-specific survival in patients with muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int*. **108**(2), 290-6.

Schulz WA. (2005). *Molecular Biology of Human Cancers*. New York: Springer Pres.

Sengelova, L., Christensenb, M., Maasec, H., Hornd, T., Marcussene, N., Kambya, C., Orntoftb, T. (2000). Loss of heterozygosity at 1p, 8p, 10p, 13q, and 17p in advanced urothelial cancer and lack of relation to chemotherapy response and outcome. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **123**, 109–113.

Spandidos, DA., Sourvinos, G., Kiaris, H., Tsampralakis, J. (1997). Microsatellite insatibility and loss of heterozygosity in human pterygia. *British Journal of Ophthalmology*. **81**, 493-496.

Srinivas, V., Khan, SA., Hoisington, S., Varma, A., Gonder, MJ. (1986). Relationship of blood groups and bladder cancer. *J Urol*. **135**(1), 50-2.

Stoehr, R., Wissmann, C., Suzuki, H., Knuechel, R., Krieg, RC., Klopocki, E., Dahl, E., Wild, P., Blaszyk, H., Sauter, G., Simon, R., Schmitt, R., Zaak, D., Hofstaedter, F. (2004). Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Laboratory Investigation*. **84**, 465–478.

Strachan T. (2004). *Human Molecular Genetics*. 3rd Edition. New York: Garland Publishing.

THSK. Türk Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı. (2011). Türkiye’ de Kanser İnsidansları. THSK Intl.: <http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html> 03.12.2013.

Tuncer AM. (2007). Türkiye’ de Kanser Kontrolü. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. Ankara: Onur Matbaacılık.

Türkeri L, Özer A, Narter F. (2012). *Moleküler Üroloji*. 1. Baskı. İstanbul: Üroonkoloji Derneği.

Uchida, A., Tachibana, M., Miyakawa, A., Nakamura, K., Murai, M. (2000). Microsatellite analysis in multiple chromosomal regions as prognostic indicator of primary bladder cancer. *Urol Res*. **28**, 297-303.

Ün, C., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Schmoll, F., Schellander, K. (2000). Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları. *Hayvansal Üretim* **41**, 9-14.

Van Le, TS., Miller, R., Barder, T., Babjuk, M., Potter, DM., Getzenberg, RH. (2005). Highly specific urine-based marker of bladder cancer. *Urology*. **66**(6):1256-60.

Wada, T., Louhelainen, J., Hemminki, K., Adolfsson, J., Wijkström, H., Norming, U., Borgström, E., Hansson, J., Sandstedt, B., Steineck, G. (2000). Bladder cancer: allelic deletions at and around the retinoblastoma tumor suppressor gene in relation to stage and grade. *Clin Cancer Res*. **6**, 610-615.

Wada, T., Louhelainen, J., Hemminki, K., Adolfsson, J., Wijkström, H., Norming, U., Borgström, E., Hansson, J., Sandstedt, B., Steineck, G. (2001). The

prevalence of loss of heterozygosity in chromosome 3, including FHIT, in bladder cancer, using the fluorescent multiplex polymerase chain reaction. *BJU International*. **87**, 876-881.

Wahab, A., Abo-Zeid, HI., El-Husseini, MI., Ismail, MI., El-Khor, AM. (2005). Role of loss of heterozygosity on chromosomes 8 and 9 in the development and progression of cancer bladder. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.* **17**, 260-269.

WHO. World Health Organization. (2011). Non Communicable Diseases Country Profile. WHO Intl.: <http://www.who.int/countries/tur/en/> 03.12.13.

Yakut, S. (2007). ARH1 tümör süpresör geninin glial beyin tümörlerindeki rolü. Doktora Tezi. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Antalya.

Yang, X., Shen, P., Yao, K., Mi, Z., Liu, S., Zhang, H., Wang, D., Liu, C., Liu, H. (2000). High frequency loss of heterozygosity in the region of the DBH locus in bladder cancer. *Chinese Medical Journal*. **113**, 117-119.

Yang, SH., Seo, MY., Jeong, HJ., Jeong, HC., Shin, J., Kim, SC., Noh, SH., Chung, HC., Rha, SY. (2005). Gene Copy Number Change Events at Chromosome 20 and Their Association with Recurrence in Gastric Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. **11**, 612–620.

Yenice, G. (2008). Transüretal Rezeksiyon Sonrası Mitomisin-C ve Bacille Calmette-Guerin Uygulamasının Progresyon (İlerleme) ve Rekürrense (Nüks) Yönelik Etkinliğinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Üroloji Anabilim Dalı, Trakya Üniversitesi, Edirne.

Yıldırım, A. (2008). Mesanenin Ürotelyal Karsinomlarında PCNA, c-erbB2 ve CD44s Ekspresyonunun Tümör Derece ve Evresi ile İlişkisi. Uzmanlık Tezi, Patoloji anabilim Dalı, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.

Yoon, DS., Li, L., Zhang, RD., Kram, A., Ro, JY., Johnston, D., Grossman, HB., Scherer, S., Czerniak, B. (2001). Genetic mapping and DNA sequence-based analysis of deleted regions on chromosome 16 involved in progression of bladder cancer from occult preneoplastic conditions to invasive disease. *Oncogene*. **20**, 5005-5014

Zheng, HT., Peng, ZH., Li, S., He, L. (2005). Loss of heterozygosity analyzed by single nucleotide polymorphism array in cancer. *World J Gastroenterol*. **11**(43), 6740-6744.