

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

**METASTATİK BÖBREK HÜCRELİ KARSİNOMDA DOKU
TRANSGLUTAMİNAZİ'NİN ROLÜ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Selçuk Erdem

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Mehmet Öner Şanlı

İstanbul - 2013

Özet

Genel Bilgiler ve Giriş

Böbrek hücreli karsinom

Epidemiyoloji ve Etyoloji

Histopatoloji

Evreleme

Klinik Bulgular

Radyolojik Bulgular

Lokalize BHK'de Tedavi

Metastatik BHK'de Tedavi

BHK prognozunda öngörücü belirteçler

Transglutaminaz enzimler

Doku transglutaminazı; Transglutaminaz-2 (TG2)

Transglutaminaz-2 aktivitesi ve ilişkili moleküller

Transglutaminaz-2 ve moleküler düzeyde karsinogenez

Transglutaminaz-2 ve Böbrek Hücreli Karsinom

Hastalar ve Yöntem

Araştırma ve Kontrol Olgularının Belirlenmesi

İmmünohistokimyasal Yöntem

Mikroskopik Değerlendirme

Çalışma Veritabanının Oluşturulması

İstatistiksel Analiz

Bulgular

Tartışma

Sonuç

Kaynaklar

Özet:

Giriş-Amaç: Artmış doku transglutaminazı (DT) ekspresyonunun böbrek hücreli karsinom (BHK) gelişiminde ve metastazında önemli olduğu daha önce bildirilmiştir. Bu tez çalışmasının amacı primer ve metastatik dokuların immunhistokimyasal analiz ile karşılaştırılarak DT'nin metastatik BHK (mBHK)'daki rolünü araştırmaktır.

Hastalar ve Yöntem: Otuz üç mBHK hastası ve bu hastalarla cinsiyet, yaş, nükleer grade ve patolojik T evresi bakımından mümkün olduğunca eşleştirilen 33 metastatik olmayan BHK (moBHK) hastası retrospektif olarak tanımlandı. Her iki hasta grubunun parafine gömdürülmüş primer böbrek tümör dokuları ile mBHK hastalarının metastatik dokuları DT ile immunhistokimyasal olarak boyandı. Dokular boyanma sonuçlarına göre 0'dan 7'ye kadar skorlandı ve bu skorlar gruplar arasında karşılaştırıldı. Daha sonra, primer tümörlerin ortanca boyanma skoru (5) kestirim değeri alınarak hastalar yüksek ve düşük riskli olarak iki gruba ayrıldı; Grup 1 (yüksek risk, n=41) ve Grup 2 (düşük risk, n=22). İki grup arasında klinik, histopatolojik ve sağkalım parametreleri ki-kare, student-t ve Mann-Whitney U testleri ile Kaplan-Meier sağkalım analizleri kullanılarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Tüm popülasyonun (n=63) ortanca DT skoru 5 bulunurken mBHK hastalarının ortanca DT skoru moBHK hastalarından anlamlı olarak yüksekti. (6'ya karşı 4, p<0.001) Metastatik hastaların primer böbrek ve sekonder metastatik dokularının ortanca DT skoru istatistiksel olarak farklı değildi. (6'ya karşı 7, p=0.086). Metastatik hasta oranı Grup 1'de (yüksek riskli grup) anlamlı olarak artmış bulundu. (% 68.3'e karşı % 18.2, p<0.001). Kaplan-Meier sağkalım analizlerine göre 5 yıllık hastalıksız (% 34.9'e karşı % 92.9, p=0.001) ve kansere özgü sağkalım (% 47.4'e karşı % 86.5, p=0.04) oranları Grup 1'de anlamlı olarak düşük saptanırken genel sağkalım oranı Grup 1 ve 2 arasında farklı bulunmadı. (% 40.4'e

karşı

%

55.6,

p=0.343)

Sonuç: Primer tümör dokusunda artmış DT ekspresyonu BHK hastalarında metastazı öngörmektedir ve azalmış hastalısız ve kansere özgü sağkalım oranları ile ilişkilidir. Bu bulgularla, DT, BHK'da prognostik faktör olarak ve anti-karsinojen ajan çalışmaları için potansiyel hedef olarak gösterilebilir.



Abstract

Purpose: The increased expression of tissue transglutaminase (TT) was previously reported to be important in the development and metastasis of renal cell carcinoma (RCC). The aim of this study was to investigate the role of TT in renal cell carcinoma (RCC) by comparing the immunohistochemistry staining of primary and metastatic tumor tissues.

Methods: A total of 33 metastatic RCC(mRCC) and 33 non-metastatic RCC(nmRCC) patients who were matched as closely as possible based on gender, age, nuclear grade, and pathologic T stage were retrospectively investigated. The immunohistochemistry staining of TT was performed on paraffin embedded primary tumor tissues from both patient groups and on metastatic tissues from mRCC patients. The tissues were scored from 0 to 7 according to the TT staining. Furthermore, the patients were stratified into two groups using median primary tumor staining score as the cut-off value: Group 1 (high risk, n=41) and Group 2 (low risk, n=22). The clinical, histopathological and survival outcomes were compared between these risk groups using chi square test, t-test, Mann-Whitney U test and Kaplan-Meier survival analyses.

Results: The median TT score for primary tumor was 5 for the entire study population. The median primary tumor TT score of the mRCC patients was significantly higher compared to the nmRCC patients (6 vs. 4, $p < 0.001$). The TT score between the primary and metastatic tissues of mRCC patients was not significantly different (6 vs. 7, $p = 0.086$). The percentage of metastatic patients was significantly higher in Group 1 compared to Group 2 (68.3% vs. 18.2%, $p < 0.001$). Kaplan-Meier analyses showed that 5-year disease-free (34.9% vs. 92.9%, $p = 0.001$) and cancer-specific (47.4% vs. 86.5%, $p = 0.04$) survival rates were significantly lower in high risk group, whereas no difference was observed between groups in terms of overall survival rate (40.4% vs. 55.6%, $p = 0.343$).

Conclusions: The increased expression of TT in primary tumor predicts metastasis in RCC patients and is also associated with a decrease in disease-free and cancer-specific survival outcomes. Thus, TT immunohistochemical staining is a promising prognostic tool and a potential target for studies on anti-carcinogen agents in RCC patients.



Genel Bilgiler ve Giriş

Böbrek Hücreli Karsinom

Epidemiyoloji ve etyoloji

Böbrek Hücreli Karsinom (BHK), yetişkin tümörlerinin %3'ünü oluşturur.¹ BHK ürolojik kanserler içinde en sık ölüm görülenidir. Hastaların %40'ı hastalığa özgü nedenler ile kaybedilirler. Hastaların yaklaşık 1/3'ü ilk tanıda metastatik iken klinik lokalize BHK nedeni ile nefrektomi operasyonu yapılan hastaların %30'unda daha sonradan metastaz gelişmektedir.² En iyi bilinen risk faktörleri; sigara ve obezitedir.^{3,4,5}

Son yıllarda Böbrek hücreli karsinomun'un moleküler genetiği ile ilgili önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu konuda yeni familyal sendromlar bulunduğu gibi; sporadik ve familyal formları ile ilgili supresor genler ve onkogenler tanımlanmıştır.^{6,7,8}

Histopatoloji

Böbrek hücreli karsinomun çok değişken nükleer yapısı nedeni ile çeşitli sınıflamalar yapılmıştır. 1982 yılında Furhman tarafından yapılan sınıflandırma bugün en sık kullanılan sınıflama olup tümörün evresinden bağımsız prognostik faktör olarak kullanılmaktadır. (Tablo 1: BHK'de nükleer grade furhman evreleme sistemi)

Grade	Nükleer çap (µm)	Nükleer çeper yapısı	Nükleolus yapısı
1	10	Yuvarlak, Üniiform	Yok yada silik
2	15	Düzensiz	Küçük
3	20	Düzensiz	Belirgin
4	>20	Multilobüle, Resimsiz	Kromatin demetleri

Kaynak: Fuhrman et al., 1982. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C: Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. Am J Surg Pathol 1982; 6:655-663.

BHK 1990 yılından önce geleneksel olarak 4 grupta sınıflandırılırdı; şeffaf hücreli, granüler hücreli, tubülopapiller ve sarkomatoid BHK. Artan moleküler genetik ve histolojik

bulgulardaki gelişmelere bağlı olarak sınıflandırmalar yapılmıştır.⁹ (Tablo 2: Böbrek hücreli karsinom sınıflaması)

Tablo 2: Böbrek hücreli karsinom sınıflaması		
Subtip	İnsidans	Genetik alterasyon
Berrak hücreli	%70-80	VHL gen kaybı Kromozom-3 delesyonu
Papiller	%10-15	MET protoonkogen aktivasyonu
Kromofobik	%4-5	Tanımlanmamış
Toplayıcı kanal	>%1	Tanımlanmamış
Medüller hücre	>%1	Tanımlanmamış
Onkositom	%3-7	1.ve Y kromozom kaybı
Kaynak: Prognostic factor of the RCC, Renal Cell Carsinoma, 2011 EAU Guidelines.		

Moleküler ve sitogenetik çalışmalar tümörlerin farklı patogenezinde de ışık tutmuş, böbrek karsinomlarının alt gruplarının hücresel kökenleri konusundaki bilgimizi derinleştirmiştir. Geçmişte BHK'un proksimal tubül epitelinden kaynaklandığı düşünülmekteydi. Güncel bilgiler ışığında sadece berrak hücreli tipin proksimal tubül epitelinden köken aldığı, papiller ve kromofobik BHK'un ise nefronun daha distal kısımlarından köken aldığı anlaşılmıştır.^{10,11}

Agresif lokal davranış BHK de sık görülen bir özelliktir. Pelvikalisijel sistemin ve/veya renal kapsülün invazyon ile perforasyonu patolojilerin % 20'sinde görülebilmektedir. Olguların % 10'unda venöz sisteme yayıldığı görülmektedir ve diğer tümörlere oranla daha fazladır.^{12,13} Lenfatik sistemle bölgesel lenf nodüllerine, hematojen yolla öncelikle akciğer olmak üzere, karaciğer, kemikler, sürrenal ve karşı böbreğe yayılabilir.^{14,15} (Tablo 3: BHK'da Metastaz lokalizasyonları)

Tablo 3: BHK'da metastaz lokalizasyonları	
Lokalizasyon	%
Akciğer	50-60
Karaciger	33
Kemik	30-40
Bölgesel lenf nodları	15-30
V.renalis	15-20
Perirenal yağ dokusu	10-20
Sürrenal bez (aynı taraf)	10-15
V.cava inferior	8-15
Kraniyal	10-13
Komşu organlar	10
Karşı böbrek	2
Kaynak: Diagnosis and staing of the RCC, EAU Guidelines 2011	

Von-Hippel-Lindau hastalığı (VHL) BHK'in en sık görüldüğü familial hastalık olup bu hastalıkta berrak hücreli kanser varyantı en sık görülmektedir. VHL hastalığı bulunanların %50'sinde BHK görülmektedir. Popülasyonda 1/36.000 oranında görülen Otozomal dominant bir hastalıktır. VHL'de görülen tümörler berrak hücreli tipte olup, 3.kromozom kısa kolunda (3p25-3p26) genetik mutasyonu ile kökenlenmektedir.^{16,17,18,19} Familial BHK sporadik olgulara göre birçok açıdan farklılık göstermektedir. En önemli özelliği sıklıkla bilateral, multipl ve tekrarlayan özellikte olmalarıdır. Sporadik kanser olguları 6-7 dekatta saptanırken familial olanlar daha erken yaşlarda bazen de ergenlik yaş grubunda saptanabilir. Cinsiyet açısından sporadik olanlarda erkek ağırlıklı iken familial olanlarda cinsiyet farkı önemli oranda görülmemektedir. VHL hastalarda santral sinir sistemine bağlı ölümler önceleri daha sık görülürken güncel tedavilerin ilerlemesi ile BHK bağlı ölümler ilk sırayı almaktadır.^{20,21}

Evreleme

‘‘International Union Against Cancer’’(IUAC) tarafından 1990 yılında önerilen ve 1997 ve 2002 yılında modifiye edilen TNM sınıflaması anatomik sınırları ayrıntılı olarak ele alan bir evreleme yöntemidir.²² Bununla birlikte, 2010 yılında yeniden düzenlenen TNM sınıflaması güncel olarak kullanılan evrelemedir. (Tablo 4’te 2010 TNM evrelemesi verilmiştir.)

Tablo 4: 2010 BHK’de TNM Sınıflaması

• T:Primer tümör

- **Tx** Primer tümör saptamak için veriler yeterli değildir.
- **T0** Primer tümöre ait kanıt yok
- **T1** Tümör en büyük boyutu ≤ 7 cm, böbrek içinde sınırlı
 - T1a** Tümör büyük çapı ≤ 4 cm
 - T1b** Tümör büyük çapı >4 cm ama ≤ 7 cm
- **T2** Tümör en büyük boyutu >7 cm, böbrek içinde sınırlı
 - T2a** Tümör büyük çapı >7 cm ama ≤ 10 cm
 - T2b** Tümör büyük çapı >10 cm, böbrek içinde sınırlı
- **T3** Tümör major venlere yayılmış veya sürrenal bezi veya perinefrik dokuları tutmuş ancak gerota fasyasını aşmamıştır.
 - T3a** Tümör renal ven veya segmental dallarını tutmuş veya perirenal ve/veya renal sinüs yağlı doku invazyonu mevcut
 - T3b** Tümör V. Kava’yı diafragma altında gros olarak tutmuştur.
 - T3c** Tümör V. Kava’yı diafragma üstünde gros olarak tutmuş veya V.Kava duvar invazyonu mevcuttur
- **T4** Tümör gerota fasyasını aşmıştır.(ipsilateral adrenal invazyonu)

• N:Bölgesel Lenf Nodları

- **Nx** Bölgesel lenf nodlarını saptamak için veriler yeterli değildir.
- **N0** Bölgesel lenf nodlarında metastaz yok.
- **N1** Tek bir lenf nodunda metastaz vardır.
- **N2** Birden fazla lenf nodunda metastaz vardır.

• M:Uzak Metastaz

- **Mx** Uzak metastazı saptamak için veriler yeterli değildir.
- **M0** Uzak metastaz yok.
- **M1** Uzak metastaz var.

Klinik Bulgular

Böbreklerin retroperitoneal bölgedeki yerleşimi nedeniyle birçok tümör ileri evreye gelene kadar semptomsuz ve nonpalpabl kalabilir. Bugün non-spesifik semptom komplekslerinin değerlendirilmesinde kullanılan non-invaziv görüntüleme yöntemleri sayesinde BHK'lerin yaklaşık %65'si insidental olarak tespit edilmektedir.²³ Birçok çalışma bu tümörlerin böbreğe sınırlı ve prognozlarının iyi olduğunu göstermektedir.^{24,25,26}

Radyolojik değerlendirmenin yaygınlaşması öncesine kadar klasik triad olarak görülen yan ağrısı, hematüri ve ele gelen abdominal kitle varlığı günümüz kliniğinde oldukça azalmış olup %6-10 oranında görülmektedir.²⁷

Bu klinik başvuru semptomları hastalığın daima ileri evre olduğunu göstermektedir. İleri evre hastalığın diğer belirtileri; kilo kaybı, ateş, gece terlemeleri veya fizik muayenede palpe edilen servikal lenfadenopati, varikosel ve alt ekstremitte ödemidir. Ayrıca kemik ağrıları ve öksürük gibi semptomlar metastatik olgularda görülebilir.

Radyolojik Değerlendirme

Böbrek tümörlerinin tanısında ve operasyon sonrası takiplerinde radyolojik olarak çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. İntravenöz pyelografinin (IVP) hematüriyi değerlendirmesindeki rolü nedeni ile birçok olguda ilk tanı yöntemidir. Ancak sensitivitesi ve spesifitesi düşük olmakla birlikte; kalisiyel detorsiyon yapmayan anterior ve posterior kaliks lezyonları ile ekzofitik parankimal lezyonların tespitinde yetersizdir.²³

IVP de şüpheli lezyon varlığında ultrasonografik (US) görüntüleme ikinci basamak olarak yapılması gerekli diğer tetkiktir. US non-invaziv, doğruluğu yüksek, uygulanması kolay ve diğer tetkiklere göre ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Günümüzde saptanan birçok renal kitle US ve BT ile olmaktadır. US saptanan lezyonun iç yapısının değerlendirilmesinde,

intraoperatif değerlendirmede – özellikle nefron koruyucu cerrahi sırasında-, renal vasküler yapıların tutulumlarının değerlendirilmesinde oldukça duyarlıdır²³.

Böbrek kitlesinin değerlendirmesinde BT, en önemli görüntüleme metodudur. BHK tanısını doğrulamada ve kontralateral böbreğin morfoloji ve fonksiyonunu değerlendirme de yardımcıdır²⁸. BT ile primer tümörün ekstrarenal uzanımları, venöz tutulumlar, lokal lenf nodları ve sürrenalin durumu değerlendirilebilir. Dokuyu ve çevre dokuları üç boyutlu ve gerçeğe yakın olarak görüntülemektedir.²⁹

Magnetik Rezonans (MR), görüntülemede ise kontrast madde allerjisi ya da son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda öncelikli tercih edilmelidir³⁰. Multiplanar görüntüleme özelliği ile böbrek lezyonlarının ve muhtemel vasküler invazyonun değerlendirilmesinde önemlidir. MR günümüzde, inferior vena kava tümör trombüsünü değerlendirmede en değerli test olarak kabul edilmektedir.^{28,31,32,33}. Trombüsün vena kava'daki üst ve alt uzantılarını gösterdiği gibi tümör trombüsünü yumuşak dokudan ayırt edebilir.

Renal arteriyografi, inferior venakavografi ya da ince iğne aspirasyon biyopsisi klinik kullanımda ki rolleri kısıtlıdır^{34,35}. Fakat seçilmiş vakalarda kullanılabilir.

Tedavi

Lokalize böbrek hücreli karsinom tedavisi

Radikal Nefrektomi

Radikal nefrektomi (RN) ilk kez 1963 yılında Robson tarafından tanımlanmıştır³⁶. BHK'un genetik ve biyolojisi ile ilgili bilgilerimizin artmasına rağmen, halen günümüzde bu ölümcül hastalığın tedavisinde tek küratif seçenektir. Robson ve arkadaşları (1969), Evrel ve

Evre 2 hastalarda sırasıyla %66 ve %64 sağkalım elde etmişler ve bu cerrahiyi “altın standart” olarak kabul etmişlerdir. RN’nin prensibi; renal arter ve venin erken bağlanması, böbreğin Gerota fasyası dışından çıkartılması, aynı taraf sürrenalın alınması ve diafragma krus’undan aort bifurkasyonuna kadar reyonel lenfadenektomi yapılmasıdır³⁷.

Günümüzde RN sırasında adrenalektominin yeri tartışılmaktadır. Adrenal bez tutulum insidansı, artan tümör evresi ile tümörün böbrek üst polden köken alması durumlarında artmaktadır^{38,39}. Özellikle adrenalektomi yapılmayan nefron koruyucu cerrahilerde (NKC) lokal nüks oranlarının benzerliği, adrenalektomi yapılan RN’li hastalarda %3 civarında tutulum saptanması ve bunların çoğunlukla hematojen yayılım ile olması, adrenal tutulumların hemen hepsinin preoperatif görüntülemelerle saptanması, büyük üst pol tümörleri dışında rutin adrenalektominin gerekli olmadığını düşündürmektedir^{40,41,42}.

Lenfadenektomi de yine gündemde olan bir tartışmadır. Lenfatik tutulumun negatif prognostik faktör olduğu bilinmektedir. Literatürdeki karşılaştırmalı çalışmalarda lenf nodu disseksiyonu yapılan ve yapılmayan hastalar arasında belirgin bir sağkalım avantajı saptanmamıştır. EORTC’nin henüz sağkalımı bildirecek düzeye gelmeyen bir çalışmasının (30881) erken sonuçları 5 yıllık izlem süresinde hastalığın ilerlememesi ve sağkalımda lenfadenektominin bir avantaj sağlamadığı yönündedir⁴³.

Son on yılda artan cerrahi teknik ve teknolojik ilerlemelerin sağladığı avantajlar sayesinde laparoskopik radikal nefrektomi operasyonları sayısında ciddi artışlar saptanmıştır. İlk kez Clayman tarafından 1990 yılında tanımlanana bu cerrahi teknik, onkolojik açıdan açık operasyonlar göre eşit etkinlik^{35,44,45,46} ve ciddi oranda azalmış operasyon sonrası morbidite, iyileşme süresinde ve hastane kalış süresinde azalma gibi önemli avantajları sayesinde altın standart cerrahi teknik olarak kabul edilmektedir. Günümüzde klinik lokalize hastalığa LRN önerilirken lokal ileri ve metastatik hastalıkta da LRN uygulama aşamasındadır⁴⁷.

Nefron Koruyucu Cerrahi (NKC)

Böbrek hücreli karsinomda parsiyel nefrektomi Czerny tarafından 1887 yılında tanımlanmıştır⁴⁸. Radyolojik görüntüleme yöntemlerinin yaygın kullanımı sayesinde küçük boyutlu böbrek tümörlerinin erken dönemde saptanması, artan anatomik bilgiler eşliğinde renal vasküler cerrahideki deneyimlerin artması, böbrekte meydana gelebilecek iskemik hasarın önlenmesi amacıyla kullanılan yöntemlerin geliştirilmesi ve uzun dönem kansersiz sağkalım elde nedeni ile NKC'ye olan ilgiyi arttırmıştır. NKC'de renal kitlenin tamamen rezeksiyonu ve geride mümkün olduğunca fazla fonksiyonel parankimin bırakılması amaçlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda tümör ile birlikte çıkarılması gereken sağlam parankimal dokunun sınırları tartışılmıştır. İlk önce en az 1cm sağlam dokunun tümörle birlikte eksize edilmesi gerekliliği vurgulanmıştır, fakat daha sonra bu sınır 5mm'ye kadar çekilmiştir^{49,50}. Günümüzde ise standart NKC'de, tümöre komşu 1-2mm'lik normal parankimin dahi yeterli olduğu görüşü önerilmektedir. Son 10 yıllık çalışma sonuçlarında NKC'nin etkinliğini ve güvenilirliğini gösterilmektedir. NKC ile 5 yıllık hastalığa özgü sağkalım oranları % 97'lere kadar çıkmakta ve RN'den farklılık göstermemektedir^{51,52,53,54}. “NKC sonrası böbreğin kalan kısmında nüks görülme oranı %1.4-10 arasında değişmektedir. Bu tür lokal rekürrensler yetersiz cerrahi rezeksiyon sonrası olabilmekle birlikte çoğunlukla var olduğu düşünülen mikrokopik invazyonlar sonucudur²³. NKC endikasyonları kesin, rölatif ve elektif endikasyonlar şeklinde sınıflandırılmaktadır. (Tablo 5: Nefron Koruyucu Cerrahi Endikasyonları)

Tablo 5: Nefron koruyucu cerrahi endikasyonları

1-Kesin Endikasyonlar

- Soliter böbrek tümörleri
- Bilateral böbrek tümörleri
- Ciddi böbrek yetmezliği

2-Rölatif Endikasyonlar

- Karşı böbrekte hastalık olması
- Nefrolitiazis
- Geçirilmiş rekürren piyelonefrit
- Veziköüreteral reflü
- Üreteropelvik bileşke darlığı
- Hafif-Orta dereceli böbrek yetmezliği
- Böbrek yetmezliğine yol açabilen hastalık varlığı
- Hipertansiyon
- Diabetes Mellitus
- Multifokal hastalık ya da ailesel sendromlar
- Papiller BHK
- Von Hippel-Lindau hastalığı

3-Elektif Endikasyonlar

- 4 cm'den küçük boyutlu renal kitleler (daha büyük tümörlerde de uygulanabilir.)
- Genç, sağlıklı bireyler
- Periferik yerleşimli tümörler

Kaynak: Nieder AM, Taneja SS. The role of partial nephrectomy for renal cell carcinoma in contemporary practice. Urol Clin North Am.2003;30:529-42

Lokal ileri böbrek hücreli karsinom tedavisi

BHK özelliklerinden bir tanesi renal ven içerisine uzanmasıdır. Bazı olgularda trombus V.kava inferior içine hatta sağ atriuma kadar uzanabilmektedir. V.kava tutulumu %4-10 oranında görülmektedir²³. Tedavi planlanan hastalarda cerrahi tekniğin belirlenmesi amacıyla trombus uzanımının net olarak ortaya konması gerekmektedir. BT ve USG trombusün kraniyal uzamını saptamada yeterli değildir⁵⁵. Magnetik Rezonans (MRI) inceleme trombusün varlığını ve distal uzantısını gösteren noninvazif bir yöntemdir^{28,3331,56}.

Renal arteriografi preoperatif dönemde faydalı bir testdir. Kaval tutulumu olan hastaların %35-40'ında trombusün yaygın arterizasyonu vardır⁵⁷. "Kontrast inferior vena

kavografi, MRI bulgularının ek bilgi vermediği ya da kolostrofobik, kardiyak pacemaker, intravasküler serebral klip, kohler implantları yada inraoküler yabancı cisim bulunması dolayısı ile MRI'nın kontrendike olduğu durumlarda yapılmalıdır²³.

Vena kavayı tutan non-metastatik tümörlerde tam bir cerrahi eksizyon sonrası 5 yıllık sağkalım süresi %14-68 arasında değişmektedir⁵⁸. BHK lu bazı olgularda çevre dokuya infiltre olmuş büyük böbrek kitleleri ile karşılaşılır. Abdomen duvarı tutulumu, sinir kökleri ya da paraspinal kas tutulumuna bağlı ciddi ağrı ile başvururlar. Karaciğer invazyonu metastaza nazaran daha az görülür. Büyük tümörler karaciğere bası yaparlar ama nadiren invaze ederler²³. İntestinal invazyon nadir görülmektedir ve kötü prognoz belirtisidir.

Cerrahi tedavi bu olgularda tek etkin tedavidir. Böbrek kitlesi ve invazyon saptanan organların rezeksiyonu ile tümöral oluşumun en-blok çıkartılması cerrahi esastır fakat bu hastalarda nadiren kür saptanmaktadır.

Metastatik böbrek hücreli karsinom tedavisi

Cerrahi tedavi

Metastatik böbrek kanserlerinin tedavisi iki boyutta ele alındığında. Birincisi, nefrektomi sonrasında hastayı klinik olarak tüm metastatik kitlelerden kurtarmak olan *metastazektomi*; ikincisi ise metastazları çıkarılamayacak durumda olan hastalarda sistemik tedavi öncesi primer tümörün çıkarılmasını ifade eden *sitoredüktif nefrektomi* 'dir. Primer tümör kitlesi immun sistem üzerinde negatif bir etki yaratmakta ve kitlenin çıkarılması immunoterapötik potansiyeli arttırmaktadır⁵⁹. Literatürde; nefrektomi operasyonu sonrası metastatik odaklarda (özellikle akciğer metastazlarında) spontan regresyon olan olgular bildirilmiş ve spontan remisyon insidansı düşük olmasına rağmen, nefrektominin yapılması için oldukça objektif bir veri oluşturmaktadır^{60,61}

Kemoterapi, immunoterapi ve hedefe yönelik tedaviler

BHK da standart sitotoksik ilaçların etkisiz olduğu gösterilmiş olup Avrupa üroloji kılavusuna göre monoterapi şeklinde kullanılması önerilmektedir. Gemsitabin ve 5-Flourourasil kombinasyonu en iyi cevap alınan kombinasyon olup %17 oranında cevap görülmektedir⁶².

İmmunoterapi baskılanmış immün sistemin canlandırılması veya duyarlılaştırılmış hücrelerin konakçıya geri verilmesi şeklinde uygulanabilmektedir. Sitokinlerin etkileri tam olarak anlaşılammış olup kanser hücreleri üzerine indirek etkili (hücreler arası sinyal mekanizması üzerinden) oldukları düşünülmektedir. İnterferon-alfa (IFN- α) ve interlökin-2(IL-2) kullanılan immunterapötiklerdir. IFN- α ile %10-25 oranlarında cevap alınırken, IL-2 ile %15 oranında cevap alınmıştır. IFN- α ve IL-2 kombinasyon tedavilerinde ise %30'a varan oranlarda cevap bildiren yayınlar mevcuttur⁶³.

Günümüzde metastatik böbrek tümörlerinde en çok kullanılan ajanlar angiogenez inhibitörleridir. Bu grupta Tirozin kinaz inhibitörleri, monoklonal antikorlar, VEGFR inhibitörleri, mTOR inhibitörleri bulunmaktadır. BHK yoğun vaskülarizasyona gerek duymaktadır ve bu noktada önemli rol oynayan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A (VEGF-A)'dür. Tümör hücreleri tarafından üretilen VEGF-A'nın vasküler endotellerdeki reseptörlere bağlanmasıyla oluşan reaksiyon ilk tirozin-kinaz fosforilasyon reaksiyonudur. Bu aşamayı sırası ile mikrovasküler permeabilite artması, gen ekspresyonunun yeniden programlanması, endotelyal hücre ömrünün uzaması, hücre yaşlanmasının gecikmesi ve anjiogenezin uyarılması şeklinde bir dizi olay meydana gelmektedir. VEGF-A tümör biyolojisinde birincil etkiye sahiptir. Kanser tedavisinde anlamlı bir hedef haline gelen en

önemli anjiogenetik sitokindir^{Hata! Yer işareti tanımlanmamış.}3. Tablo 6 de MBHK de tedavi şeması verilmiştir.

Tablo 6:EAU 2010 kılavuzuna göre sistemik tedavi şeması		
Tedavi	Risk veya önceki tedavi	Önerilen ajan
1.basamak tedavi	Düşük / orta risk	Sunitinib Bevacizumab+IFN-alfa Pazopanib
	Yüksek risk	Temsirolimus
2.basamak tedavi	Sitokine cevapsız	Sorafenib Pazopanib
	VEGF inhibitörlerine yanıtız	Everolimus
	mTOR inhibitörlerine yanıtız	Deneysel tedavi
Kaynak: Systemic therapy for metastatic RCC, Renal Cell Carcinoma, 2010 EAU Guidelines.		

Transglutaminaz enzimleri

Transglutaminazlar, proteinlerin post-translasyonel modifikasyonundan sorumlu enzim ailesidir.⁶⁴ Bu enzim ailesi, lizin ve glutamin rezidülerine ait sırasıyla ϵ -amino ve γ -karboksamid grupları arasında açıl-transferaz reaksiyonu katalizleyerek 'ε-γ-glutamil-lizin' izopeptid halkası oluştururken; bu halka proteinler arasında mekanik ve proteolitik yıkıma dirençli çapraz bağlar oluşturmaktadır.^{65,66} Bu transamidasyon aktivitesi, Ca^{+2} bağımlı bir reaksiyondur ve enzim proteinlerin yapısında konformasyonel değişiklikleri uyarmaktadır.⁶⁷ Sonuç olarak serbest amonyak ($-\text{NH}_3$) ortaya çıkarken proteinler kovalent bağlar ile bağlanmaktadır.⁶⁸

Bununla birlikte; primer aminler ve poliaminler de, amin birleşme reaksiyonları sırasında transglutaminazların substratı olabilmektedir. Transglutaminazlar, amin grubunun glutamin rezidüsü ile birleşme reaksiyonunu katalizleyerek; glutamin içeren polipeptid ile polimamin arasında (γ -glutamyl)-polyamin zinciri oluşmasını sağlamaktadır.^{69,70}

Öte yandan, transglutaminazların proteinlerin glutamin rezidülerinden amid grubunu ayırdığı ve ayrıca izopeptidaz aktivitesi göstererek 'ε-γ-glutamil-lizin' halkasını hidroliz edebildiği gösterilmiştir.^{71,72}

Doku transglutaminazı; Transglutaminaz-2 (TG2)

Doku transglutaminazı (TG2); transglutaminaz enzim ailesinin bir üyesidir ve diğer üyelerden farklı olarak vücudun farklı hücre ve doku tiplerinde geniş olarak eksprese edilmektedir.⁷³ Esas olarak *sitoplazmik* yerleşimi olan TG2, hücre ile matriks iletişimde rol aldığı *hücre dışına* sekrete edilebilirken; retinoblastom proteini (pRb), protein 53 (p53) ve

histonlar ile bağlanarak hücre siklusu ile ilişkili değişik yolları regüle ettiği *hücre çekirdeğine* de transloke olabilmektedir.^{74,75,76,77}

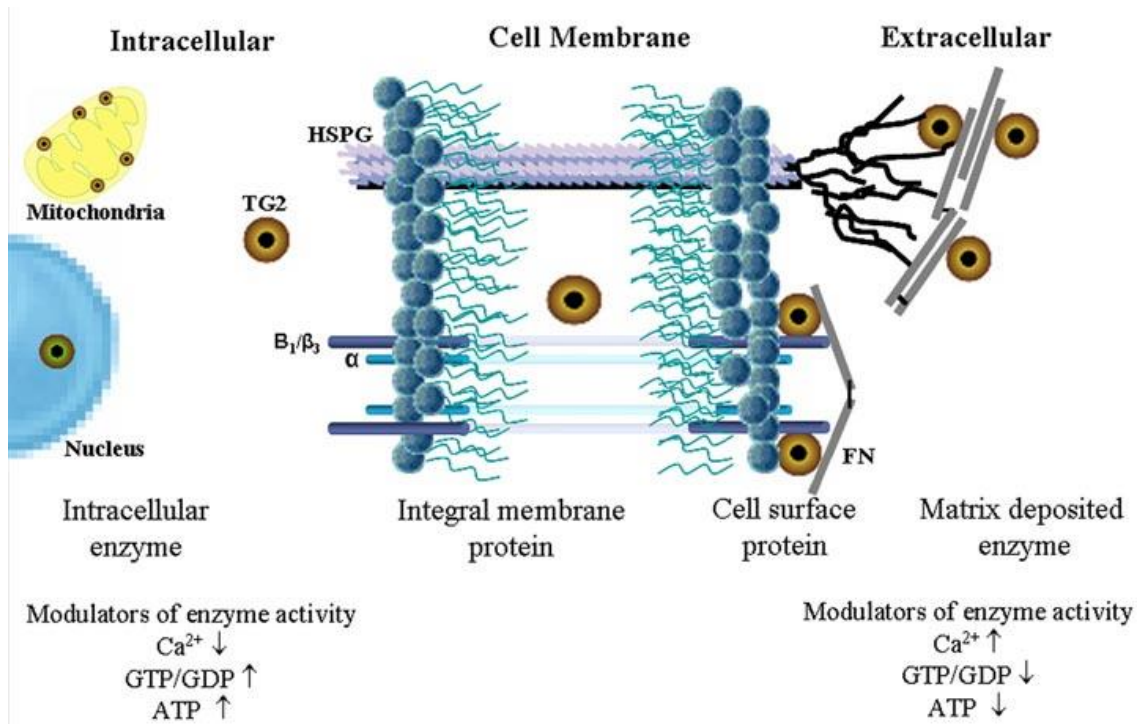
Transglutaminaz ailesinin daha önce belirtilen Ca^{+2} bağımlı çapraz bağlama özelliğinin yanında; TG2, guanozin trifosfat (GTP) bağlanma bölgesine ve Magnezyum (Mg^{+2}) bağımlı GTPaz aktivitesine sahiptir. Benzer olarak, adenozin trifosfat (ATP)'ın da TG2 tarafından Mg^{+2} bağımlı reaksiyon ile hidroliz edildiği bildirilmiştir.^{78,79} Achyuthan ve ark.ları tarafından yapılan, TG2'nin çapraz bağlama aktivitesinin guanozin nükleotidi tarafından yarışmasız bağlanma ile inhibe edildiğini gösteren çalışması, enzimin bu aktivitesinin hem Ca^{+2} hem de GTP tarafından regüle edildiğine işaret etmektedir.⁸⁰ Takip eden çalışmalarda, Mg-ATP ve Mg-GTP komplekslerinin TG2 enziminde konformasyonel değişiklikler yaptığı gösterilmiştir. Mg-ATP bağlanması, TG2'nin GTPaz aktivitesini inhibe ederken; Ca^{+2} bağımlı transglutaminaz aktivitesini etkilememektedir. Bunun yanında, Mg-GTP bağlanması ise Ca^{+2} bağımlı transglutaminaz aktivitesini inhibe ederken; ATPaz aktivitesine etkilemediği gösterilmiştir.⁷⁹ Bu bulgulara göre, TG2 aktivitesinin enzimin bulunduğu bölgedeki Mg-ATP ve Mg-GTP kompleksleri ile Ca^{+2} konsantrasyonu tarafından yönetildiği söylenebilmektedir.

Öte yandan, TG2'nin protein disülfid izomeraz (PDI) aktivitesinin olduğu ve bu özelliği ile polipeptidler arasında disülfid bağlar oluşturarak denatüre inaktif Rnaz A molekülünü doğal aktif haline çevirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, TG2'nin PDI aktivitesinin transamidasyon ve GTPaz reaksiyonlarının yapıldığı bölgeler tarafından katalizlenmediği; dolayısıyla bu aktivitenin Ca^{+2} konsantrasyonuna ya da nükleotid varlığına bağlı olmadığı gösterilmiştir.⁸¹

Bunların yanında, güncel çalışmalarda TG2'nin intrinsik kinaz aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Bu konuda, insan meme kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışma ile, TG2'nin

'insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3'ü fosforile ederek kinaz aktivitesi gösterdiği ilk kez Mischra ve ark.'ları tarafından tanımlanmıştır.⁸² Aynı araştırmacılar, TG2'nin kinaz aktivitesini protein 53 (p53) fosforilasyonu ile göstermiştir.(Mischra Biochem Biophys Res Commun. 2006 Jan 13;339(2):726-30) Bunun yanında, TG2'nin retinoblastom proteinini protein kinaz A üzerinden fosforile ederek; bu proteinin kinaz aktivitesini artırdığı bu araştırmacılar tarafından gösterilmiştir.⁸³ Ayrıca, bu üç çalışmada da, TG2'nin intrinsik kinaz aktivitesinin Ca^{+2} konsantrasyonu ile inhibe edildiği gösterilmiştir.

Özet olarak; doku transglutaminazı (TG2), temelde hücre içi stoplazmada bulunurken farklı reaksiyonlarda rol almak üzere hücre dışı matrikse ya da nukleusa yönlendirilebilen; GTP ve ATP'nin Ca^{+2} 'dan bağımsız hidrolizini, protein disülfid izomeraz reaksiyonunu ve Ca^{+2} 'a bağımlı post-translasyonel protein modifikasyonunu katalize ederken, p53 ve Rb proteinlerini fosforile ederek intrinsik kinaz aktivitesi gösterebilen multifonksiyonel özgün bir proteindir.



Şekil 1. Hücre içi, hücre membranı ve ekstrasellüler matrikste yer alan TG2'nin farklı kompartmanlarda dağılımını göstermektedir. **Kaynak: Telci D ve ark. Front Bioscience, Vol. 11, pp. 867-882, 2006**

Transglutaminaz-2 aktivitesi ve ilişkili moleküller

Daha önce belirtildiği üzere TG2; stoplazmada, nukleusta ve ekstrasellüler matrikste (ECM) bulunduğu gibi mitokondri ve hücre membranında da görev alabilmektedir.⁸⁴ Normal koşullarda, bu kompartmanlarda TG2 aktivitesi Ca^{+2} ve nükleotidlerin (GTP/GDP veya ATP/ADP) kontrolindedir; Ca^{+2} konsantrasyonunun düşük, GTP/ATP konsantrasyonunun yüksek olduğu hücre içinde TG2'nin çapraz bağlama özelliği latent kalmaktadır.⁸⁵ Öte yandan, Ca^{+2} konsantrasyonunun yüksek nükleotid konsantrasyonunun düşük olduğu ECM'te TG2 proteinleri çapraz bağlayabilmekte ve hücre dışı stabilizasyonunu artırabilmektedir. Ayrıca TG2'nin, transforming growth factor- β (TGF- β) bağlayıcı proteinden ayırmak yoluyla aktif TGF- β düzeyini yükselttiği gösterilmiştir.⁸⁶ Aktif TGF- β düzeyindeki artış; kollajen, fibronektin (FN) ve doku metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP) gibi ECM sabitleyici proteinlerin sentezini artırırken; bu proteinlerin yıkımından sorumlu matrix metalloproteinaz (MMP)'ların transkripsiyonunu azaltmaktadır.^{87,88} Böylece; TG2, TGF- β 'yı aktifleyerek hücre dışı sabitleyici proteinlerin biyosentezini artırmış olmaktadır.^{89,90}

Transglutaminaz-2, çapraz bağlama enzim aktivitesinden bağımsız olarak, hücre adezyonu ve sağkalımında sinyal molekülü olarak rol oynamakta; bu sırada hücre yüzeyinde bulunan $\beta 1$ ve $\beta 3$ integrinler (hücre adezyon reseptörleri) ve Sindekan-4 (SDC4) ile işbirliği içinde çalışmaktadır.^{91,92} Bununla birlikte, TG2 hücre dışına yönlendirildiğinde, bu kompartmandaki substratı FN'e bağlanarak bir kompleks oluşturmakta; bu kompleks hücre yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikanlardan SDC4 ile iletişime geçerek hücre adezyonunu uyarmaktadır.⁹³

Öte yandan, FN glikoprotein yapısında olup, hücre dışı matriksin devamlılığını sağlayan ana komponenttir. Doku onarımı, neovaskülarizasyon ve embriyogenez gibi çeşitli süreçlerde hücre adezyonu ve migrasyonunda önemli rolü bulunmaktadır.⁹⁴ Fibronektin, hücre yüzeyinde bulunan integrin proteinleri aracılığıyla hücrelere bağlanmaktadır. Hücre adezyon bölgesi içeren Arg-Gli-Asp zinciri ile FN, $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha IIB\beta 3$ integrin alttiplerine bağlanmaktadır.⁹⁵ Hücrelerin FN'e, integrin aracılı adezyonu sonucunda integrin kümeleri oluşmakta ve bu integrin kümeleri, 'fokal adezyon' adı verilen hücre-matriks bağlantılarının oluşmasını sağlamaktadır. Fokal adezyonlar, integrinlerin stoplazmik tarafında toplanan birçok sitoskeletal ve sinyal molekülünün oluşturduğu multiprotein komplekslerdir.⁹⁶ Stoplazmadaki birçok protein arasından, 'fokal adezyon kinaz (FAK)' adı verilen stoplazmik tirozin kinaz -integrinler ile bağlantı kurarak- protein kinaz C, mitojen ile aktive olan protein kinaz ve fosfotidilinozitol -3-kinaz yollarını aktive ederek adezyonda görev almaktadır.⁹⁷

İntegrinler, hücre-hücre ve hücre-ECM adezyonunda rol alan hücre yüzey (membran) reseptörleridir. Ayrıca integrinler, sitoskeletal proteinler ile etkileşime girerek immun yanıt gelişiminde, lökosit migrasyonunda, hemostazda ve karsinogenezde anahtar role sahip hücre içi sinyal yollarını aktiflemektedir.⁹⁸ İntegrinler, α ve β alt ünitelerinden oluşan heterodimerik proteinlerdir. Memelilerde, 19 α ve 8 β alt ünitesini kodlayan gen tanımlanırken bu proteinler 25 farklı reseptör kombinasyonu oluşturmaktadır.⁹⁹ Hücre yüzeyinde inaktif olarak bulunan integrinler, stoplazmada bulunan bölgelerinin hücre içi proteinler ile işbirliği sonucunda; hücre dışında bulunan fibronektin, laminin, vitronektin ve fibrinojen gibi ligandlarına bağlanarak aktive olmaktadır.¹⁰⁰ (Inside-out sinyal yolu). Bununla beraber, hücre dışı ligandlar ile bağlanma sonucunda oluşan sinyaller, sitoskeletal re-organizasyon, gen ekspresyonu ve hücre differansiasyonunu uyarmaktadır.¹⁰¹ (Outside-in sinyal yolu) İntegrinler, bu 'iki yönlü (bi-dierctional)' sinyal transfer özelliği ile hücre içi aktin sitoskeletal

molekülleri ve ECM arasında yapısal bağ kurarak yukarıda bahsedilen fizyolojik ve/veya fizyopatolojik süreçlerde ihtiyaç duyulan hücre-ECM adezyonunun anahtar molekülleridir.¹⁰²

Sindekanlar; hücre adezyonu, büyüme faktör sinyali, lipaz aktivitesi ve anti-koagülasyonda rol oynayan, transmembran yerleşimli heparan sülfat proteoglikan ailesidir.¹⁰³ Sindekan molekülü; heparan sülfat zinciri ile ekstrasellüler, karakteristik yapısı ile transmembran ve C-terminal ünitesi ile stoplazmik olmak üzere -integrin molekülüne benzer şekilde- 3 ayrı kompartman ile aynı anda ilişki içinde bulunabilmektedir.¹⁰⁴ Bu ailenin bir üyesi olan Sindekan 4 (SDC4), integrinlerin ko-reseptörü olarak hücre adezyonunda rol almakta; ECM proteinleri bu rol sırasında heparan sülfat zinciri ile bağ kurmaktadır.¹⁰⁵ Buna ek olarak SDC4'ün, integrin temelli hücre adezyonunda aksesuar sinyal molekülü olarak rol oynadığı ve direkt olarak FN'e bağlanarak -protein kinaz C α (PKC α) ve Rho kinaz aktivasyon ile- α 5 β 1 integrinler ve ilişkili fokal adezyonların oluşmasını sağladığı gösterilmiştir.¹⁰⁶

Özet olarak, hücre adezyonu sırasında TG2'nin ekstrasellüler alanda FN'e bağlanarak oluşturduğu TG2-FN kompleksi, hücre yüzeyindeki β 1 ve β 3 integrinlere bağlanmaktadır. Böylece integrin merkezli FN adezyonu -TG2 varlığında- gerçekleşmiş olmaktadır.⁹¹ Buna ek olarak, TG2, MMP'lar tarafından ECM'in yıkımı sonucunda ortaya çıkan RGD peptidlerine yanıt olarak hücre adezyonu görevini sürdürmeye devam etmektedir. Bu adezyon yolağı, TG2-FN kompleksinin SDC4'ü uyarması sonucunda PKC α aktivasyonu ve takip eden integrinin 'inside-out' sinyal yolu ile gerçekleşmektedir. Sonuçta integrinler, aktin sitoskeletal yapılar ve ECM arasındaki bağlantı görevini ve FAK sinyal yolu aktivasyonunu yerine getirmektedir.⁹²

Sonuç olarak; TG2, farklı lokalizasyonlarda ve çeşitli moleküllerle işbirliğine girerek, yara onarımı, doku fibrozisi, apoptozis ve karsinogenezde rol oynamaktadır.

Transglutaminaz-2 ve moleküler düzeyde karsinogenez

Transglutaminaz-2'nin kanser gelişimindeki rolü araştırılmakla birlikte; daha önce bahsedilen aksiyon mekanizmalarının karsinogenez ile ilişkisine atıfta bulunan kanıtlar mevcuttur. Sitolitik TG2'nin hücrenin farklı koşullardaki ihtiyacına göre hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik rolü olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.^{107,108,109} Transamidasyon ve GTP bağlama özellikleri ile TG2 tümör hücrelerinin büyüme faktörlerine duyarsız ve apoptoza dirençli olmasına katkı sağlayabilir.¹¹⁰ Hamsterlarda deneysel malign fibrosarkom hücreleri ile yapılan bir çalışmada, TG2'nin hem enzim aktif hem de inaktif formunun hücre siklusunda S fazından G2/M fazına geçişi geciktirdiği; bu durumun çapraz bağlama enzim aktivitesinden değil GTP bağlama özelliğinden kaynaklandığı gösterilmiştir.¹¹¹ Bununla birlikte, meme ve pankreas kanser hücrelerinde yapılan bir çalışma, hücre içi TG2'nin transkripsiyon faktör nükleer faktör- κ B'yı aktifleyerek apoptozisi inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır.¹¹²

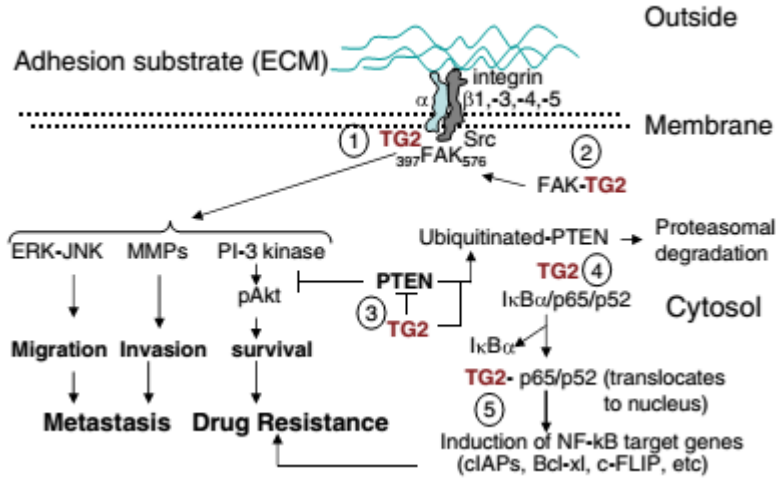
Karsinogenez, vücuttaki hücrelerin anaplastik değişimi sonucu kontrolsüz bir şekilde büyümesi olarak tanımlanabilirken; öte yandan kendi içinde belirli evreleri olan bir süreçtir. Primer tümör hücrelerinin bir araya gelmesinden başlayarak progresyon, anjiogenez ve neovaskülarizasyon, lokal invazyon, lenfovasküler invazyon ve metastaz gibi evreleri takip eden bu sürecin her aşamasının olmazsa olmazı hücre-hücre ve/veya hücre-ECM adezyonudur. Tümör hücrelerinin adezyon özelliğinin sonlanması yukarıda bahsi geçen evrelerde de duraksamaya tümörün progresif, invaziv ve metastatik özelliklerinin kaybolmasına yol açacaktır.^{113,114}

Hücre dışı matrikste hücre adezyonunda görev alan TG2'nin bu rolünü, integrin merkezli adezyonda FN ko-reseptörü ve SDC4 ile integrinleri aktive ederek hücre içi kinaz aktiviteleri ile gerçekleştirdiği daha önce bahsedilmiştir.^{91,92} Karsinogenezin erken

dönemlerinde (primer tümör oluşumu) TG2 ekspresyonunun azaldığı; bununla birlikte progresyon, invazyon ve metastaz gibi ileri evrelerde arttığı ve tümör hücrelerinin kemorezistans özellik sağladığı gösterilmiştir.¹¹⁵ Bu bulguyu destekler şekilde, bir başka çalışmada TG2 ekspresyonunun metastatik meme kanser hücrelerinde arttığı ve kemorezistans sağladığı gösterilmiştir.¹¹⁶ Artmış TG2 ekspresyonunun metastaz ve kemorezistans ile ilişkilendirildiği takip eden çalışmalarda, yine meme kanserinde ve malign melanomda artmış TG2'nin FN'e bağlanarak hücre yüzeyindeki integrin merkezli adezyon mekanizması ile bu etkiyi gösterdiği de kanıtlanmıştır.^{117,118,119} Pankreas duktal adenokarsinom hücrelerinde yapılan bir başka çalışma ise, TG2'nin FAK ile ko-lokalize olarak fokal adezyonları uyardığı gösterilmiştir.¹²⁰

Öte yandan, matrix MMP-1 enziminin artmış ekspresyonu TG2'nin yıkımı ile sonuçlanmakta; ve tümör hücrelerinin adezyonunun inhibisyonuna yol açmaktadır. Bu mekanizmanın metastatik potansiyeli olan tümör hücrelerini serbest bırakarak invazyon yapabilmesini sağladığı düşünülebilmektedir.¹²¹

Anjiogenez, patolojik yeni kan damarlarının oluşması; tümör oluşumu, progresyonu ve metastaz gelişiminde önemli ve esansiyel bir fenomendir. Bell ve ark.ları yaptıkları bir çalışmada, kapiller damar oluşumu sırasında TG2 ekspresyonunun down-regüle olduğunu ve anjiogenezin başlangıç safhalarında düşük TG2 düzeylerine ihtiyaç olduğunu göstermiştir.¹²² Bu bulguları destekler nitelikte, TG2 artışının anjiogenez sırasında endotel oluşumunu inhibe ettiği ve çapraz bağlı ECM proteinleri oluşturduğu Jones ve ark.'larının CT26 kolon karsinom hücrelerinde yaptıkları çalışmada gösterilmiştir.¹²³ Bu çalışmada araştırmacılar, katalitik aktivitesi olan TG2'nin tümör hücrelerine uygulanmasından sonra damar oluşumunun azaldığı; fibrozis benzeri dokunun ve ϵ - γ -glutamil-lizin zincirlerinin arttığı ve bu sayede tümör progresyonunun yavaşladığı sonucuna ulaşmıştır.



Şekil 2. TG2'nin karsinogenezdeki moleküler rolü ve hücre içi sinyal mekanizmaları **Kaynak: Mehta K. Amino Acids (2009) 36:709–716**

Transglutaminaz-2 ve Böbrek Hücreli Karsinom

Transglutaminaz-2'nin BHK'daki rolünün araştırıldığı ve kliniğimizin de araştırma grubunda yer aldığı çalışmada, TG2'nin integrinβ1 (ITG-β1) ve SDC-4 ile birlikte artmış ekspresyonu, BHK gelişimi ve takiplerde ortaya çıkan metastaz ile ilişkilendirilmiştir.¹²⁴ Bir başka çalışmada, BHK'da TG2 ekspresyonunun direkt olarak tümör süpresör genlerden mikro RNA-1285 (miRNA-1285) tarafından regüle edildiği; miRNA-1285'in de down-regüle olması sonucu TG2'nin BHK'da arttığı gösterilmiştir.¹²⁵ Bu iki çalışma, tezin tartışma bölümünde daha detaylı irdelenecektir.

Gereç ve Yöntemler

Araştırma ve Kontrol Olgularının Belirlenmesi

Araştırma olguları, detayları aşağıda belirtilen farklı anabilim dallarındaki taramalar ile belirlendi;

- İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda küratif ya da sitoreduktif amaçla yapılan radikal ya da parsiyel nefrektomi hastaları Mart 2013'ten Ocak 2000'e kadar retrospektif olarak tarandı. Bu hastalardan, onkolojik takiplerinde progresyon (uzak metastaz ya da lokal nüks) saptanan ve rezeksiyon yapılan hastalar tespit edildi.
- İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde hedefe yönelik tedavi ile takipli metastatik böbrek hücreli karsinom hastalarının veritabanı Mart 2013'ten Ocak 2007'ye kadar yine retrospektif olarak tarandı ve listelendi.
- Ocak 2000 – Mart 2013 tarihleri arasında primeri bilinmeyen akciğer ve kemik metastazlarına yönelik sırasıyla İstanbul Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi ve Ortopedi Anabilim Dalı'nda tanısal biyopsi ya da metastazektomi amaçlı operasyonları BHK olarak raporlanan ve İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na yönlendirilen hastalar retrospektif olarak tarandı ve listelendi.

Yukarıda belirtilen taramalar ile belirlenen; hem radikal ya da parsiyel nefrektomi piyesleri hem de uzak metastazlara ya da lokal nükse yönelik tanısal ya da tedavi edici operasyon piyesleri İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi'nde ulaşılan 33 hasta çalışmaya dahil edildi.

Öte yandan, radikal ya da parsiyel nefrektomi patolojisine göre bu 33 metastatik hasta ile cinsiyet, yaş, Fuhrmann nükleer grade (FNG), patolojik T evresi ve sarkomatoid değişim parametreleri bakımından mümkün olan en yakın benzerlik derecesine sahip ve o döneme kadarki takiplerinde uzak metastaz ya da lokal nüks saptanmayan bir başka 33 hasta kontrol grubu olarak tayin edildi.

Taramalar sonucunda ulaşılan toplam 66 araştırma ve kontrol hastasının radikal/parsiyel nefrektomi piyeslerine ve 33 araştırma hastasının metastatik odaklarına ait parafine gömülü dokuları İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden bulunarak ortaya konuldu.

İmmünohistokimyasal Yöntem

İmmünohistokimyasal inceleme sonuçlarının güvenilirliğini sağlayabilmek için, önceki literatürlere ve antikor üretici firmanın kılavuzu esas alınarak meme invaziv duktal adenokarsinom tanısı almış bir vakaya ait formalin fikse parafine gömülü tümör dokusu kontrol bloğu olarak tayin edildi. (literatür) Bu kontrol bloğu kullanılarak antikorun çalışıp çalışmadığı ve en iyi hangi koşullarda çalıştığı tespit edildi.

Çalışma kapsamına alınan araştırma ve kontrol hastalarına ait tümörü temsil eden her bir parafin bloğundan iki adet 3µm kalınlığında kesitler, hazır temin edilen pozitif şarjlı lamlara alındı. Hazırlanan bu preparatlar, 56°C etüvde bir gece boyunca bekletilerek kurutuldu ve kesitlerin yapışması sağlandı. Bir sonraki gün lamalar, Ventana Medical System-Benchmark XT/IHS Staining® modülüne yerleştirildi ve sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı;

- 15 dakikalık deparafinizasyon işlemi

- Antikor için uygun sürede EDTA ile pH:8 ortamında antijen geri kazanım yöntemi
- 32 dakika boyunca 37°C'de 1/200 dilüsyon oranında primer antikor inkübasyonu
- 2 kez 8 dakika boyunca amplifier A ve B işlemi
- 4 dakika boyunca asetat buffer içinde bakır-sülfat çözeltisi uygulaması
- HE ile zıt boyama yöntemi

Yukarıda tanımlanan işlemler uygulandıktan sonra, modülden çıkarılanlar lamalar deterjanlı su ile çalkalanıp saf alkolde 3 kez 3 dakika boyunca bekletildi. Ardından yine 3 kez 3 dakika boyunca bu kez ksilende bekletildikten sonra DPX-‘Mountant for microscopy’® ile kapatma yapıldı. Tablo 1, araştırmada kullanılan antikor ve yöntem hakkında özetleyici bilgi sunmaktadır.

Antikor ve klon	Üretici firma ve katalog no	Sulandırma oranı	İnkübasyon Süresi
Monoklonal fare antikor Transglutaminaz II Ab-1 CUB 7402 klonu	Thermo Scientific® California, U.S.A. Katalog no: MS-224-R7	1 / 200	32 dakika 37°C
Tablo 1. Kullanılan antikor ve immunhistokimya yöntem özellikleri			

Mikroskopik Değerlendirme

Mikroskopik değerlendirme, histopatolojik ve klinik bulgular açısından kör olan deneyimli iki farklı patalog tarafından tez sahibinin dış gözlemci olarak katıldığı bir ortamda semi-kantitatif bir skorlama yöntemiyle gerçekleştirildi

Mevcut literatür ve üretici firma kılavuzu doğrultusunda, TG2 için stoplazmik ve membranöz boyanma pozitif olarak kabul edildi. (literatür)

Mikroskop altında sırasıyla 4, 10 ve 20'lik büyütmede ve gerek duyulduğunda 40'lık büyütmede detaylı gözlem yapıldıktan sonra, preparatlara antikorla boyanma yoğunluğu ve yaygınlığı bakımından sırasıyla 0-3 ve 0-4 arasında iki farklı skor verildi. (Tablo 2) Daha sonra bu iki skor toplanarak, dokunun antikorla immunhistokimyasal boyanma ilişkisi 0-7 arasında verilen bir toplam skor üzerinden değerlendirildi.

Boyanma parametresi	Skor
Yoğunluk	
Boyanma yok	0
Zayıf	1
Orta	2
Güçlü	3
Yaygınlık	
< % 10	0
% 10 – 30	1
% 30 – 50	2
% 50 – 70	3
% 70 <	4

Tablo 2. Mikroskop altında değerlendirilen preparatların semi-kantitatif skorlanma yöntemi

Çalışma Veritabanının Oluşturulması

Araştırma ve kontrol hastalarının demografik, klinik, histopatolojik ve sağkalım bilgilerine ilgili anabilim dallarından ulaşıldıktan sonra Microsoft® yazılım firmasının Office-

Excel 2010 programında detaylı bir veritabanı oluşturuldu. Daha sonra, bu veritabanına hastaların TG2 immunhistokimya skorları kayıt edildi.

İstatistiksel Analiz

Oluşturulan detaylı veritabanı istatistiksel analizde kullanılacak parametrelere indirgendikten sonra IBM® firmasının Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versiyon 19 programına aktarıldı ve analiz bu programda yapıldı.

Hastalara ait tanımlayıcı istatistik bilgileri analiz edildi. Aşağıda belirtilen yöntemlerle üç farklı gruplama oluşturuldu;

1. Primer böbrek tümör dokusundan alınan TG2 skoruna göre yapılan ikili grup
2. Metastatik tümör dokusundan alınan TG2 skoruna göre yapılan ikili grup
3. Metastazın görülme dönemine göre (operasyon öncesi veya sonrası) yapılan ikili grup

Bu gruplar arasında; demografik, klinik ve histopatolojik parametreler karşılaştırıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılması sırasında ki-kare testi kullanıldı. Normal dağılıma uyan sürekli değişkenler için Student's t-test; normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sağkalım analizleri, Kaplan-Meier metodu kullanılarak yapıldı; log rank testi ile karşılaştırıldı. Sonuçların $p < 0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Hastaliksız sağkalım analizi, primer böbrek cerrahisi öncesinde metastatik olduğu bilinen 13 hasta değerlendirme dışında tutularak yapılırken; kansere özgü ve genel sağkalım analizinde tüm populasyon kullanılmıştır.

Bulgular

Çalışmada araştırılan toplam popülasyona ait demografik, perioperatif, histopatolojik ve klinik özelliklerin tanımlayıcı bilgileri Tablo 7’de listelenmiştir. Buna göre, hastaların operasyon sırasındaki ortalama yaşı 59.60 ± 10.30 iken; 45 erkek 18 kadın hasta mevcuttu. Primer tümör çapı ortanca değeri 8 cm bulunurken; sırasıyla 7, 31 ve 25 tümörü FNG’i 2, 3 ve 4 olarak saptandı. En fazla bildirilen patolojik T evresinin pT3a (n=36) olduğu gözlemlendi. Primer böbrek ve metastatik tümör dokularının ortanca TG2 immunhistokimya skorları sırasıyla 5 ve 7 olarak bulundu. Ortanca takip süresi 35.5 ay iken; bu süre boyunca 20’si kansere bağlı ve 8’i kanser dışı sebeple toplam 28 (% 45.45) ölüm olduğu görüldü.

Tablo 7. Araştırmadaki toplam hasta popülasyonuna ait tanımlayıcı istatistik bilgileri	
Parametre (birim)	Bulgu
Hasta Sayısı (n)	63
Erkek / Kadın (n, %)	45 / 18, % 71.42 / 28.68
Operasyon sırasındaki yaş (yıl)	59.60 ± 10.30
Operasyon Tarafı; Sol / Sağ (n, %)	34 / 29, % 55.97 / 46.03
Nefrektomi Tipi	
Radikal (n, %)	59, % 93.65
Açık (n, %)	49, % 77.77
Laparoskopik (n, %)	10, % 15.87
Parsiyel (n, %)	4, % 6.35
Açık (n, %)	-
Laparoskopik (n, %)	4, % 6.35

Primer Tümör Patolojik Çapı (cm)	8 (2.5-23.5)
Böbrek Hücreli Karsinom Alt Tipleri	
Berrak Hücreli (n, %)	59, % 93.65
Papiller Tip (n, %)	4, % 6.35
Fuhrmann Nükleer Grade	
Grade 1	-
Grade 2	7, % 11.1
Grade 3	31, % 49.21
Grade 4	25, % 39.68
Patolojik T Evresi	
T1a (n, %)	4, % 6.35
T1b (n, %)	8, % 12.70
T2a (n, %)	13, % 20.64
T2b (n, %)	-
T3a (n, %)	36, % 57.14
T3b (n, %)	-
T3c (n, %)	-
T4 (n, %)	2, % 3.18
Cerrahi Sınır Pozitifliği (n, %)	5, % 7.94
Mikrovasküler İnvazyon (n, %)	35, % 55.55
Nekroz (n, %)	36, % 57.14
Sarkomatoid Varyasyon (n, %)	22, % 34.92
Perinefrik İnvazyon (n, %)	19, % 30.16
Renal Ven İnvazyonu (n, %)	29, % 46.03

TG2 İmmunhistokimya Skoru	
Primer Böbrek Tümörü (ortanca, en alt-en üst)	5 (0-7)
Metastatik Tümör Odağı (ortanca, en alt-en üst)	7 (2-7)
Takip Süresi (ay)	
	35.5 (1-126)
Metastaz dokuları	
Akciğer (n, %)	11, % 34.38
Kemik (n, %)	7, % 21.88
Lenfadenopati (n, %)	3, % 9.38
Batın (n, %)	2, % 6.25
Mediasten (n, %)	1, % 3.13
Karşı Sürrenal Bez (n, %)	2, % 6.25
Deri (n, %)	2, % 6.25
Lokal nüks (n, %)	2, % 6.25
Karşı böbrek (n, %)	1, % 3.13
Tiroid (n, %)	1, % 3.13
Beyin (n, %)	1, % 3.13
Over (n, %)	1, % 3.13
Karaciğer (n, %)	1, % 3.13
Sağkalım Sonuçları	
Sağkalım (n, %)	35, % 55.55
Ölüm (n, %)	28, % 44.45
Kansere Bağlı (n, %)	20, % 31.75
Kanser Dışı (n, %)	8, % 12.70

Hastalar, metastatik ve non-metastatik olarak iki gruba ayrıldığında; primer böbrek tümörü TG2 skoru metastatik grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla saptandı. (Tablo 2, ortanca 6'ya karşı 4, $p < 0.001$) Metastatik hastaların, primer böbrek ve metastatik tümör dokularında TG2 skoru karşılaştırıldığında ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan; bununla birlikte klinik olarak göz önünde tutulabilir bir fark olduğu saptandı. (Tablo 8, ortanca 6'ya karşı 7, $p=0.086$)

Tablo 8. Metastatik primer böbrek tümörlerinin, non-metastatik primer böbrek tümörleri ve metastatik tümör dokuları ile TG2 immunhistokimya skoru bakımından karşılaştırılması

	Metastatik hastaların primer böbrek tümörü	Non-metastatik hastaların primer böbrek tümörü	p	Metastatik hastaların primer böbrek tümörü	Metastatik hastaların metastatik tümör dokusu	p
n	32	31		32	32	
TG2 skoru	6 (0-7)	4 (0-7)	<0.001	6 (0-7)	7 (0-7)	0.086

Toplam populasyona ait primer böbrek tümörü boyanma skorunun ortanca değeri (5) kestirim alınarak hastalar yüksek riskli ve düşük riskli olmak üzere iki gruba ayrıldı; yüksek riskli (Grup 1, $5 \leq$ skor) ve düşük riskli (Grup 2, skor < 5) grupta sırasıyla 41 ve 22 hasta yer aldı. Bu iki grup arasında; yaş, cinsiyet, operasyon tarafı, BHK alt tipi, FNG, pT evresi bakımından fark saptanmazken; patolojik tümör çapı Grup 1'de anlamlı olarak daha az bulundu. (ortanca 7.2'ye karşı 9.75 cm, $p=0.023$) Bu iki grup arasında metastatik hasta sayısı yüksek riskli grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulundu. (28'e karşı 13 hasta, $p < 0.001$) İki grubun karşılaştırmalı analiz sonuçları Tablo 9'de detaylı bir şekilde listelenmiştir.

Tablo 9. Primer böbrek tümöründe TG2 skorlama sonucuna göre yüksek riskli ($5 \leq \text{skor}$) ve düşük riskli ($\text{skor} < 5$) grupların klinik ve histopatolojik parametreler bakımından karşılaştırılması

	Grup 1-Yüksek risk ($5 \leq \text{skor}$)	Grup 2-Düşük risk ($\text{skor} < 5$)	p
n	41	22	
Operasyon Sırasındaki Yaş (yıl)	59.17 ± 10.00	60.41 ± 10.99	0.882
Cinsiyet			0.316
Erkek (n, %)	31, % 75.6	14, % 63.6	
Kadın (n, %)	10, % 24.4	8, % 36.4	
Operasyon Tarafı			0.946
Sol (n, %)	22, % 53.7	12, % 54.5	
Sağ (n, %)	19, % 46.3	10, % 45.5	
Böbrek Hücreli Karsinom Alt Tipi			0.667
Berrak Hücreli (n, %)	38, % 92.7	21, % 95.5	
Papiller Tip (n, %)	3, % 7.3	1, % 4.5	
Patolojik Tümör Çapı (cm)	7.2 (2.5-23.5)	9.75 (3.5-19.0)	0.023
Fuhrmann Nükleer Grade			0.524
Grade 2 (n, %)	5, % 12.2	2, % 9.1	
Grade 3 (n, %)	18, % 43.9	13, % 59.1	
Grade 4 (n, %)	18, % 43.9	7, % 31.8	
Mikrovasküler İnvazyon (n, %)	21, % 51.2	14, % 63.6	0.344
Nekroz (n, %)	23, % 56.1	13, % 59.1	0.819
Sarkomatoid differansiyasyon (n, %)	16, % 39.1	6, % 27.3	0.351
Cerrahi Sınır Pozitifliği (n, %)	3, % 7.3	2, % 9.1	0.804

Perinefrik İnvazyon (n, %)	16, % 39.02	11, % 50.0	0.102
Renal Ven İnvazyonu (n, %)	18, % 43.9	11, % 50.0	0.643
Patolojik T Evresi			0.478
pT1	9, % 22.0	3, % 13.6	
pT2	9, % 22.0	4, % 18.2	
pT3	21, % 51.2	15, % 68.2	
pT4	2, % 4.9	-	
Metastataz durumu			<0.001
Metastatik (n, %)	28, % 68.3	4, % 18.2	
Non-metastatik (n, %)	13, % 31.7	18, % 81.8	

Metastatik tümör dokularına ait TG2 skoru ortanca değeri (7) kestirim alınarak metastatik hastalar arasında da gruplamalı bir karşılaştırma yapıldı. Buna göre, yüksek riskli (Grup A, $7 \leq$ skor) ve düşük riskli (Grup B, skor < 7) grupta sırasıyla 19 ve 13 hasta yer aldı. Bu iki grup arasında,; yaş, cinsiyet, operasyon tarafı, FNG, pT evresi ve diğer histopatolojik parametreler bakımından istatistiksel fark saptanmadı. İki grubun primer tümörlerinin TG2 skoruna göre riski benzer ($p=0.683$) bulunurken; metastazın operasyon öncesinde ya da sonrasında olması ($p=0.926$) ve sağkalım bulguları ($p=0.641$) açısından da fark saptanmadı. Bu karşılaştırmalı analiz bulguları Tablo 10'de detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 10. Metastatik tümör dokularında TG2 immunhistokimya skorlama sonucuna göre yüksek riskli (skor=7) ve düşük riskli grupların (skor<7) klinik ve histopatolojik parametrelerinin karşılaştırılması			
	Yüksek risk (skor=7)	Düşük risk (skor<7)	p
n	19	13	
Operasyon Sırasındaki Yaş (yıl)	58.85 ± 11.98	58.16 ± 7.33	0.841

Cinsiyet			0.783
Erkek (n, %)	14, % 73.7	9, % 69.2	
Kadın (n, %)	5, % 26.3	4, % 30.8	
Operasyon Tarafı			0.403
Sol (n, %)	13, % 68.4	7, % 53.8	
Sağ (n, %)	6, % 31.6	6, % 46.2	
Böbrek Hücreli Karsinom Alt Tipi			0.401
Berrak Hücreli (n, %)	18, % 94.7	13, % 100	
Papiller Tip (n, %)	1, % 5.3	-	
Patolojik Tümör Çapı (cm)	8 (2.5-23.5)	8 (4.5-22)	0.880
Fuhrmann Nükleer Grade			0.850
Grade 2 (n, %)	2, % 10.5	1, % 7.7	
Grade 3 (n, %)	7, % 36.8	6, % 46.2	
Grade 4 (n, %)	10, % 52.6	6, % 46.2	
Mikrovasküler İnvazyon (n, %)	13, % 68.4	7, % 53.8	0.403
Nekroz (n, %)	14, % 73.7	8, % 61.5	0.467
Sarkomatoid differansiyasyon (n, %)	10, % 52.6	6, % 46.2	0.719
Cerrahi Sınır Pozitifliği (n, %)	2, % 10.5	-	0.227
Perinefrik İnvazyon (n, %)	4, % 21.1	4, % 30.8	0.533
Renal Ven İnvazyonu (n, %)	11, % 57.9	6, % 46.2	0.513
Patolojik T Evresi			0.762
pT1	4, % 21.1	2, % 15.4	
pT2	2, % 10.5	3, % 23.1	
pT3	12, % 63.2	8, % 61.5	

pT4	1, % 5.3	-	
Primer böbrek tümörü TG2 skoru			0.683
Yüksek; skor \geq 5 (n, %)	17, % 89.5	11, % 84.6	
Düşük; skor $<$ 5 (n, %)	2, % 10.5	2, % 15.4	
Metastaz tipi			0.926
Operasyon öncesi (n, %)	7, % 36.84	5, % 38.46	
Operasyon sonrası (n, %)	12, % 63.16	8, % 61.54	
Kansere bağlı sağkalım			0.641
Sağkalım (n, %)	8, % 42.11	4, % 30.77	
Ölüm (n, %)	11, % 57.89	9, % 69.23	

Metastatik hastalar, preoperatif dönemde (Grup I) veya postoperatif takiplerde (Grup II) metastazın saptanması durumuna göre ikiye ayrılarak bir karşılaştırma daha yapıldı. Bu grupta sırasıyla 13 ve 19 hasta Grup I ve Grup II’de yer aldı. Ortalama yaş, Grup I’de anlamlı olarak artmış bulunurken (63.33 ± 8.64 ’e karşı 54.79 ± 8.23 , $p=0.01$); diğer demografik ya da histopatolojik parametreler fark bulunmadı. Bu iki grup arasında, hem primer böbrek tümörü (ortanca 5.5’ a karşı 6, $p=0.548$) hem de metastatik tümör dokularının (ortanca 7’e karşı 7, $p=0.780$) TG2 skoru bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıkta olmadığı gözlemlendi. Tablo 11’te de bu karşılaştırmanın bulguları detaylandırılmıştır.

Tablo 11. Metastatik hastaların preoperatif ve postoperatif metastaz tanısı almasına göre gruplandırılması ile yapılan karşılaştırmalı analiz			
	Grup I-Preoperatif	Grup II-Postoperatif	p
n	13	19	
Operasyon Sırasındaki Yaş (yıl)	63.33 ± 8.64	54.79 ± 8.23	0.01
Cinsiyet			0.109

Erkek (n, %)	7, % 58.3	16, % 84.2	
Kadın (n, %)	5, % 41.7	3, % 15.8	
Operasyon Tarafı			0.179
Sol (n, %)	6, % 50	14, % 73.7	
Sağ (n, %)	6, % 50	5, % 26.3	
Böbrek Hücreli Karsinom Alt Tipi			0.419
Berrak Hücreli (n, %)	12, % 100	18, % 94.7	
Papiller Tip (n, %)		1, % 5.3	
Patolojik Tümör Çapı (cm)	7.75 (4-23.5)	8 (2.5-22)	0.417
Fuhrmann Nükleer Grade			0.589
Grade 2 (n, %)	-	3, % 15.8	
Grade 3 (n, %)	6, % 50	7, % 36.8	
Grade 4 (n, %)	6, % 50	9, % 47.7	
Mikrovasküler İnvazyon (n, %)	9, % 75	11, % 57.9	0.332
Nekroz (n, %)	9, % 75	12, % 63.2	0.492
Sarkomatoid differansiyasyon (n, %)	7, % 58.3	8, % 42.1	0.379
Cerrahi Sınır Pozitifliği (n, %)	1, % 8.3	1, % 5.3	0.735
Perinefrik İnvazyon (n, %)	3, % 25	5, % 26.3	0.935
Renal Ven İnvazyonu (n, %)	7, % 58.3	9, % 47.4	0.552
Patolojik T Evresi			0.834
pT1 (n, %)	3, % 25	3, % 15.8	
pT2 (n, %)	1, % 8.3	4, % 21.1	
pT3 (n, %)	8, % 66.7	11, % 57.9	
pT4 (n, %)	-	1, % 5.3	

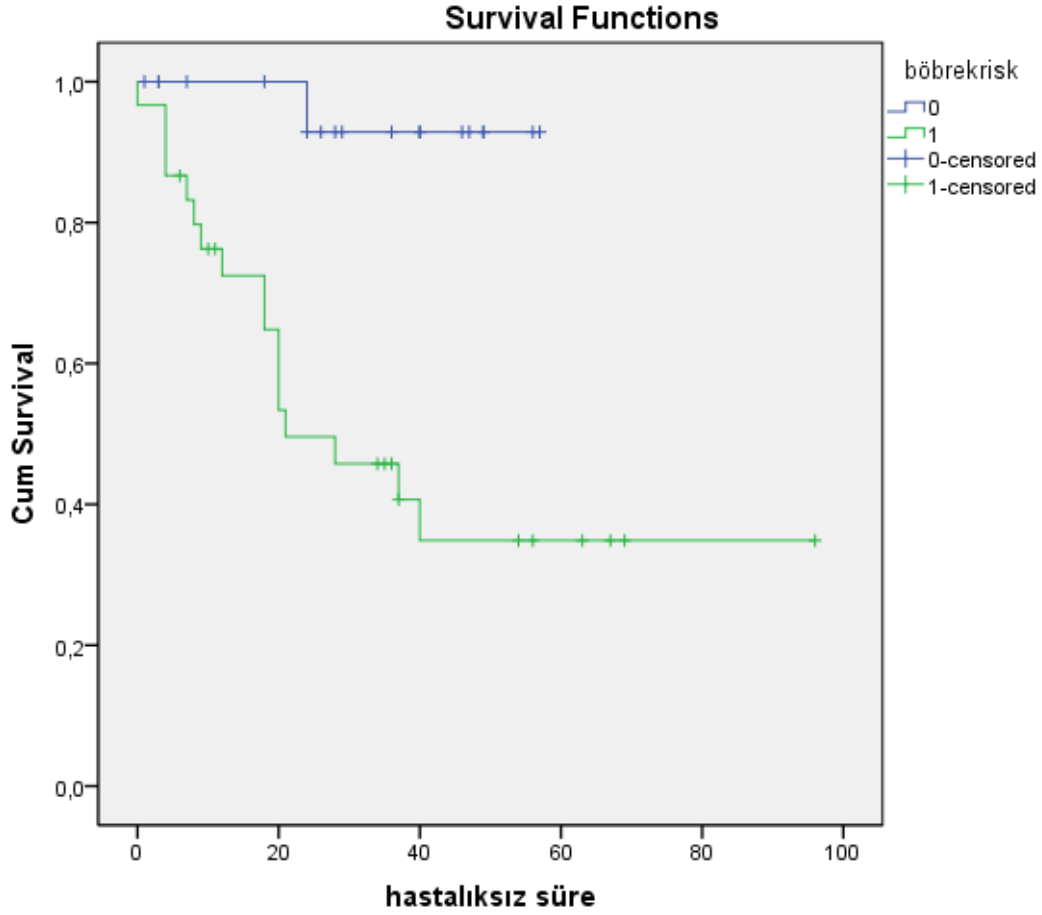
Primer böbrek tümörü TG2 skoru	5.5 (4-7)	6 (0-7)	0.548
Primer böbrek tümörü TG2 skoru			0.619
Yüksek; skor \geq 5 (n, %)	10, % 83.3	17, % 89.5	
Düşük; skor $<$ 5 (n, %)	2, % 16.7	2, % 10.5	
Metastatik doku TG2 skoru	7 (4-7)	7 (2-7)	0.780
Metastatik doku TG2 skoru			0.788
Yüksek; skor=7 (n, %)	7, % 58.3	12, % 63.2	
Düşük; skor $<$ 7 (n, %)	5, % 41.7	7, % 36.8	

Metastatik grup ile non-metastatik grup arasında hastaların takip süresi bakımından fark olmadığı gözlemlendi. (ortanca 32'e karşı 36 ay, p=0.517) Sağkalım analizleri, primer ve metastatik tümör dokularının TG2 skorlarına göre iki farklı şekilde yapıldı;

Primer böbrek tümör dokusunun TG2 skoruna göre yüksek ve düşük riskli gruplarda yapılan sağkalım analizlerine ait Kaplan-Meier eğrileri Şekil 3'te gösterilmiştir. Buna göre, yüksek riskli grupta 5 yıllık hastalısız sağkalım beklenti oranı (% 34.9) düşük riskli gruptan (% 92.9) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük bulundu. (log rank, p=0.001). Buna ek olarak, yüksek riskli grubun 5 yıllık kansere özgü sağkalım beklentisi (% 47.4) düşük riskli gruptan (% 86.5) yine istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı. (log rank, p=0.04) İki grup arasında, 5 yıllık genel sağkalım beklentisi açısından farklılık gözlenmedi. (% 40.4'e karşı % 55.6; log rank, p=0.343)

Metastatik tümör dokusunun TG2 skoruna göre yüksek ve düşük riskli gruplarda yapılan sağkalım analizlerine ait Kaplan-Meier eğrileri ise Şekil 4'te gösterilmiştir. İki grup arasında 5 yıllık hastalısız (% 0'a karşı % 0, p=0.875), kansere özgü (% 27'e karşı % 28.8 p=0.743) ve genel (% 27'e karşı % 28.8, p=0.743) sağkalım beklentisi açısından fark olmadığı saptandı.

Şekil 3a. Primer Böbrek dokularının TG2 skoruna göre yüksek ve düşük riskli grubun hastaliksız sağkalıma ait Kaplan-Meier eğrileri (5 yıllık hastaliksız sağkalım beklentisi yüksek ve düşük risk grubu için sırasıyla % 34.9 ve % 92.9, p=0.001)

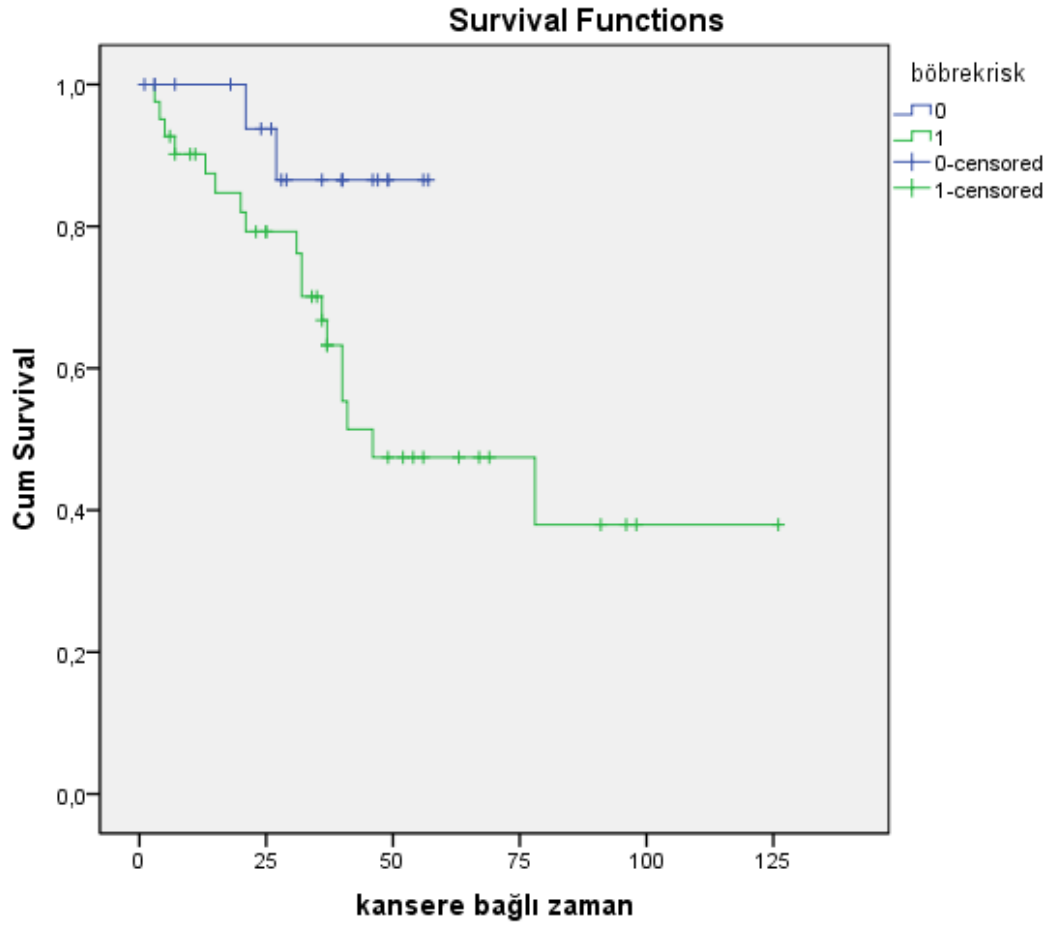


Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	10,737	1	,001

Test of equality of survival distributions for the different levels of böbrekrisk.

Şekil 3b. Primer Böbrek dokularının TG2 skoruna göre yüksek ve düşük riskli grubun kansere özgü sağkalıma ait Kaplan-Meier eğrileri (5 yıllık kansere özgü yaşam beklentisi yüksek ve düşük risk grubu için sırasıyla % 47.4 ve % 86.5, p=0.04)

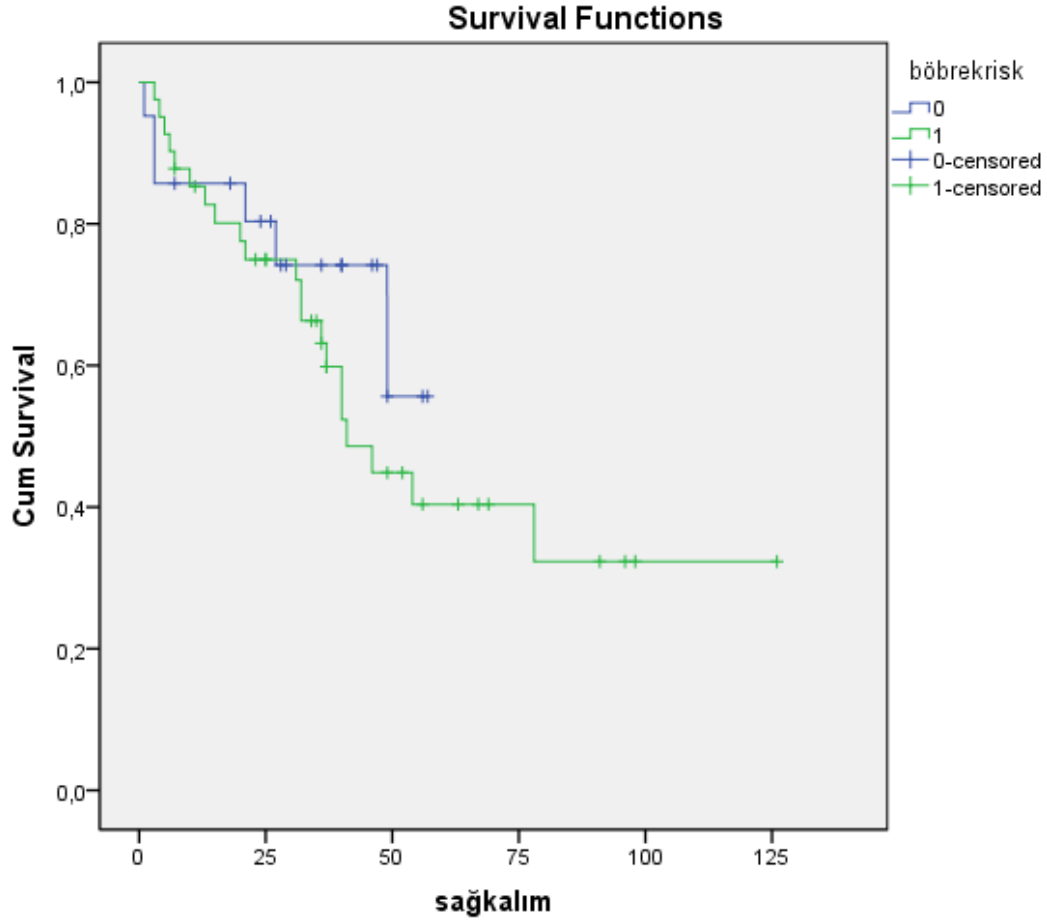


Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4,221	1	,040

Test of equality of survival distributions for the different levels of böbrekrisk.

Şekil 3c. Primer Böbrek dokularının TG2 skoruna göre yüksek ve düşük riskli grubun genel sağkalıma ait Kaplan-Meier eğrileri (5 yıllık yaşam beklentisi yüksek ve düşük risk grubu için sırasıyla % 40.4 ve % 55.6, p=0.343)

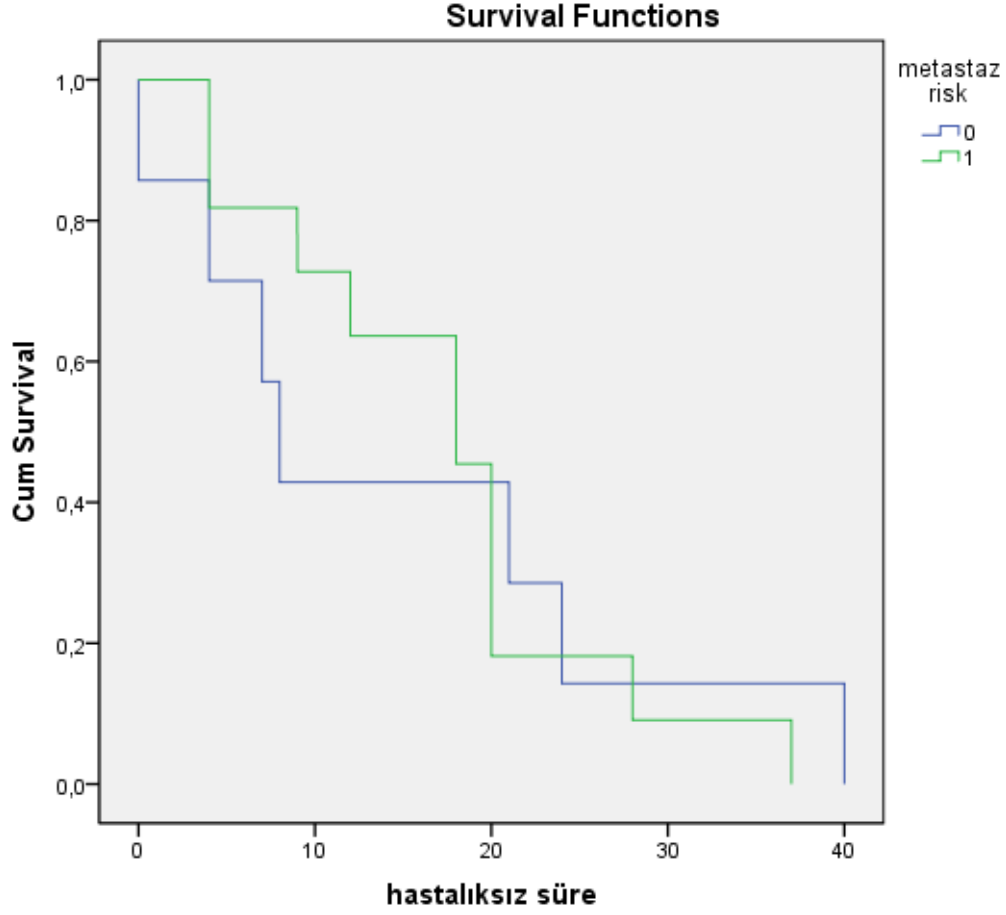


Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,898	1	,343

Test of equality of survival distributions for the different levels of böbrekrisk.

Şekil 4a. Metastatik dokuların TG2 skoruna göre yüksek ve düşük riskli grupların hastaliksız sağkalıma ait Kaplan-Meier eğrileri (5 yıllık hastaliksız beklenti yüksek ve düşük risk grubu için sırasıyla % 0 ve % 0 , p=0.875)

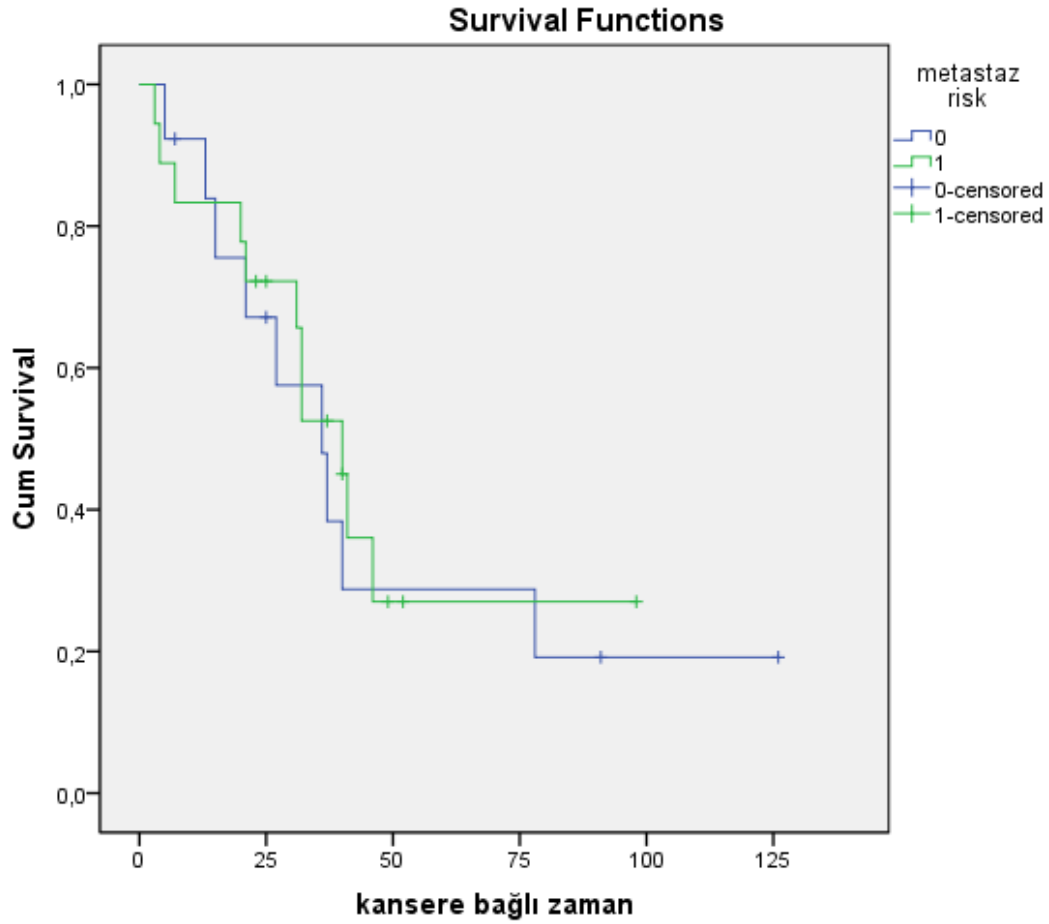


Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,025	1	,875

Test of equality of survival distributions for the different levels of metastaz risk.

Şekil 4b. Metastatik dokuların TG2 skoruna göre yüksek ve düşük riskli grupların kansere özgü sağkalıma ait Kaplan-Meier eğrileri (5 yıllık hastaliksız beklenti yüksek ve düşük risk grubu için sırasıyla % 27 ve % 28.8 , p=0.743)

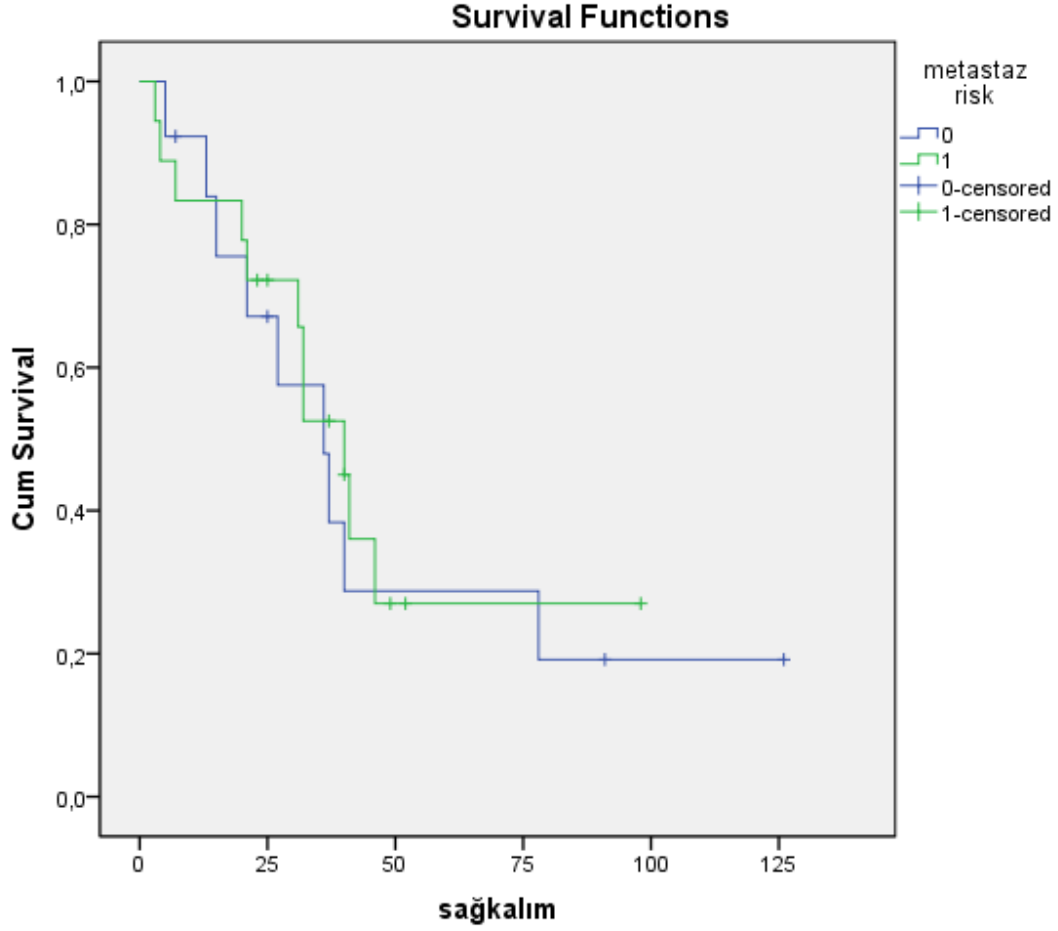


Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,107	1	,743

Test of equality of survival distributions for the different levels of metastaz risk.

Şekil 4c. Metastatik dokuların TG2 skoruna göre yüksek riskli ve düşük riskli grup arasında genel sağkalım karşılaştırmalı analizi (Kaplan-Meier sağkalım grafiği) (5 yıllık yaşam beklentisi yüksek ve düşük risk grubu için sırasıyla % 27.0 ve % 28.8 , p=0.743)

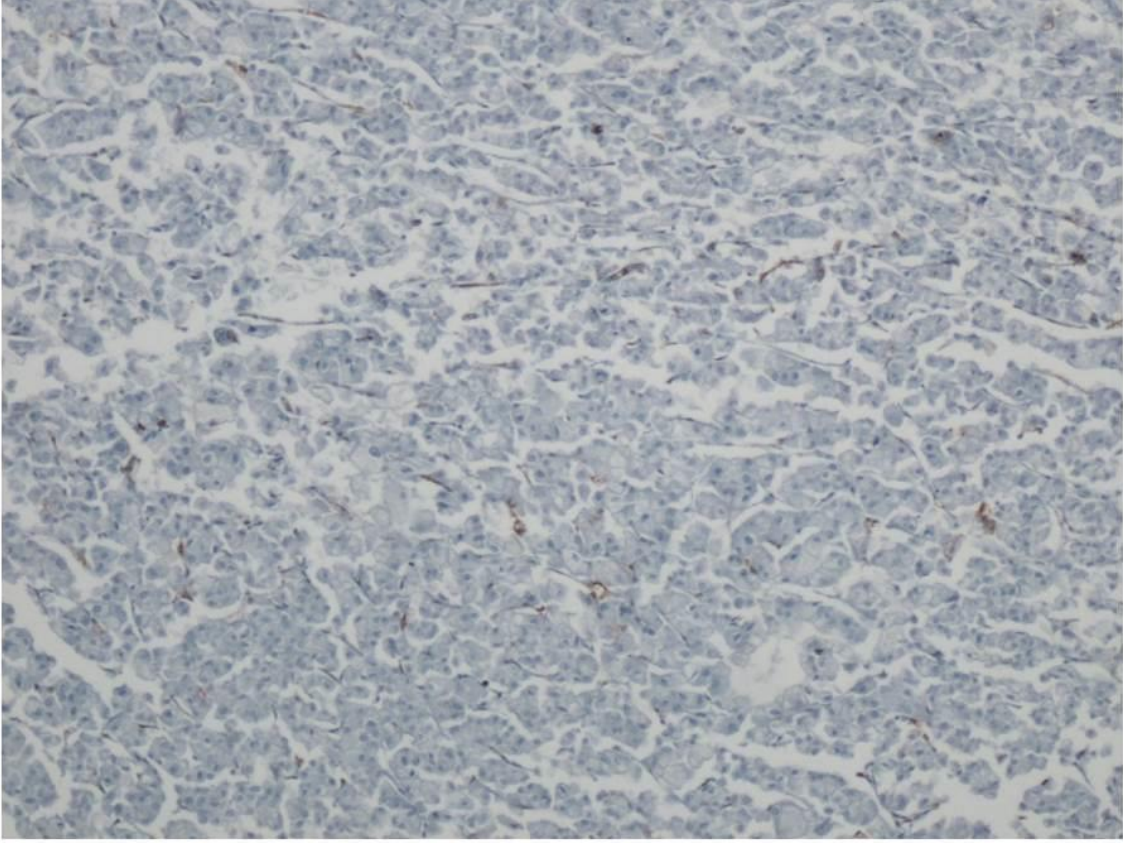


Overall Comparisons

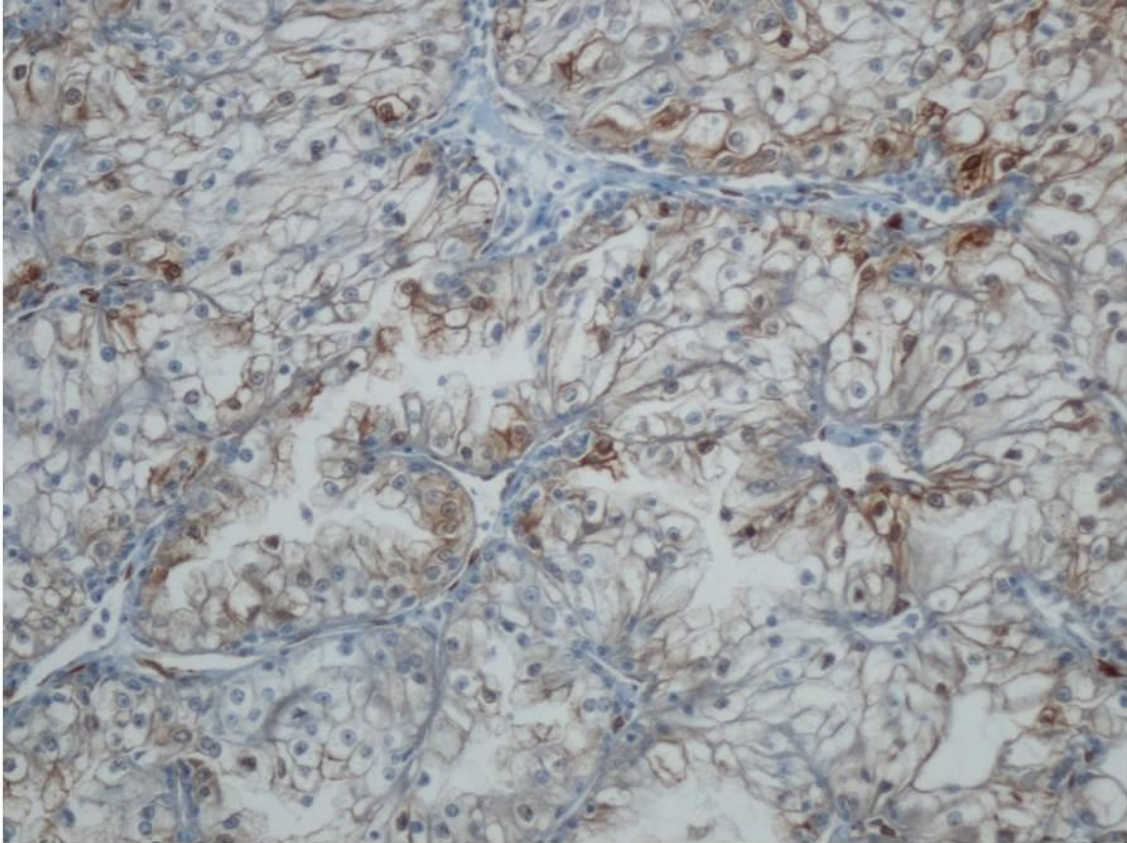
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,107	1	,743

Test of equality of survival distributions for the different levels of metastaz risk.

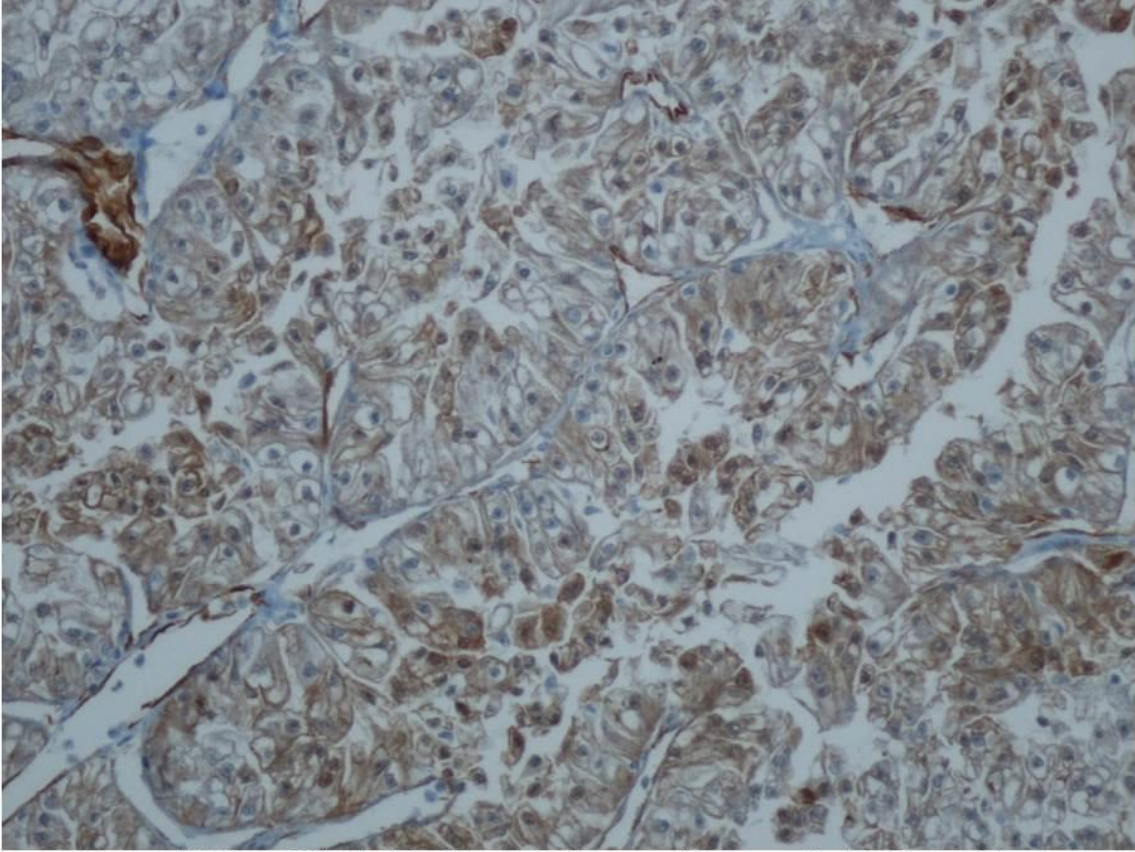
Şekil 5. Farklı klinik ve histopatolojik özellikteki olguların TG2 skorları ve mikroskop bulguları gösterilmektedir.



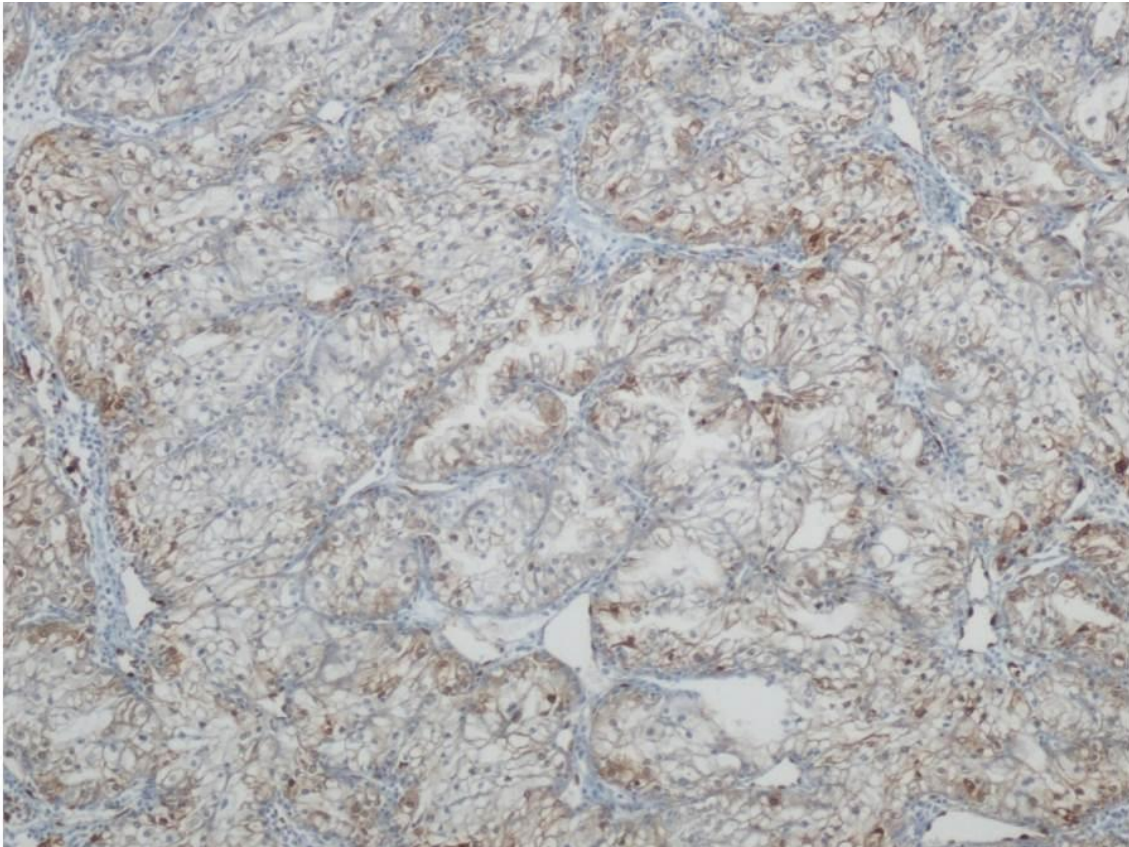
A) Hasta no: 61 Fuhrmann Nükleer Grade 3, pT1a, sarkomatoid varyasyon (-), non-metastatik olguda primer böbrek tümörü
Yoğunluk: 0 Yaygınlık: 0 Toplam Skor: 0 (1x10)



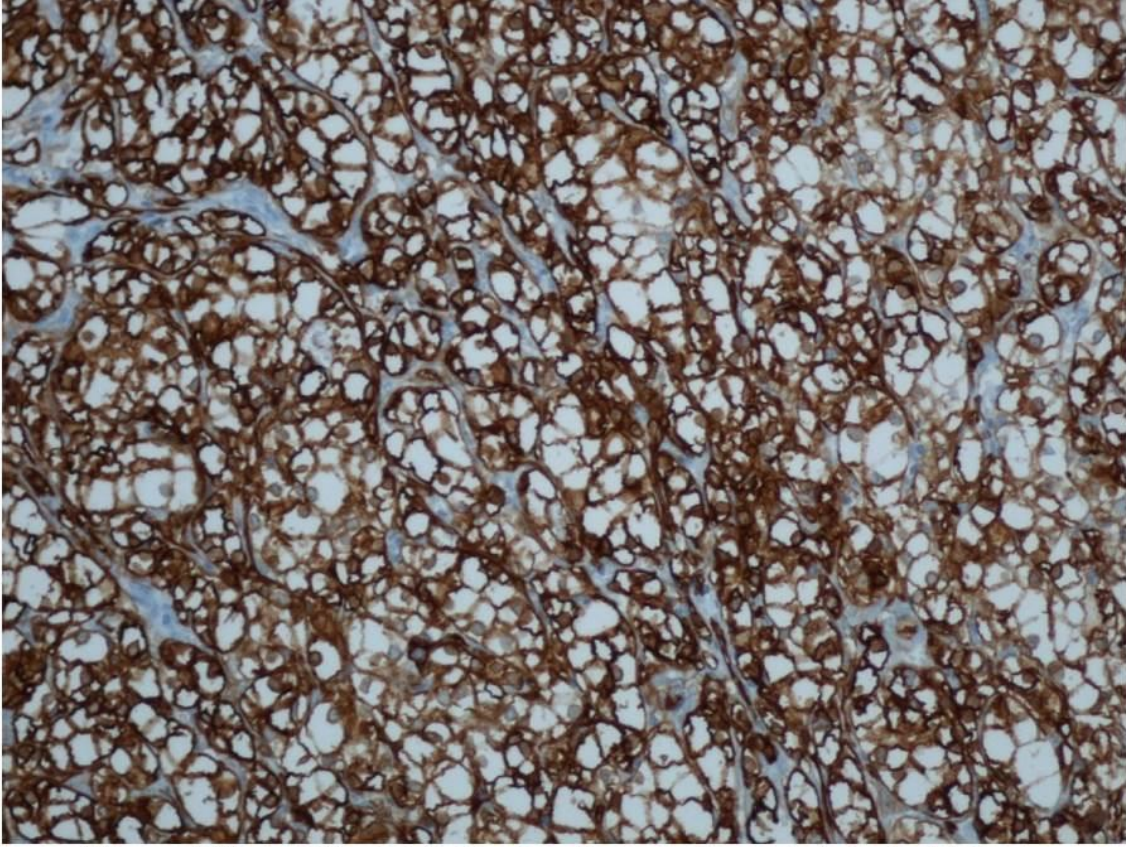
B) Hasta no: 11 Fuhrmann Nükleer Grade 3, pT1b, sarkomatoid varyasyon (-), non-metastatik olguda primer böbrek tümörü
Yoğunluk: 1 Yaygınlık: 1 Toplam Skor: 2 (1x20)



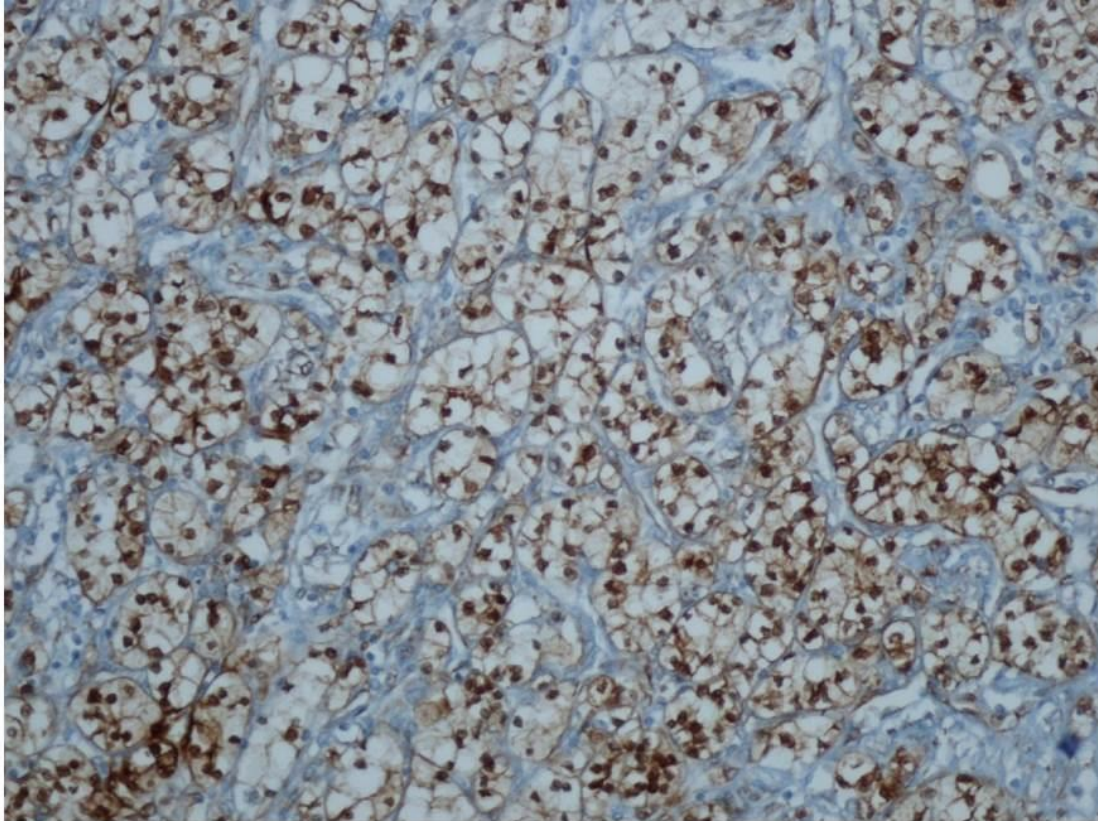
C) Hasta no: 46 Fuhrmann Nükleer Grade 3, pT2a, sarkomatoid varyasyon (-), non-metastatik olguda primer böbrek tümörü
Yoğunluk: 2 Yaygınlık: 3 Toplam Skor: 5 (1x20)



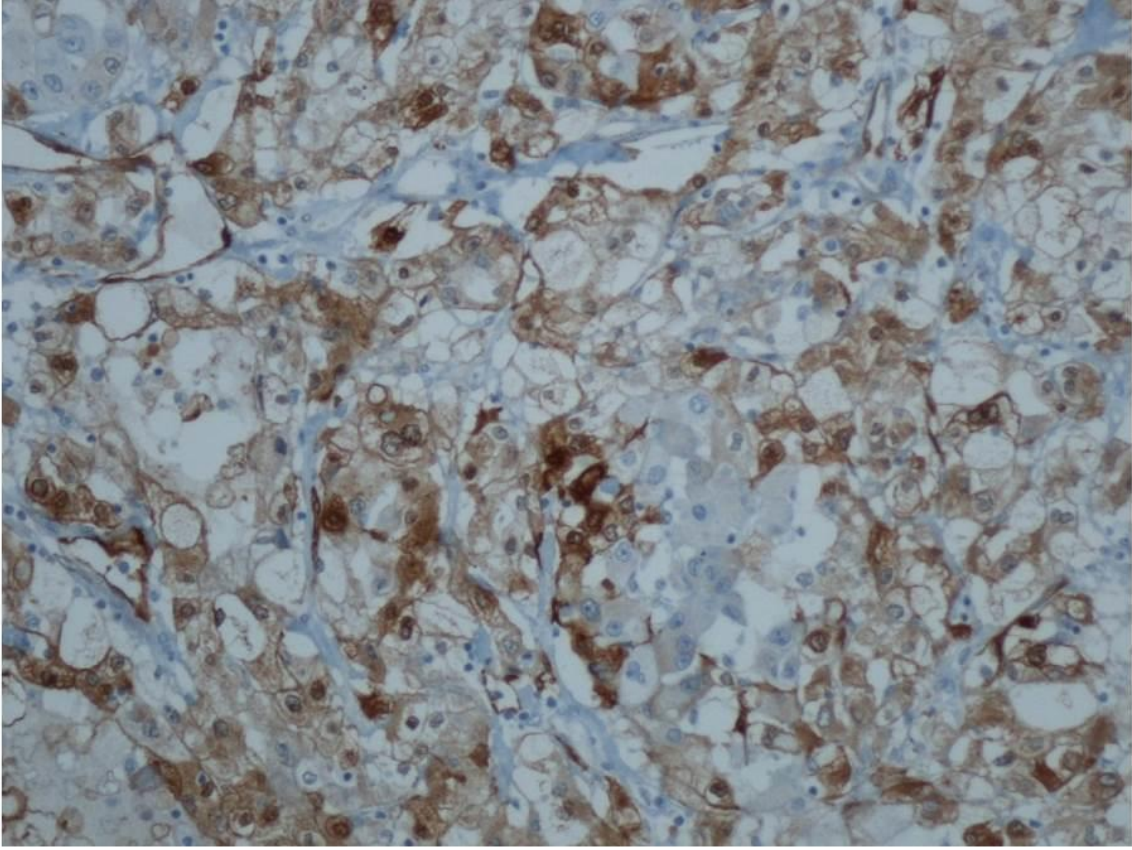
D) Hasta no: 30 Fuhrmann Nükleer Grade 2, pT2a, sarkomatoid varyasyon (-), non-metastatik olguda primer böbrek tümörü
Yoğunluk: 2 Yaygınlık: 2 Toplam Skor: 4 (1x10)



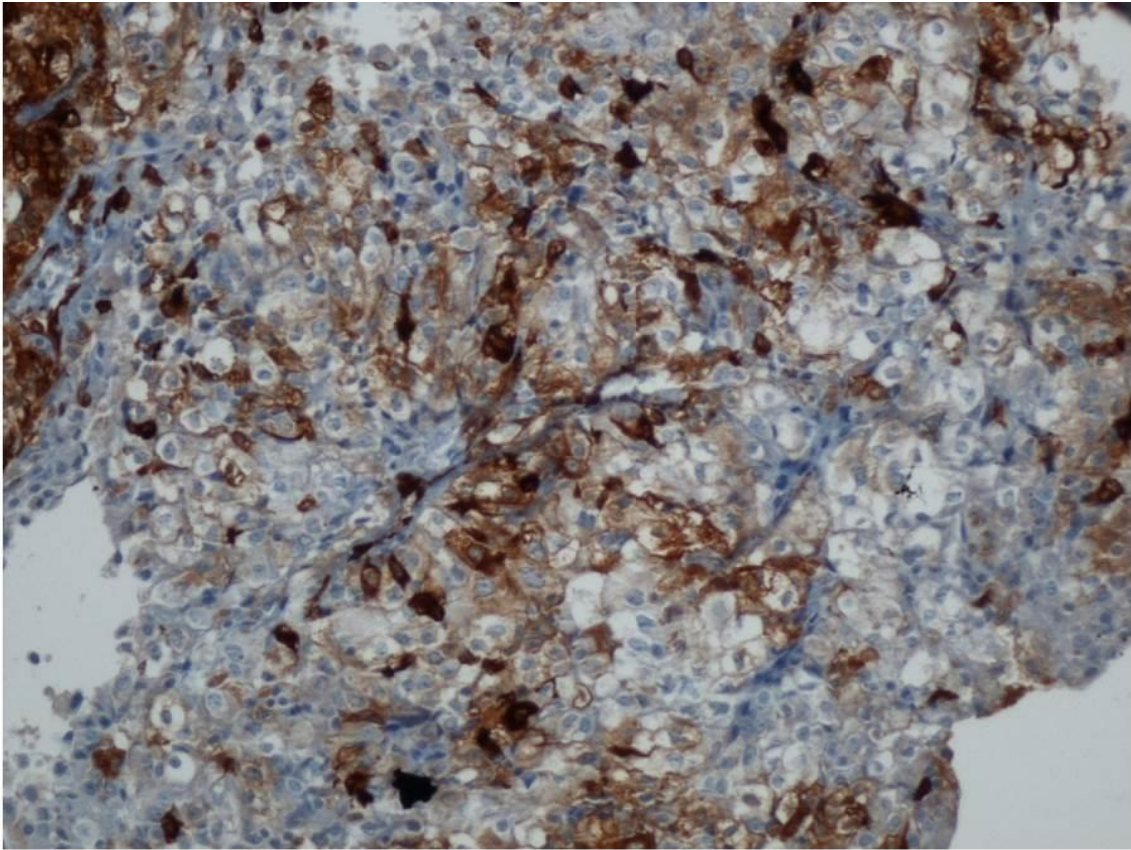
E) Hasta no: 22 Fuhrmann Nükleer Grade 3, pT2a, sarkomatoid varyasyon (-), metastatik olguda primer böbrek tümörü
Yoğunluk: 3 Yaygınlık: 4 Toplam Skor: 7 (1x20)



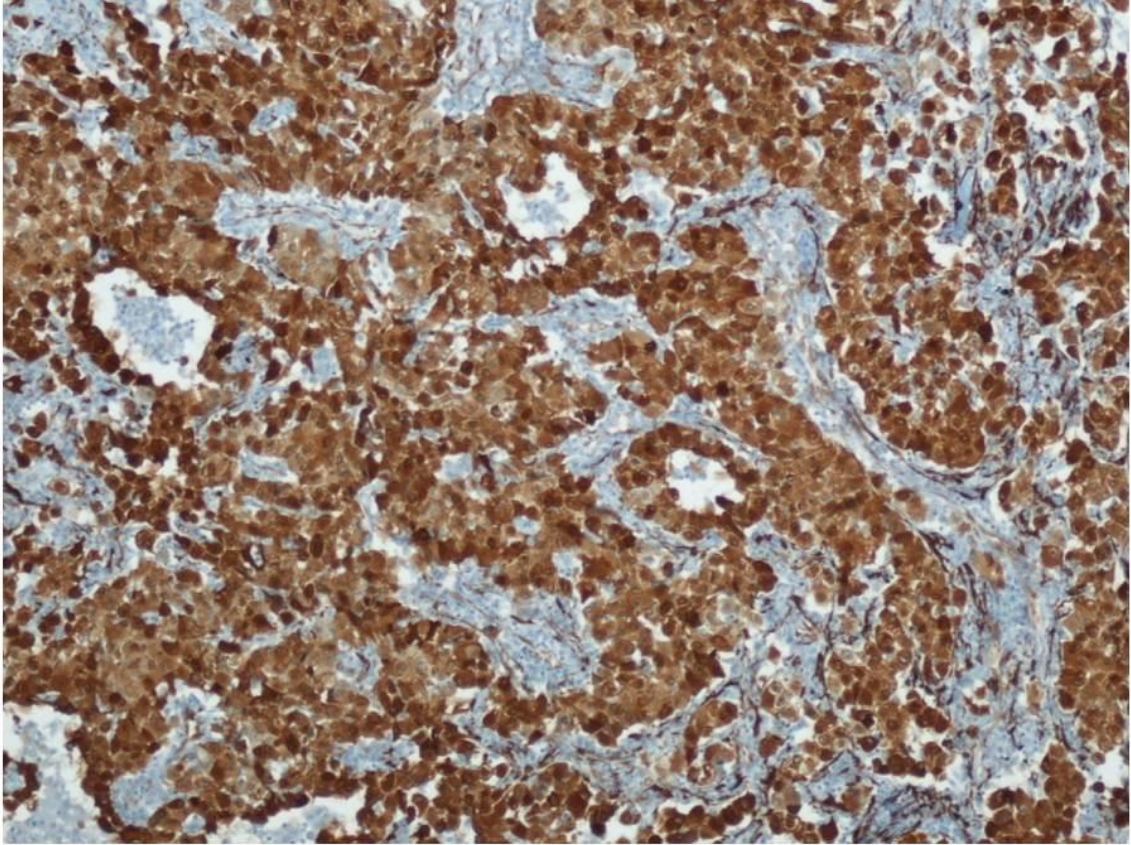
F) Hasta no: 49 Fuhrmann Nükleer Grade 4, pT3a, sarkomatoid varyasyon (+), metastatik olguda primer böbrek tümörü,
Nükleer boyanma özelliği bulunan bir olgu
Yoğunluk: 3 Yaygınlık: 2 Toplam Skor: 5 (1x20)



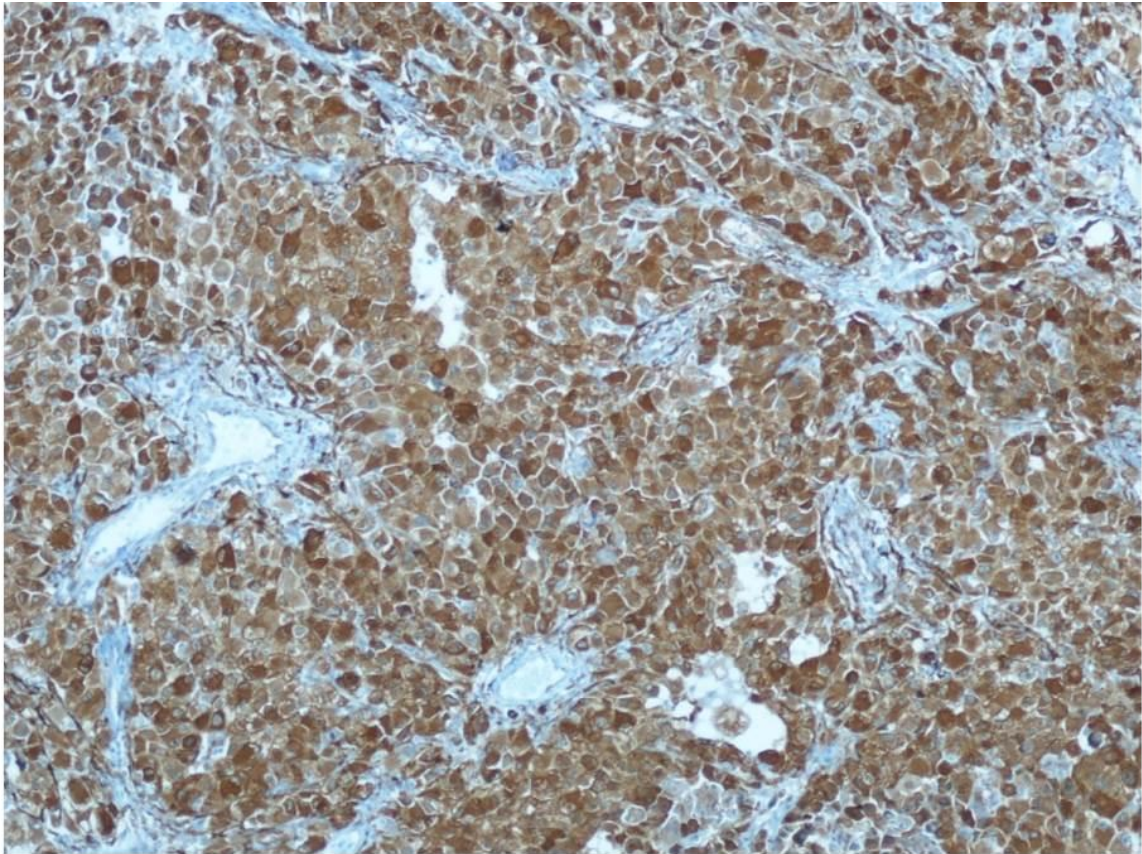
G) Hasta no: 45 Fuhrmann Nükleer Grade 3, pT2a, sarkomatoid varyasyon (-), metastatik olguda primer böbrek tümörü
Yoğunluk: 2 Yaygınlık: 3 Toplam Skor: 6 (1x20)



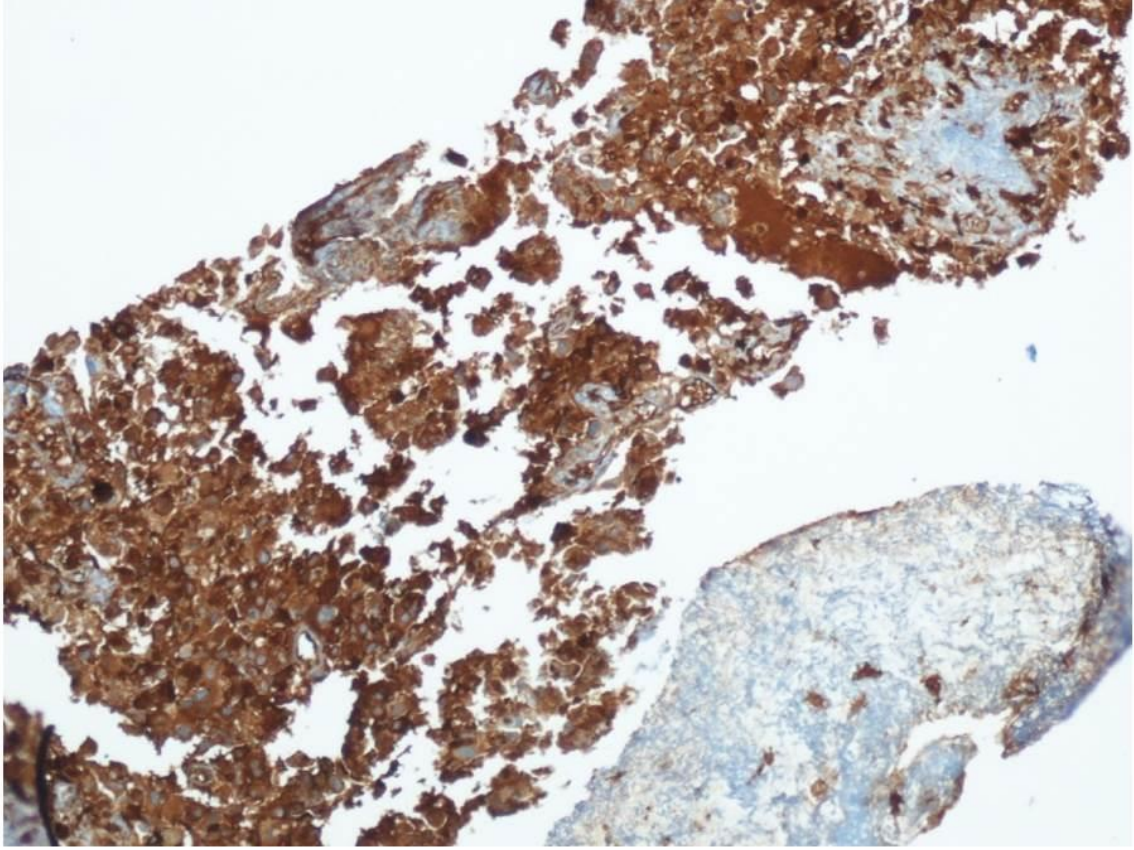
H) Hasta no: 45 Fuhrmann Nükleer Grade 3, pT2a, sarkomatoid varyasyon (-), metastatik olguda metastatik lenf nodu
Yoğunluk: 3 Yaygınlık: 3 Toplam Skor: 6 (1x20)



I) Hasta no: 12 Fuhrmann Nükleer Grade 4, pT3a, sarkomatoid varyasyon (+), metastatik olguda primer böbrek tümörü
Yoğunluk: 3 Yaygınlık: 4 Toplam Skor: 7 (1x10)



J) Hasta no: 12 Fuhrmann Nükleer Grade 4, pT3a, sarkomatoid varyasyon (+), metastatik olguda metastatik akciğer dokusu
Yoğunluk: 3 Yaygınlık: 4 Toplam Skor: 7 (1x10)



K) Hasta no: 16 Fuhrmann Nükleer Grade 3, pT1b, sarkomatoid varyasyon (-), metastatik olguda metastatik akciğer dokusu
Yoğunluk: 3 Yaygınlık: 4 Toplam Skor: 7 (1x10)

5. Tartışma

Böbrek Hücreli Karsinom (BHK), tüm kanserler arasında % 2-3 oranında görülmektedir. Tanı sırasında metastatik BHK prevalansı % 25-30 olarak bildirilmektedir.¹²⁶ Lokalize ya da lokal ileri BHK küratif cerrahi sonrası (radikal veya parsiyel nefrektomi) metastaz oranı ise % 10-30 oranında değişim göstermektedir.¹²⁷ Son olarak Kyoda ve ark.'larının yayınladığı çalışmada 10 yıllık takip sonrasında bu oran % 24 olarak bildirilmiştir.¹²⁸

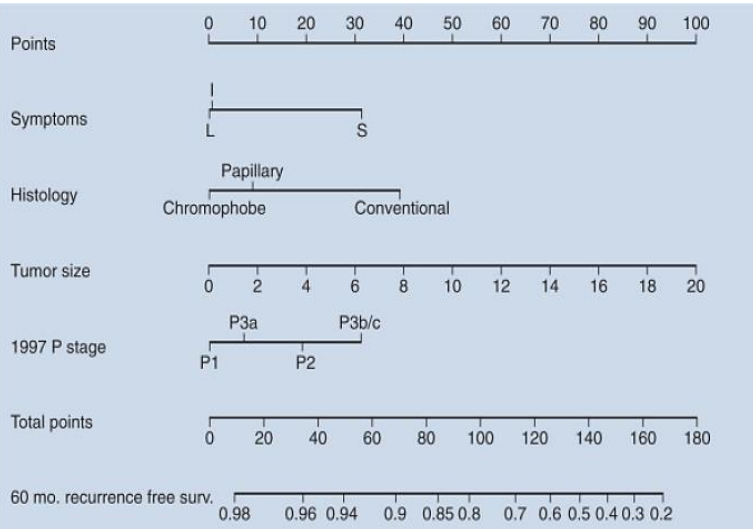
Her tümör tipinde olduğu gibi BHK'da da prognozu öngörmek sağkalım hakkında yorum yapabilmek adına oldukça önemlidir. Günümüzde; 2009 TNM evreleme sistemi, tümörün histopatolojik özelliklerinden Fuhrmann grade, sarkamotöz varyans, mikrovasküler invazyon, tümör nekrozu, toplayıcı sistem invazyonu; hastanın klinik özelliklerinden lokal semptomlar, kaşeksi, anemi ve trombosit sayısı prognoz ve sağkalım için öngörücü bilgiler sunmaktadır.¹²⁶ Öte yandan, BHK prognozunu öngörebilmek için rutin olarak kullanılan bir belirteç (marker) bulunmamakla birlikte, üzerinde araştırmaların yoğunlaştığı bazı belirteçler bulunmaktadır. Bu belirteçler ve BHK'da diğer prognoz öngörücü faktörler Tablo 12'de sınıflandırılarak listelenmiştir.¹²⁹

Öte yandan, bu prognostik faktörlerin beraber kullanılması ile oluşturulan nomogramlar bulunmaktadır. Bu nomogramların Kattan, UISS, Yayıcıoğlu ve Cindolo modellerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği çalışmada en doğru sonucun Kattan nomogramı ile elde edildiği görülmektedir¹³⁰. Şekil 6 ve 7, sırasıyla Kattan ve UCLA nomogramlarını; Şekil 8 ise farklı nomogramlarda kullanılan parametrelere genel bir bakış sergilemektedir.

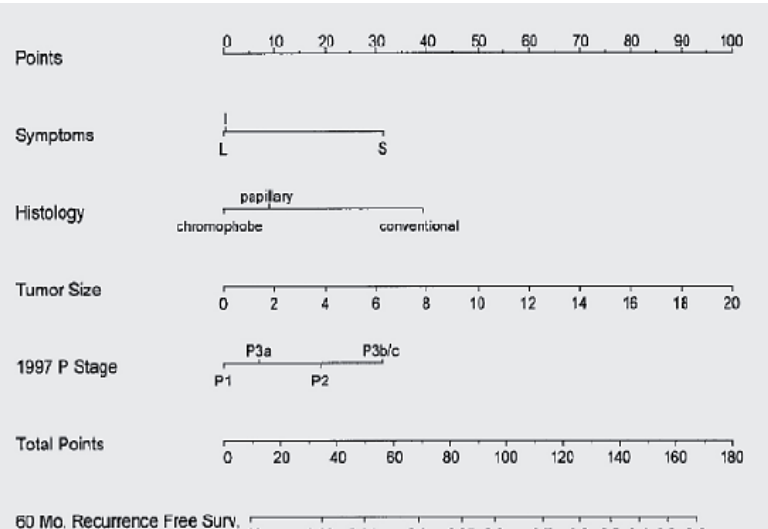
Tablo 12: BHK da prognostik faktörler

Anatomik	Klinik	Histolojik	Moleküler
Tümör boyutu	Performans durumu	Nükleer evre	<u>Hipoksi-indükleyici marker:</u> CA-IX,
Venöz tutulum	(Karnofsky, ECOG)	Histolojik alt tip	IGF-1, VEGF, VEGFRs, CA-
Komşu organ tutulumu	Sistemik semptom	Sarkomatoid	XII, CXCR3, CXCR4, HIF,
Adrenal tutulum	(kaşeksi, >%10 fazla kilo kaybı)	diferansiasyon varlığı	<u>Co-sitümlatör faktörler:</u> B7-H1, B7-
Lenf nodu metastazı	Semptomatik/insidental başvuru	Histolojik nekroz	H3, B7-H4, PD-1,
Uzak metastaz	Anemi	Vasküler invazyon	<u>Hücre döngü düzenleyicileri:</u>
Metastaz fazlalığı	Hiperkalsemi	Renal sinüs veya perirenal	PTEN, TP53, Bcl2, Cyclin- α ,
	LDH yüksekliği	yağ invazyonu	CDKN1B, Skp2
	ESR yüksekliği	Toplayıcı sistem tutulumu	Adezyon moleküller: EpCAM, EMA,
	CRP yüksekliği	Cerrahi sınır	E-Cad, α -catenin, Cad-6
	Alkalen fosfat yüksekliği		<u>Diğer faktörler:</u> Ki-67, XIAP,
			Survivin, EphA2, Smac/DIABLO,
			PCNA, Caveolin-1, AR, CD44,
			Annexin II, Gelsolin, Vimentin,
			CA-125, aberrant DNA
			metilasyon, Na,K-ATPaz α 1
			subunit, VitD reseptör, retinoid X
			reseptör

Kaynak: Brian R. Lane MD, PhD^a, Michael W. Kattan PhD; Prognostic Models and Algorithms in Renal Cell Carcinoma: Urol Clin North Am. 2008 Nov;35(4):613-25



Şekil 6: BHK de Kattan ve ark. geliştirilen MSKCC nomogramı
Kaynak: Kattan MW ve ark. J Urol 2001;166:63-67.)



Şekil 7: UCLA Integrated Staging system
Kaynak: Zisman A ve ark. J Clin Oncol 2001;19:1649-57

Prognostic Models		variables												
		TNM Stage	ECOG PS	Karnofsky PS	RCC related symptoms	Fuhrman grade	Tumor necrosis	Tumor size	Delay between diagnosis and treatment	LDH	Corrected calcium	Hemoglobin	Neutrophil count	Platelet count
Localised RCC	UISS	X	X			X								
	SSIGN	X				X	X	X						
	Post operative Karakiewicz's nomogram	X			X	X		X						
Metastatic RCC	MSKCC prognostic system			X					X	X	X	X		
	Heng's model			X					X		X	X	X	X

Şekil 8: BHK de geliştirilen nomogramlar ve parametreler. **Kaynak: Classification and prognostic faktör, Renal Cell Carcinoma, 2012 EAU Guidelines.**

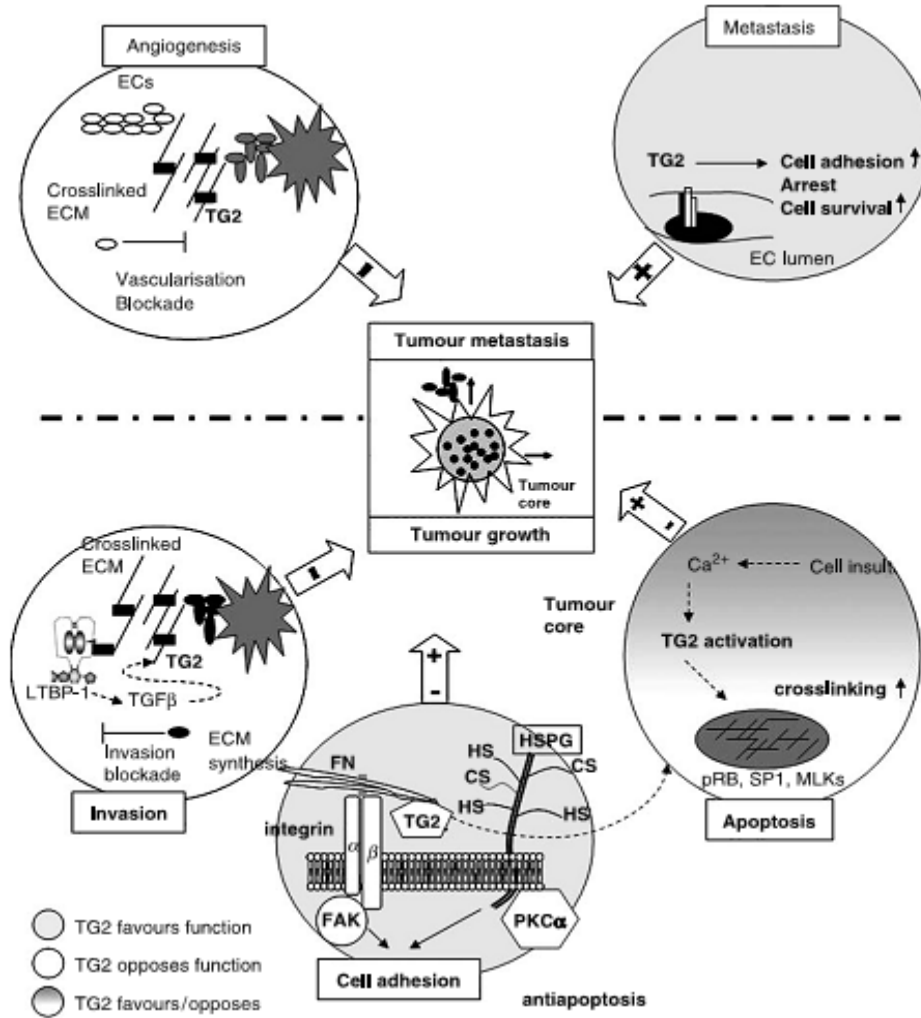
Bir tümörün büyümesi ve metastaz yapması, birbirini takip eden çok basamaklı bir süreçtir. Kısaca özetlenecek olursa; primer organda bulunan tümörojenik potansiyelli değişim göstermiş (metaplazik ya da anaplazik) hücrelerin gen ekspresyonlarındaki değişiklikler ile bu süreç başlamaktadır. Bu ekspresyon değişiklikleri sonunda; primer dokudaki tümör hücreleri birbirinden ayrılarak etrafını çevreleyen stromanın dışına doğru harekete geçerken; stroma hücreleri de tümör hücrelerinin hareket yönünün tersine giderek bu migrasyon işlemini kolaylaştırır. Bu çift yönlü hareket süreci sırasında tümör hücreleri stromal ECM'i bozucu proteazlar salgılar. Tümör 1-2 mm'lik büyüklüğe geldiğinde, başta VEGF olmak üzere çeşitli anjiogenik uyaranlar sayesinde endotelial hücrelerin mobilizasyonu ve kapiller ağ oluşturması sağlanır. Oluşan bu kapiller ağ içerisine giren tümör hücreleri vasküler sisteme ait bazal membranı degrade ederek sistemik dolaşıma transfer olurlar. Vasküler sistemde yuvarlanma (rolling) tarzında hareket eden tümör hücreleri hedef metastatik organa geldiklerinde yine bazal membran degradasyonu yaparak sekonder tümör odağını oluşturmuş olur.¹¹⁴

Tümörögenез sırasında hem tümör hem de stroma hücrelerindeki apoptoz, adezyon, migrasyon, ECM stabilizasyonu/destabilizasyonu ve anjiogenez gibi temel biyolojik

basamaklar anti-karsinojen ajan araştırmaları için önemli hedeflerdir. Farklı hücresel kompartmanlarda bulunabilen TG2'nin bu özelliği ile tümörogenezin yukarıda bahsedilen herbir basamağında rolü olabileceği tezin genel bilgiler bölümünde 'Transglutaminaz-2 ve karsinogenez' başlığı altında moleküler düzeyde irdelenmiştir. Kısaca, maddeler halinde özetlenirse;

- *Tümöral hücre proliferasyonu ve apoptoz*; TG2 hücreiçinde lokalize iken sinyal moleküllerin transamidasyonu ile *pro-apoptotik* rol oynayabileceği gibi, *hücre membranında* ve *ekstrasellüler matrikste* iken sırasıyla integrin bağımlı anti-apoptotik Bcl-2 aktivasyonu ve FN'e bağlanma sonucu SDC4 ile aktive olan sinyal yolu üzerinden *anti-apoptotik* davranabilmektedir.
- *Tümöral hücre adezyonu*:TG2, *hücre membranında* bulunduğunda integrin-bağımlı adezyonda FN için ko-reseptör olarak; ve ayrıca bu yoldan bağımsız SDC4'e bağlanarak bir adezyon molekülü olarak davranmaktadır.
- *Ekstrasellüler matriks homeostazı*: Normal koşullarda hücreiçi sitozol ve hücre membranında bulunan TG2 patolojik koşullarda, Ca^{+2} / GDP konsantrasyonunun artmış olduğu ECM'e geçerek, kollajen çapraz bağlarını oluşturur ve ECM stabilizasyonunu güçlendirir. Bu durum primer tümörün stroma invazyonu ve büyümesi üzerine negatif etkiye sahiptir.
- *Anjiogenez*: TG2, endotel bazal membranındaki proteinleri çapraz bağlayarak neovaskülarizasyon sırasında endotel mobilizasyonuna engel olarak anti-anjiogenik rol oynamaktadır.
- *Metastaz*: Vasküler ya da lenfatik lümende dolaşan tümör hücrelerinin metastatik odağına yerleştiği sırada, endotel ve stromaya adezyonunda TG2 önemli rol oynamaktadır.

Anlaşılağı üzere, TG2'nin çok yönlü fonksiyonu olan ve farklı hücresel kompartmanlarda bulunan bir protein olması tümör biyolojisinin farklı basamaklarında aktivatör ya da inhibitör olarak dinamik bir rol aldığı görülmektedir. Bu durumu, Kotsakis ve Griffin 'Tümör progresyonunda doku transglutaminazı: Dost mu düşman mı?' başlığı ile kaleme aldıkları derleme makalelerinde ayrıntılı bir şekilde özetlemiştir. Şekil 9, bu derlemeden alınan ve TG2'nin farklı evrelerdeki rolünü betimler niteliktedir.



Şekil 9. TG2, hücre adezyonu ve metastazta aktivatör; invazyon ve anjiogenezde inhibitör rol oynamaktadır. Apoptoz sürecinde hem aktivatör hem de inhibitör davranabilmektedir.
Kaynak: Kotsakis, P. and M. Griffin Amino Acids, Vol. 33, No. 2, pp. 373-384, 2007

Karsinogenezdeki bu dinamik yapısı, araştırıcıları TG2'nin farklı tümörlerdeki rolünü daha iyi anlayabilmek için -daha çok deneysel olmak üzere- farklı çalışmalara yönlendirmiştir.

Mangala ve ark.'ları TG2 ekspresyonu yüksek ve düşük olan iki farklı metastatik meme kanseri hücre kültüründe yaptıkları deneysel çalışmalarında; yüksek TG2 eksprese eden tümör hücrelerinin FN-kaplı ortamda daha fazla adezyon ve migrasyon yaptığını göstermiştir. Araştırıcılar, bu durumu hücre membranında TG2'nin yaklaşık 4 kat arttığını ve ITGβ1 ve ITGβ5 ile olan işbirliği ile açıklamıştır. Ayrıca bu çalışmada, yüksek TG2 eksprese eden kültürün paklitaksel ile indüklenen hücre ölümüne daha dirençli olduğunu da gösteren yazarlar, bu durumu ECM'teki FN ile kurulan ilişki sonrası TG2'nin oynadığı anti-apoptotik rol ile açıklamıştır. Bu bulgular ile TG2'nin meme kanserinde tümör hücrelerinin sağkalımını ve dolayısıyla metastaz potansiyelini artırdığı ifade edilmiştir.¹¹⁸ Aynı araştırma grubu, bir başka çalışmalarında TG2 ekspresyonu yüksek metastatik meme kanseri kültürünün doksorubisin ile indüklenen hücre ölümüne daha dirençli olduğu ve FN ile kaplı ortamda daha invaziv olduğunu bildirmişlerdir.¹¹⁶ Ayrıca araştırıcılar bu çalışmada, lenf nodu metastazı olan 30 hastanın primer meme ve metastatik lenf nodlarını TG2 ile immunhistokimyasal boyamış; ve metastatik lenf nodlarında anlamlı derecede artmış TG2 boyandığını göstermişlerdir. (sırasıyla % 32 ve % 75, $p < 0.001$)

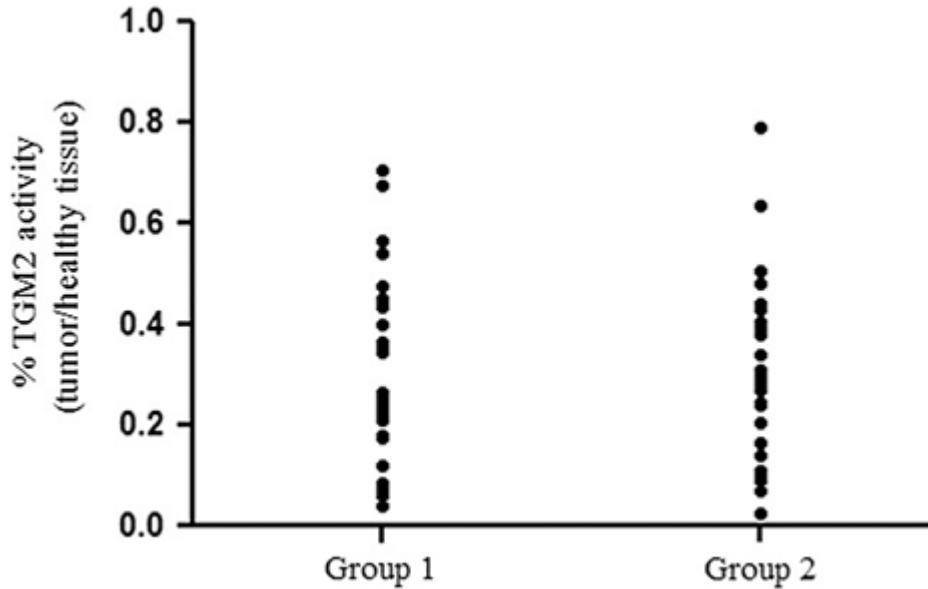
Pankreas kanseri, TG2'nin tümörögenezdeki rolünün araştırıldığı bir diğer onkoloji konusu olarak literatürde yer almaktadır. Verma ve ark.'ları 75 pankreas adenokarsinomlu tümör dokusunda yaptıkları çalışmada 42 (%56) tümörün TG2 ekspresyonunun arttığını ve bu artışın normal pankreas dokusundan anlamlı derecede fazla olduğunu göstermişlerdir. ($p=0.012$) Bununla birlikte, TG2'deki bu artışın sırasıyla 3.4, 3.0 ve 3.2 kat lenf nodu metastazı ($p=0.017$), lenfovasküler invazyon ($p=0.045$) ve klinik evre artış riski ($p=0.027$) ile birlikte olduğunu bildirmişlerdir.¹²⁰ Aynı çalışmada, 12 ayrı invaziv pankreas kanseri hücre

kültüründe, TG2 ekspresyonunun yine arttığını ve bu artışın gemsitabin direnci ve invazyon ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Akar ve ark.'larının ksenograft farelerde yaptığı bir başka çalışmada TG2'nin siRNA transferi ile oluşturulan down-regülasyonu sonucu farelere inoküle edilen invaziv duktal pankreas kanser hücrelerinin tip 2 programlı hücre ölümüne gittiği gösterilmiştir. Bu durum, TG2'nin pankreas kanserinde kemo-rezistans ve anti-apoptotik rolü olabileceği yönünde yorumlanmıştır.¹³¹ Bir başka çalışmada, squamöz hücreli özefagus karsinom dokularında immunhistokimyasal olarak TG2 araştırılmış; 50 tümör dokusunda stoplazmik (n=35) ve stromal (n=15) boyanmanın, 10 normal özefagus dokusundan anlamlı düzeyde (p=0.02) daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca stromal TG2 kaybının artmış lenf nodu metastazı (p<0.001) ve ileri tümör evresi (p=0.004) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.¹³² Malign melanom ile TG2 arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir başka çalışmada Fok ve ark.'ları, metastatik melanom hücre kültürünün primer melanom kültüründen 24 kat daha fazla TG2 eksprese ettiğini göstermişlerdir.¹¹⁹ Bu çalışmada, Ca⁺² kanallarının açılarak endojen TG2'nin aktivasyonu sonucu metastatik hücre kültürünün hızla apoptozise gittiği bildirilmiştir. Ayrıca, primer ve metastatik tümör dokularının normal deri hücrelerine göre daha fazla TG2 ile immunhistokimyasal olarak boyandığı rapor edilmiştir.

Literatüre bakıldığında, TG2'nin BHK ile ilişkisini araştıran ilk çalışmanın kliniğimizde de araştırma grubu olarak katıldığı Erdem ve ark.'ları tarafından yapılan çalışma olduğu görülmektedir.¹²⁴ Bu çalışmada, 95 hastanın nefrektomi piyesinden elde edilen taze BHK ve aynı böbreğe ait kansersiz normal dokularda TG2 ve onunla ilişkili moleküllerinin (ITG-β1, SDC4) ekspresyonu ve fonksiyonel rolü araştırılmıştır.

Sırasıyla; 46 (%48.4), 71 (%74.7) ve 64 (%67.4) hastada TG2, ITG-β1 ve SDC-4'ün tümör dokusunda –normal böbrek dokusuna kıyasla- daha fazla eksprese olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte; TG2 ekspresyon artışının, sırasıyla 6.1 (p=0.003) ve 5.4 (p<0.001) kat artmış ITG-β1 ve SDC-4 ekspresyonu ile korelasyon içinde olduğu bulunmuştur. Yine bu

artış ile ITG- β 1 ve SDC-4 ekspresyonunun eş zamanlı artışı arasında 5.8 kat ($p < 0.001$) korelasyon saptanmıştır. Bunun üzerine araştırmacılar, TG2-ITG β 1-SDC4 ($n=38$), TG2-ITG β 1 ($n=42$), TG2-SDC4 ($n=39$) ve ITG β 1-SDC4 ($n=60$) eş zamanlı artışlarının klinik ve histopatolojik parametreler ile ilişkisini lojistik regresyon analizi ile değerlendirmiştir. Bu analiz sonunda, TG2-ITG β 1-SDC4 moleküllerinin eş zamanlı artışı 3.03 kat (95%CI: 1.02-9.76, $p=0.049$) metastaz riski ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, TG2-SDC4 birlikte artışının istatistiksel anlamlılığa yakın ölçüde ($p=0.063$) 2.87 kat metastaz riskini öngördüğü ifade edilmiştir. Çalışmada, bir enzim olan TG2'nin BHK'da artmış ekspresyonu ile katalitik aktivitesi arasındaki ilişki de değerlendirilmiştir. Bu amaçla, tümör dokusunda artmış ($n=30$) ve azalmış ($n=30$) ekspresyon gözlenen rastgele seçilmiş 60 BHK/nomral doku çiftinde TG2 enzim aktivitesine bakılmış; ekspresyon düzeyi ile ilişkili olmaksızın tüm tümör dokusunda normal dokuya kıyasla ileri derecede daha az katalitik aktivite saptanmıştır. ($p < 0.0001$, Şekil 10) Bu aktivite, artmış ekspresyon grubunda ortalama %28.8 iken azalmış grupta %27.5 olarak bulunmuştur.



Şekil 10. TG2 ekspresyonunun arttığı (Grup 1) ve azaldığı (Grup 2) gruplarda; katalitik aktivitenin tümör dokusunda normal dokudan daha az olduğunu gösteren analiz grafiği **Kaynak:** Erdem ve ark. Urol Oncol.2013 Mar 14. pii: S1078-1439(12)00322-5. doi:

Araştırmacılar, klinik taze dokularda elde ettikleri bu bulguları normal böbrek hücre kültürü (RPTEC) ile primer (iki farklı; A-498, CaKi-2) ve metastatik BHK (iki farklı; CaKi-1, ACHN) hücre kültüründe *in vitro* sorgulamıştır. Bu analiz sonucuna göre, TG2; iki farklı primer tümör kültüründe -normal böbrek kültüründen- sırasıyla 3.1 (p=0.024) ve 2.4 (p=0.007) kat daha fazla eksprese edilirken; metastatik tümör kültürleri için sırasıyla 2.9 (p=0.024) ve 6.9 (p=0.003) katlık artışla benzer durum gözlenmiştir. Bununla birlikte, her iki primer ve metastatik hücre kültürlerindeki artmış ekspresyonun istatistiksel olarak birbirlerinden farklı olmadığı gösterilmiştir.

Özet olarak, Erdem ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, BHK'da TG2 ekspresyonunun arttığını gösterirken; artan bu TG2'nin enzimatik aktivitesinin inhibe olduğunu ve ITG-β1 ve SDC-4 ile etkileşimde bulunarak tümör hücrelerinin ECM'e stabilizasyonundan sorumlu bir adezyon molekülü olarak rol oynadığını belirtmişlerdir.

Son yıllarda, karsinogenezde mikroRNA (miRNA) ların rolü üzerinde yoğunlaşan araştırmalar literatürde yer almaktadır. Temel olarak hücrede iki tip RNA molekülü bulunmaktadır; protein kodlayan mesajcı RNA (mRNA) ve nükleusta yer alan nükleer RNA. Karsinogenezde araştırılan miRNA'lar yaklaşık 19-22 baz dizisinden oluşan küçük nükleerRNA'lardır. Bu mikroRNA'ların protein kodlayan gen ekspresyonunu regüle ettiği; böylece ya tümör süpresör genleri inhibe ederek onkogen şeklinde ya da onkogenleri inhibe ederek tümör süpresör geni şeklinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bağlamda, Hidaka ve ark.ları, BHK'da down-regüle olan (taze tümör dokusunda normal böbrek dokusunun 0.5 katından daha az ekspresyon gösteren) 103 miRNA tanımlamış; bunlar arasında en fazla down-regüle olan 20 tanesini tümör süpresör gen adayları olmak üzere BHK hücre kültüründe daha ileri incelemişlerdir.¹²⁵ (Şekil 11) Bu ileri incelemede hücre kültürüne tümör süpresör adayları olan bu 20 miRNA transfer edilerek fonksiyonel rolleri araştırılmıştır. Bunlar arasında miRNA-1285'in kullanılan dört ayrı hücre kültüründe de (A498, 786-O, ACHN and caki2)

hücre proliferasyonunu en fazla inhibe eden miRNA olduğu gösterilmiştir. Bunun üzerine araştırmacılar daha fazla odaklandıkları miRNA-1285'in hem BHK hücre kültürlerinde hem de taze BHK tümör dokularında normal böbrek dokusundan anlamlı derecede daha az eksprese olduğunu bildirmişlerdir. Ardından miRNA-1285 transferinin etkilediği hedef genleri incelemek amacıyla yapılan genome-wide ekspresyon analizinde, araştırmacılar, 17 genin miRNA-1285 transferi sonrası down-regüle olduğunu (normal dokudan 2 kat daha az ekspresyon); bunlar arasından da 7 tanesinin 3'UTR dizisine miRNA-1285'in bağlandığını ifade etmişlerdir. (Şekil 12)

Hidaka ve ark.'larının yaptığı çalışmanın, bu tez ile ilgisi miRNA-1285'in 7 hedef geninden birinin ve en güçlü onkogen adayının TG2 olmasıdır. Araştırmacılar, taze dokularda yaptığı gerçek zamanlı PCR analizinde TG2'nin bu 7 hedef gen arasından BHK dokularında normal böbrek dokularından anlamlı ($p < 0.0037$) olarak daha fazla eksprese olan tek gen olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular, miRNA-1285 transfer edilen BHK hücre kültüründe TG2'ye ait mRNA ve protein ekspresyonunun azalması ile doğrulanmıştır. (Şekil 13) Araştırmacılar, miRNA-1285'in bu etkiyi TG2 mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanıp transfekte si-TG2 oluşturarak direkt olarak gösterdiğini ve böylece TG2 mRNA'yı etkisiz hale getirdiğini belirtmişlerdir. (Şekil 14) Bununla birlikte, yeni oluşan transfekte si-TG2'nin hücre proliferasyonunun, migrasyonun ve invazyonun azalmasına yol açtığını kanıtlamışlardır. Son olarak, araştırmacılar bir onkogen adayı olarak tayin ettikleri TG2'nin BHK tümör dokularında normal böbrek dokusundan immunhistokimyasal yöntemle daha fazla boyandığını ve bu boyamanın tümörün patolojik evresi ile paralel bir artış içinde olduğunu göstermişlerdir. (Şekil 15)

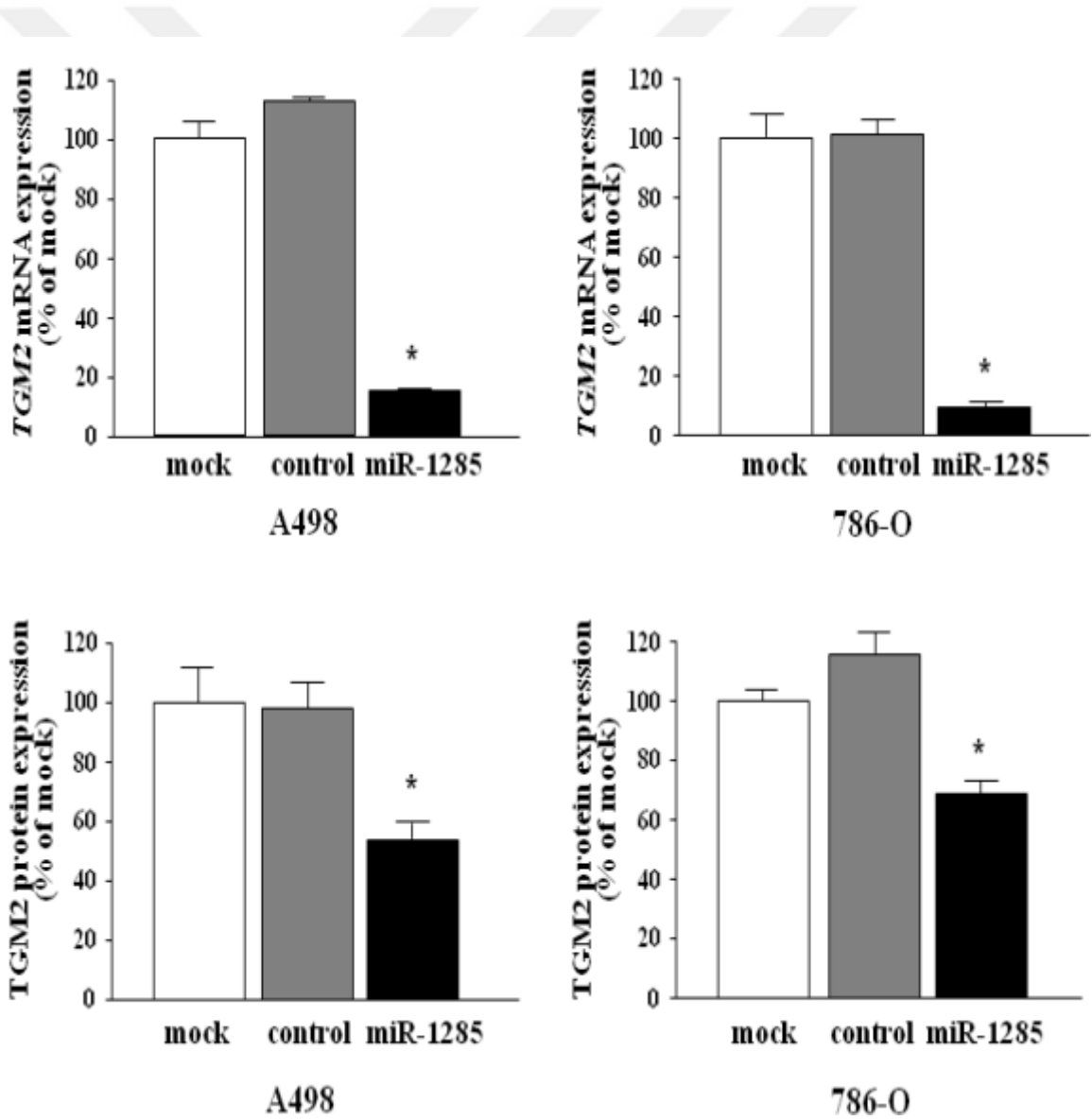
microRNA	P-value	Normal	Cancer	Fold Change (Cancer/Normal)
hsa-miR-141	0.022	1.237	0.026	0.021
hsa-miR-200c	0.022	1.104	0.024	0.021
hsa-miR-187	0.007	1.526	0.043	0.028
hsa-miR-509-5p	0.003	1.196	0.050	0.042
hsa-miR-135a	0.003	1.525	0.099	0.065
hsa-miR-508-3p	0.007	1.321	0.096	0.072
hsa-miR-1285	0.020	1.777	0.171	0.096
hsa-miR-206	0.013	1.580	0.192	0.121
hsa-miR-218	0.005	1.506	0.197	0.130
hsa-miR-133b	0.006	1.173	0.173	0.147
hsa-miR-1291	0.019	1.978	0.310	0.157
hsa-let-7g*	0.031	1.508	0.247	0.164
hsa-miR-204	0.014	1.468	0.254	0.173
hsa-miR-429	0.003	1.267	0.222	0.175
hsa-miR-370	0.042	1.525	0.268	0.176
hsa-miR-363	0.010	1.377	0.244	0.177
hsa-miR-335	0.005	1.226	0.224	0.182
hsa-miR-1	0.005	1.017	0.189	0.186
hsa-miR-1255B	0.020	1.306	0.248	0.190
hsa-miR-362-3p	0.010	1.501	0.312	0.208

Şekil 11. BHK'da en fazla down-regüle olduğu gösterilen miRNA'lar. **Kaynak: Hidaka ve ark. Oncotarget.2012 Jan;3(1):44-57.**

Symbol	A498	786-O	Average	Gene name	Target site
LHPP	-2.98	-3.92	-3.45	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	+
NF2	-2.99	-3.02	-3.01	Neurofibromin 2	+
EIF4EBP2	-2.79	-3.11	-2.95	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	-
TGM2	-2.44	-3.12	-2.78	Transglutaminase 2	+
C1QTNF5	-2.64	-2.83	-2.74	C1q and tumor necrosis factor related protein 5	-
KCNJ16	-2.45	-3.00	-2.72	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16	+
CDKAL1	-2.96	-2.31	-2.64	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1	-
CERCAM	-2.52	-2.61	-2.56	Cerebral endothelial cell adhesion molecule	+
SYNPO	-2.41	-2.58	-2.49	Synaptopodin	+
FAM127C	-2.09	-2.67	-2.38	Family with sequence similarity 127, member C	+
C11orf86	-2.41	-2.29	-2.35	Chromosome 11 open reading frame 86	-
MARVELD1	-2.26	-2.41	-2.34	MARVEL domain containing 1	-
ECE2	-2.14	-2.50	-2.32	Endothelin converting enzyme 2	-
NT5E	-2.27	-2.31	-2.29	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	+
LYPLA2	-2.09	-2.31	-2.19	Lysophospholipase II	+
AHNAK	-2.07	-2.26	-2.16	AHNAK nucleoprotein	+
FAM198B	-2.03	-2.11	-2.07	Family with sequence similarity 198, member B	+

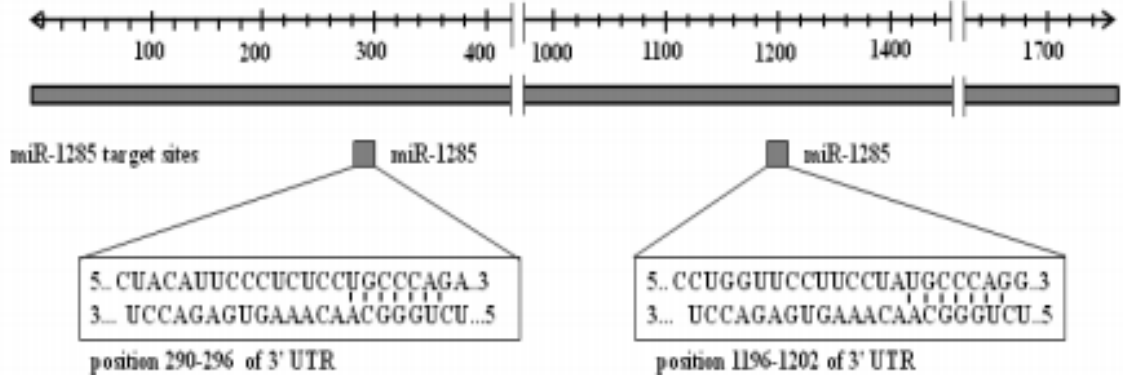
Şekil 12. BHK hücre kültürüne miRNA-1285 transfer edildiğinde down-regüle olan genler **Kaynak: Hidaka ve ark. Oncotarget.2012 Jan;3(1):44-57.**

Yukarıdaki iki paragrafta özetlenen çalışma, bizim de araştırma grubu olarak katıldığımız daha önceki yayın ile beraber literatürde BHK ve TG2 arasındaki ilişkiyi kanıtlayan iki çalışmadan biridir. Bu araştırma tezinde ulaşılan bulgular ile Erdem ve ark.'larının daha önceki bulgularını ortak olarak barındırması bakımından da ayrı bir öneme haizdir. Çünkü, daha önceki çalışmada ve bu tez çalışmasında TG2'nin BHK'de onkogen adayı olarak sunulmasını desteklerken; bir üst genetik mekanizmayla TG2'yi inaktive eden tümör süpresör geni de tanımlamaktadır.

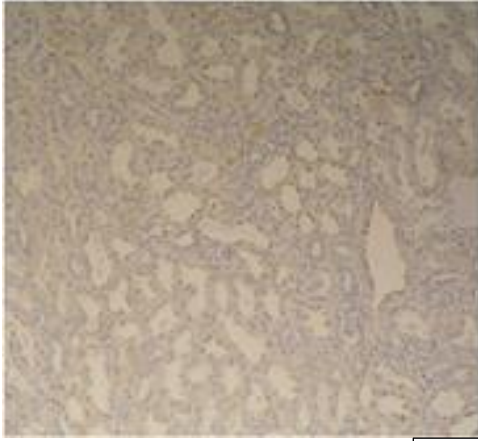


Şekil 13. miRNA-1285 transfekte edilen iki farklı hücre kültüründe, TG2 mRNA'sının ve proteinin daha az eksprese edildiğini gösteren gerçek zamanlı PCR sonuçları **Kaynak:** Hidaka ve ark. *Oncotarget*.2012 Jan;3(1):44-57.

Human TGM2 (NM_004613) 3'UTR length: 1755



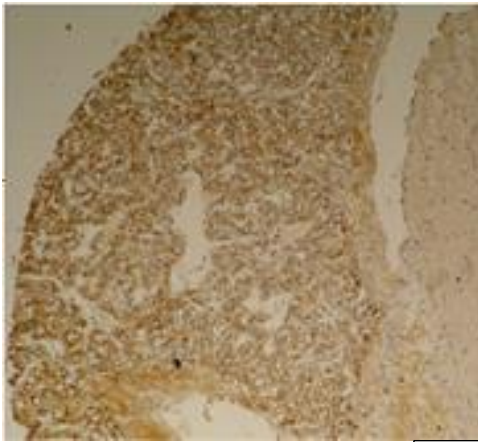
Şekil 14. miRNA-1285'in TG2 mRNA üzerindeki bağlanma bölgeleri. Bu bağlanma sonucu si-TG2 oluşarak; TG2 mRNA'sı inaktifte olmaktadır. Böylece miRNA-1285 tümör süpresör olarak rol almaktadır. **Kaynak:** Hidaka ve ark. *Oncotarget*.2012 Jan;3(1):44-57.



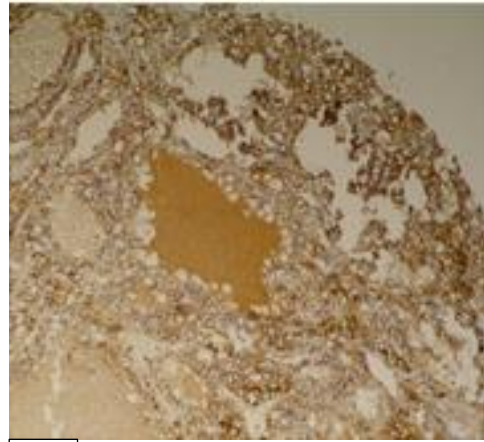
A)



B)



C)



D)

Şekil 15. Normal böbrek ve BHK tümörlü dokularda TG2 immunhistokimya boyanması ve artan evre ile yoğun boyanma ilişkisi (1x200) A) Normal böbrek dokusu B) pT1N0M0 tümör C) pT2N0M0 tümör D) pT3N0M0 tümör **Kaynak:** Hidaka ve ark. *Oncotarget*.2012 Jan;3(1):44-57.

Böbrek hücreli karsinom'da TG2'nin rolünü immunhistokimya yöntemiyle araştıran bu tez çalışmasında da önceki verilerle uyumlu şekilde TG2'nin metastaz ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu bulgulara göre henüz primer tümör evresinde iken eksprese olan TG2 düzeyinin metastatik potansiyeli belirleyici olduğu söylenebilir. Öyle ki, primer böbrek TG2 boyanma skoru metastatik hastalarda non-metastatik hastalardan belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. (ortanca 6'ya karşı 4, $p<0.001$) Bununla birlikte, metastatik dokuların TG2 ile boyanma ilişkisinin aynı tümörlerin primer dokularından daha fazla olduğu ancak bu durumun istatistiksel anlamlılığa ulaşacak düzeyde belirgin olmadığı görülmüştür. (ortanca 7'ye karşı 6, $p=0.086$)

Öte yandan, primer tümör çapının TG2 skoru düşük hastalarda anlamlı artmış olması çalışmanın dikkate değer bulgularından biri olarak göze çarpmaktadır. (ortanca 9.75'e karşı 7.2 cm, $p=0.023$) Bu bulgu, -moleküler düzeyde- TG2'nin primer tümörde ekspresyon artışının ECM'i stabilize ederek tümör hücrelerinin etrafını çeviren stromal dokuyu artırması ile invazyonu negatif yönde etkilemesi ile açıklanabilir.

İmmunhistokimyasal yöntemle metastatik hastaların primer tümöründe daha fazla eksprese olduğu gösterilen TG2 skoruna göre iki farklı risk grubu oluşturularak yapılan sağkalım analizleri sonucunda; yüksek riskli grupta 5 yıllık hastaliksız (% 34.9 ve % 92.9, $p=0.001$) ve kansere özgü (% 47.4 ve % 86.5, $p=0.04$) sağkalım beklentisi anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bununla birlikte genel sağkalım sonuçlarında fark olmadığı görülmüştür. Öte yandan aynı gruplamanın metastatik TG2 boyanma skoruna göre yapıldığı ve sadece metastatik hastaları kapsayan sağkalım analizlerinde; hastaliksız, kansere özgü ya da genel sağkalım sonuçları yüksek ve düşük riskli gruplarda farklı bulunmamıştır. Bu bulgulardan, primer böbrekteki TG2 ekspresyonunun metastatik tümörleri tayin edebildiği gibi sağkalım üzerinde de öngörücü değere sahip olduğu söylenebilmektedir.

Çalışmada elde edilen bulgulardan yola çıkıldığında, BHK'da immunhistokimyasal TG2 boyanma skoru yine ürolojik malignitelerden prostat kanserinde kullanılan Gleason skoruna benzetilebilir. Gleason skoru, histopatolojik parametreler ile uyumluluğu ve sağkalım üzerine öngörücü özelliği nedeniyle prostat biyopsi ya da radikal prostatektomi sonunda merakla beklenen en önemli patolojik bulgudur. Benzer şekilde, TG2 immunhistokimyanın BHK'da Gleason skoruna eşdeğer kullanımı klinik pratiğe katkı sağlayabilir. Bu nedenle, TG2 immunhistokimya analizinin artmış olgu sayılarında ve farklı merkezlerce çalışılması, ulaşılabilecek benzer bulgular sonunda, daha önce belirtilen BHK prognoz öngörücü nomogramlarına eklenmesi tartışılabilir.

Her çalışmada olduğu gibi, bu tez çalışmasının da kendi içinde sınırlamaları bulunmaktadır. Çalışmanın retrospektif yapıda olması ve görece düşük hasta sayısı tez çalışmasının sınırlayıcı olarak görüldüğü iki önemli faktördür. Bununla birlikte, metastatik ve non-metastatik hastaların seçiminde benzer demografik ve histopatolojik verilerin mümkün olan birebir düzeyde seçilerek bu faktörlerin safdışı bırakılması gereç ve yöntemde çalışmanın güçlü yönü olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca, moleküler bir çalışmada aynı anda sağkalım analizi yapılması; moleküler düzeyden histopatolojiye ve ardından kliniğe yansımaya değerlendirmesi bakımından tezin bütüncül bir yapıda olduğunu göstermektedir.

Sonuç

Transglutatminaz-2, böbrek hücreli karsinom patofizyolojisinde rol alan bir moleküldür. Bu tez çalışmasında, karsinogeneizde farklı lokalizasyonda ve rollerde olduğu düşünülen bu proteinin BHK'da hücre membranında bulunduğu ve daha çok hücre adezyon proteini olarak rol oynadığı ve metastatik potansiyeli olan tümörlerde daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, TG2'nin, progresyonsuz ve kansere özgeü sağkalımda da öngörücü olduğu belirtilmiştir. Bu özellikleriyle TG2, BHK'da prognozu öngörmede kullanılabileceği gibi; anti-karsinojen ajan olarak da üzerinde çalışılabilecek bir protein olarak değerlendirilebilir.

Kaynaklar

- ¹ Landis SH, Murray T, Bolden S et al: Cancer statistics. CA Cancer J.Clin., 49:8, 1999
- ² Lam JS, Svarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS 2005. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. J.Urol 2005;173:1853-1862.
- ³ Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, et al. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. Int J Cancer. 2005;114:101-108
- ⁴ Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, et al. Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). Int J Cancer 2006;118:728-38.
- ⁵ Yu et al., 1986. Yu MC, Mack TM, Hanisch R, et al: Cigarette smoking, obesity, diuretic use, and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma. J Natl cancer Inst 1986; 77:351-356
- ⁶ Linehan WM, Lerman MI, Zbar B: Identification of the Von Hippel Lindau (VHL) gene: Its role in renal cancer. JAMA 1995; 273:564-570.
- ⁷ Weirich G, Glenn G, Junker K, et al: Familial renal oncocyoma: Clinico-pathological study of families. J. Urol. 1998; 160:335-340.
- ⁸ Zbar B: Von Hippel Lindau disease and sporadic renal cell carcinoma. Cancer Surv. 1995; 25:219-232.
- ⁹ Störkel, 1996. Störkel S: Classification of renal cancer: Correlation of morphology and cytogenetics. In: Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, Coffey DS, ed. Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology, 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996:179-186.
- ¹⁰ Storkel S, Ebie JN, Adlakha K, et al: Classification of renal cell carcinoma: Workgroup no.1 Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer 1997;80:987-989.
- ¹¹ Farrow, 1997. Farrow GM: Diseases of the kidney. In: Murphy WM, ed. Urological Pathology, 2nd ed.. Philadelphia: WB Saunders; 1997:464-470.
- ¹² Skinner DG, Pfister RF, Colvin R: Extension of renal cell carcinoma into the vena cava: The rationale for aggressive surgical management. J Urol 1972;107:711-716.
- ¹³ Schefft P, Novick AC, Straffon RA, Stewart BH: Surgery for renal cell carcinoma extending into the inferior vena cava. J Urol 1978;120:28-31.
- ¹⁴ Gelister JSK, Falzon M, Crawford R, Chapple CR, et al: Urinary tract metastasis from renal carcinoma. Br J Urol 69: 250, 1992.
- ¹⁵ Williams R.D: Renal, perirenal and ureteral neoplasms. In Adult and Pediatric J. Urology. Edited by J. Y. Gillenwater, J. T. Grayhack, S. S. Howards, J. W. Ducked. Chicago-London-Boca Raton. Yearbook Medical Publishers inc: Vol. 1, chapt 16, pp: 513-554, 1988.
- ¹⁶ Horton WA, Wong V, Eldridge R: Von-Hippel-Lindau disease: Clinical and pathological manifestations in nine families with 50 affected members. Arch Intern Med 1976; 136:769-777
- ¹⁷ Go RC, Lamiell JM, Hsia YE, et al: Segregation and linkage analysis of von Hippel-Lindau disease among 220 descendants from one kindred. Hum Genet 1984; 36: 131-142.
- ¹⁸ Green JS: von Hippel-Lindau disease in a Newfoundland kindred. Can Med Assoc J 1986; 134:133-138.
- ¹⁹ Lamiell JM, Salazar FG, Hsia E: von Hippel-Lindau disease affecting 43 members of a

single kindred. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68: 1-29.

²⁰ Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, et al: Hereditary renal cancers. *Radiology*, 226:33-46, 2003

²¹ Mather ER, Yates JRW, et al: Familial renal cell carcinoma: clinical and molecular genetic aspect. *Br J Cancer*, 63:176-179, 1991.

²² Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Myers MH: American Joint Committee on Cancer Manual for Staging of Cancer, 3rd ed., Philadelphia, JB Lippincott, 1988.

²³ Campbell MF, Wein AJ, Kavoussi LR. *Campbell-Walsh urology*. 9th / ed. Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier; 2007.

²⁴ Konnak JW, Grossman HB: Renal cell carcinoma as an incidental finding. *J Urol* 1985;134:1094-1096.

²⁵ Thompson IM, Peek M: Improvement in survival of patients with renal cell carcinoma: The role of the serendipitously detected tumor. *J Urol* 1988; 140 :487-490.

²⁶ Kessler O, Mukamel E, Hadar H, et al: Effect of improved diagnosis of renal cell carcinoma on the course of the disease. *J Surg Oncol* 1994;57:210.

²⁷ Jayson M, Sanders H: Increased of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology* 1994;51:203-205.

²⁸ Bechtold RE, Zagoria RI: Imaging approach to staging of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 1997;24:507-522.

²⁹ Sheth S, Scatarige JC, Horton KM, Corl FM, Fishman EK: Current concepts in the diagnosis and management of renal cell carcinoma: role of multidetector CT and three-dimensional CT. *Radiographics* 2001 ;21 : S237-S254

³⁰ Hricak H, Demas BE, Williams RD, McNamara ML, Hedgcock MW, Amparo EG, Tanagho EA: Magnetic resonance imaging in the diagnosis and staging of renal and perirenal neoplasms. *Radiology* 1985;154:709-715.

³¹ Goldfarb DA, Navick AC, Long R et al: Magnetic resonance imaging for assessment of vena caval tumor thrombi: A comparative study with venacavography and computerized tomography scanning. *J Urol* 1990; 144:1100-1104.

³² Kallman DA, King BF, Hattery RR, et al: Renal vein and inferior vena cava tumor thrombus in renal cell carcinoma: CT, US, MRI, and venacavography. *J Comput Assist Tomogr* 1992; 16:240-247.

³³ Choyke PL: Detection and staging of renal cancer. *Magn. Reson. Imaging Clin N Am* 1997;5:29-47.

³⁴ Brierly RO, Thomas PJ, Harrison NW, Fletcher MS, Nawrocki JO, Ashton-Key M: Evaluation of fine-needle aspiration cytology for renal masses. *BJU Int* 2000; 85:14-18.

³⁵ Dechet CB, Zincke H, Sebo TJ, King BF, LeRoy AJ, Farrow GM, Blute ML: Prospective analysis of computerized tomography and needle biopsy with permanent sectioning to determine the nature of solid renal masses in adults. *J Urol* 2003;169:71-74.

³⁶ Robson, CJ: Radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol*, 1963;89:37.

³⁷ Kirkali Z, Van Poppel H: Developments in organ preserving treatments for renal cell cancer: Open Surgery. *Eur Urol*. 2004;3:9-13.

³⁸ Campbell CM, Middleton RG, Rigby OF: Adrenal metastasis in renal cell carcinoma. *Urology* 1983;21:403-5.

³⁹ Shalev M, Cipolla B, Gtille F, et al. Is ipsilateral adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? *J Urol* 1995;153:1445-17.

⁴⁰ Sagalowsky AK, Kadesky KT, Ewalt DM, Kennedy TJ: Factors influencing adrenal metastasis in renal cell carcinoma. *J Urol* 1994;151:1181-1184.

-
- ⁴¹Sandock DS, Seftel AD, Resnick MI: Adrenal metastases from renal cell carcinoma: Role of ipsilateral adrenalectomy and definition of stage. *Urology* 1997;49:28-31.
- ⁴²Tsui KH, Schvarts O, Barbaric Z, et al: Is adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? UCLA experience with 511 radical nephrectomies. *J Urol* 2000;163:437-441.
- ⁴³Blom JHM, Van Poppel H, Marechal JM et al: Radical nephrectomy with and without lymph node dissection: preliminary results of the EORTC randomised phase 3 protocol 30881. *Eur. Urol.*, 36:570-575, 1999.
- ⁴⁴Mejean A, Oudard S, Thiounn N. Prognostic factors of renal cell carcinoma. *JUrol.*2003;169:821-827
- ⁴⁵Belldegrun A, Tsui KH, deKernion JB, Smith RB. Efficacy of nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma: analysis based on the new 1997 tumor-node-metastasis staging system. *J Clin Oncol.* 1999;17(9):2868-75
- ⁴⁶Moinzadeh A, Libertino JA. Prognostic significance of tumor thrombus level in patients with renal cell carcinoma and venous tumor thrombus extension: Is all T3b the same? *J Urol* 2004;171:598-601.
- ⁴⁷Kim HL, Zisman A, Han KR, et al. Prognostic significance of venous thrombus in renal cell carcinoma. Are renal vein and inferior vena cava involvement different? *J.Urol.* 2004;171:588-591
- ⁴⁸Czerny HE (cited by Herczel E): Ueber nierenextirpation bietr. *Kliniches-kaia Khirurgiia* 1890;6:484-486
- ⁴⁹Novick AC, Strem SB. Surgery of the kidney. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, eds. *Campbell's Urology*, 7th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998: 2973-2974.
- ⁵⁰Zucchi A, Mearini L, Mearini E, Costantini E, Vivacqua C, Porena M. Renal cell carcinoma: histological findings on surgical margins after nephron sparing surgery. *J Urol* 2003;169: 905-908.
- ⁵¹Terrone C, Guercio S, De Luca S, et al. The number of lymph nodes examined and staging accuracy in renal cell carcinoma. *BJU Int.*2003;91:37-40
- ⁵²Karakiewicz PI, Trinh Q-D, Bhojani N, et al. Renal cell carcinoma with nodal metastases in the absence of distant metastatic disease: prognostic indicators of disease –specific survival. *Eur Urol.*In pres.doi:10.1016/j.eururo.2006.12.015.
- ⁵³Pantuck AJ, Zisman A, Dorey F, et al. Renal cell carcinoma with retroperitoneal lymph nodes: role of lymph node dissection. *J Urol* 2003;169:2076-83.
- ⁵⁴Han KR, Bui MHT, Pantuck AJ, et al. TNM T3a renal cell carcinoma: adrenal gland involvement is not the same as renal fat invasion. *J Urol* 2003;169:899-903.
- ⁵⁵Goldfarb et al., 1990. Goldfarb DA, Novick AC, Lorig R, et al: Magnetic resonance imaging for assessment of vena caval tumor thrombi: A comparative study with venacavography and computerized tomography scanning. *J Urol* 1990; 144:1100-1104.
- ⁵⁶Kallman et al., 1992. Kallman DA, King BF, Hattery RR, et al: Renal vein and inferior vena cava tumor thrombus in renal cell carcinoma: CT, US, MRI, and venacavography. *J Comput Assist Tomogr* 1992; 16:240-247.

-
- ⁵⁷Novick et al., 1990. Novick AC, Kaye MC, Cosgrove DM, et al: Experience with cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest in the management of retroperitoneal tumors with large vena caval thrombi. *Ann Surg* 1990; 212:472-477.
- ⁵⁸Polascik TI, Partin AW, Pound CR, Marshall FF. Frequent occurrence of metastatic disease in patients with renal cell carcinoma and intrahepatic or subdiaphragmatic intracaval extension treated with surgery: an outcome analysis *Urology* 1998;52:995-999
- ⁵⁹Ljungberg B, Landberg G, Alamdari FI: Factors of importance for prediction of survival in patients with metastatic renal cell carcinoma, treated with or without nephrectomy. *Scand J Urol Nephrol* 2000;34:246-251.
- ⁶⁰Freed SZ, Halperin JP, Gordon M. Idiopathic regression of metastases from renal cell carcinoma. *J Urol*.1977;118(4):538-542
- ⁶¹Marcus SG, Choyke PL, Reiter R, et al. Regression of metastatic renal cell carcinoma after cytoreductive nephrectomy. *J Urol*.1993;150(2):463-466
- ⁶²Stadler WM, Huo D, George C, Yang X, Ryan CW, Karrison T, Zimmerman TM, Vogelzang NJ: Prognostic factors for survival with gemcitabine plus 5-fluorouracil based regimens for metastatic renal cancer. *J Urol*2003;170:141-145.
- ⁶³Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard YJ, Savary J, Chevreau C, Ravaud A, Mercatello A, Peny J, Mousseau M, Philip T, Tursz T: Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa 2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie. N Eng J Med* 1998;338:1272-1278.
- 64 Lorand, L. and S. M. Conrad, "Transglutaminases", *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 58 No. 1, pp. 9-35, 1984
- 65 Pisano, J. J., J. S. Finlayson and M. P. Peyton, "Cross-link in fibrin polymerized by factor 13 epsilon-(gamma-glutamyl)lysine", *Science*, Vol. 160, No. 830, pp. 892-893, 1968
- 66 Lorand, L. and R. M. Graham, "Transglutaminases: Crosslinking Enzymes with Pleiotropic Functions", *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 4, No. 2, pp. 140-156, 2003
- 67 Folk, J. E., J. P. Mullooly and P. W. Cole, "Mechanism of Action of Guinea Pig Liver Transglutaminase. II. The Role of Metal in Enzyme Activation", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 242, No. 8, pp. 1838-1844, 1967
- 68 Griffin, M. and J. Wilson, "Detection of Epsilon(gamma-glutamyl) Lysine", *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 58, No. 1-2, pp. 37-49, 1984
- 69 Birckbichler, P. J., G. R. Orr, H. A. Carter and M. K. Jr Patterson, "Catalytic formation of Epsilon-(Gamma-Glutamyl)lysine in Guinea Pig Liver Transglutaminase", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.78, No. 1, pp. 1-7, 1977.
- 70 Folk, J. E. and J. S. Finlayson, "The Epsilon-(gamma-glutamyl)lysine Crosslink and the Catalytic Role of Transglutaminases", *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 31, pp. 1-133, 1977
- 71 Mycek, M. J. and H. Waelsch, "The Enzymatic Deamidation of Proteins", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 235, pp. 3513-3517, 1960

-
- 72 Parameswaran, K. N., X. F. Cheng, E. C. Chen, P. T. Velasco, J. H. Wilson and L. Lorand, "Hydrolysis of Gamma:epsilon Isopeptides by Cytosolic Transglutaminases and by Coagulation Factor XIIIa", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, No. 25, pp. 10311-10317, 1997
- 73 Thomázy, V. and L. Fésüs, "Differential Expression of Tissue Transglutaminase in Human Cells. An Immunohistochemical Study", *Cell and Tissue Research*, Vol. 255, No. 1, pp. 215-224, 1989.
- 74 Aeschlimann D, Thomazy V. Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect Tissue Res.* 2000;41(1):1-27.
- 75 Milakovic T, Tucholski J, McCoy E, Johnson GV. Intracellular localization and activity state of tissue transglutaminase differentially impacts cell death. *J Biol Chem.* 2004 Mar 5;279(10):8715-22.
- 76 Mishra S, Murphy LJ. The p53 oncoprotein is a substrate for tissue transglutaminase kinase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jan 13;339(2):726-30.
- 77 Mishra S, Saleh A, Espino PS, Davie JR, Murphy LJ Phosphorylation of histones by tissue transglutaminase. *J Biol Chem.* 2006 Mar 3;281(9):5532-8.
- 78 Lee, K. N., P. J. Birckbichler and M. K. Jr Patterson, "GTP Hydrolysis by Guinea Pig Liver Transglutaminase", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 162, No. 3, pp. 1370-1375, 1989
- 79 Lai, T. S., A. Bielawska, K. A. Peoples, Y. A. Hannun and C. S. Greenberg, "Sphingosylphosphocholine Reduces the Calcium Ion Requirement for Activating Tissue Transglutaminase", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, No. 26, pp. 16295-16300, 1997
- 80 Achyuthan, K. E. and C. S. Greenberg, "Identification of a Guanosine Triphosphate Binding Site on Guinea Pig Liver Transglutaminase. Role of GTP and Calcium Ions in Modulating Activity", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 262, No. 4, pp. 1901-1906, 1987.
- 81 Hasegawa, G., M. Suwa, Y. Ichikawa, T. Ohtsuka, S. Kumagai, M. Kikuchi, Y. Sato and Y. Saito, "A Novel Function of Tissue-Type Transglutaminase: Protein Disulphide Isomerase", *Biochemical Journal*, Vol. 373, No. 3, pp. 793-803, 2003.
- 82 Mishra, S. and L. J. Murphy, "Tissue Transglutaminase Has Intrinsic Kinase Activity: Identification of Transglutaminase 2 as an Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Kinase", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 23, pp. 23863-23868, 2004.

-
- 83 Mishra, S., G. Melino, and L. J. Murphy, "Transglutaminase 2 Kinase Activity Facilitates Protein Kinase A-Induced Phosphorylation of Retinoblastoma Protein", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, No. 25, pp. 18108-18115, 2007
- 84 Griffin, M., R. Casadio and C. M. Bergamini, "Transglutaminases: Nature's Biological Glues", *Biochemical Journal*, Vol. 368, No. 2, pp. 377-396, 2002. 73
- 85 Smethurst, P. A. and M. Griffin, "Measurement of Tissue Transglutaminase Activity in a Permeabilized Cell System: Its Regulation by Ca^{+2} and nucleotides", *Biochemical Journal*, Vol. 313, No. 3, pp. 803-808, 1996
- 86 Nunes, I., P. E. Gleizes, C. N. Metz and D. B. Rifkin, "Latent Transforming Growth Factor-Beta Binding Protein Domains Involved in Activation and Transglutaminase-Dependent Cross-Linking of Latent Transforming Growth Factor-beta", *The Journal of Cell Biology*, Vol. 136, No. 5, pp. 1151-1163, 1997
- 87 Casini, A., M. Pinzani, S. Milani, C. Grappone, G. Galli, A. M. Jezequel, D. Schuppan, C. M. Rotella and C. Surrenti, "Regulation of Extracellular Matrix Synthesis by Transforming Growth Factor Beta 1 in Human Fat-Storing Cells", *Gastroenterology*, Vol. 105, No. 1, pp. 245-253, 1993
- 88 Li, J. H., X. R. Huang, H. J. Zhu, R. Johnson and H. Y. Lan, "Role of TGF-beta Signaling in Extracellular Matrix Production Under High Glucose Conditions", *Kidney International*, Vol. 63, No. 6, pp. 2010-2019, 2003
- 89 Verderio, E., C. Gaudry, S. Gross, C. Smith, S. Downes and M. Griffin, "Regulation of Cell Surface Tissue Transglutaminase: Effects on Matrix Storage of Latent Transforming Growth Factor-beta Binding Protein-1", *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 47, No. 11, pp. 1417-1432, 1999
- 90 Douthwaite, J. A., T. S. Johnson, J. L. Haylor, P. Watson and A. M. El Nahas, "Effects of Transforming Growth Factor-beta1 on Renal Extracellular Matrix Components and Their Regulating Proteins", *Journal of the American Society of Nephrology*, Vol. 10, No. 10, pp. 2109-19, 1999.
- 91 Akimov, S. S., D. Krylov, L. F. Fleischman and A. M. Belkin, "Tissue Transglutaminase is an Integrin-Binding Adhesion Coreceptor for Fibronectin", *The Journal of Cell Biology*, Vol. 148, No. 4, pp. 825-838, 2000
- 92 Telci, D., Z. Wang, X. Li, E. A. Verderio, M. J. Humphries, M. Baccarini, H. Basaga and M. Griffin, "Fibronectin-Tissue Transglutaminase Matrix Rescues RGD Impaired Cell Adhesion Through Syndecan-4 and Beta1 Integrin Co-signaling", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, No. 30, pp. 20937-20947, 2008.
- 93 Telci, D. and M. Griffin, "Tissue transglutaminase (TG2)--A Wound Response Enzyme", *Front Bioscience*, Vol. 11, pp. 867-882, 2006
94. Mosher, D. F., "Physiology of Fibronectin", *The Annual Review of Medicine*, Vol. 35, pp. 561-575, 1984
- 95 Fogerty, F. J., S. K. Akiyama, K. M. Yamada and D. F. Mosher, "Inhibition of Binding of Fibronectin to Matrix Assembly Sites by Anti-Integrin (alpha 5 beta 1) Antibodies", *The Journal of Cell Biology*, Vol. 111, No. 2, pp. 699-708, 1990
- 96 Alberts B., A. Johnson, J. Lewis, M. Rafi, K. Roberts and P. Walter, "Mechanisms of Cell Communication", in *The Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition, Garland Science, New York, 2008.

-
- 97 Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti, "Integrin signaling", *Science*, Vol. 285, No. 5430, pp. 1028-1032, 1999
- 98 Hynes, R. O., "Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines", *Cell*, Vol. 110, No. 6, pp. 673-687, 2002
- 99 Humphries, M. J., "Integrin Structure", *Biochemical Society Transactions*, Vol. 28, No. 4, pp. 311-339, 2000.
- 100 O'Toole, T. E., Y. Katagiri, R. J. Faull, K. Peter, R. Tamura, V. Quaranta, J. C. Loftus, S. J. Shattil and M. H. Ginsberg, "Integrin Cytoplasmic Domains Mediate Inside-Out Signal Transduction", *The Journal of Cell Biology*, Vol. 124, No. 6, pp. 1047-1059, 1994
- 101 Schwartz, M. A., M. D. Schaller and M. H. Ginsberg, "Integrins: Emerging Paradigms of Signal Transduction", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 11, pp. 549-599, 1995
- 102 . Liu, S., D. A. Calderwood and M. H. Ginsberg, "Integrin Cytoplasmic Domain Binding Proteins", *Journal of Cell Science*, Vol. 113, No. 20, pp. 3563-3571, 2000
- 103 Woods, A. and J. R. Couchman, "Syndecans: Synergistic Activators of Cell Adhesion", *Trends in Cell Biology*, Vol. 8, No. 5, pp. 189-192, 1998.
- 104 Lambaerts, K., S. A. Wilcox-Adelman and P. Zimmermann, "The Signaling Mechanisms of Syndecan Heparan Sulfate Proteoglycans", *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 21, No. 5, pp. 662-669, 2009.
- 105 Carey, D. J., "Syndecans: Multifunctional Cell-Surface Co-receptors", *Biochemical Journal*, Vol. 327, pp. 1-16, 1997.
- 106 Woods, A. and J. R. Couchman, "Syndecan-4 and focal adhesion function", *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 13, No. 5, pp. 578-583, 2001.
- 107 Piacentini, M., L. Piredda, D. Starace, M. Annicchiarico-Petruzzelli, M. Mattei, S. Oliverio, M. Grazia Farrace and G. Melino, "Differential Growth of N- And S-Type Human Neuroblastoma Cells Xenografted into Scid Mice. Correlation with Apoptosis", *The Journal of Pathology*, Vol. 180, No. 4, pp. 415-422, 1996
- 108 Nicholas, B., P. Smethurst, E. Verderio, R. Jones and M. Griffin, "Cross-linking of Cellular Proteins by Tissue Transglutaminase During Necrotic Cell Death: A Mechanism for Maintaining Tissue Integrity", *Biochemical Journal*, Vol. 371, pp. 413-422, 2003
- 109 Mehta, K., "High Levels of Transglutaminase Expression in Doxorubicin-Resistant Human Breast Carcinoma Cells", *International Journal of Cancer*, Vol. 58, No. 3, pp. 400-406, 1994
- 110 Birckbichler, P. J. and M. K. Jr. Patterson, "Cellular Transglutaminase, Growth, and Transformation", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 312, pp. 354-365, 1978.66.
- 111 Mian, S., "The Importance of the GTP-binding Protein Tissue Transglutaminase in the Regulation of Cell Cycle Progression", *FEBS Letters*, Vol. 370, No. 1-2, pp. 27-31, 1995
- 112 Mann, A. P., A. Verma, G. Sethi, B. Manavathi, H. Wang, J. Y. Fok, A. B. Kunnumakkara, R. Kumar, B. B. Aggarwal and K. Mehta, "Overexpression of Tissue Transglutaminase Leads to Constitutive Activation of Nuclear Factor-kappaB in Cancer Cells: Delineation of a Novel Pathway", *Cancer Research*, Vol. 66, No. 17, pp. 8788-8795, 2006
- 113 Ruddon, R.W., "The Biochemistry and Cell Biology of Cancer" in *Cancer Biology*, Fourth Edition, pp. 117-257, Oxford University Press, New York, 2007.

-
- 114 Kotsakis, P. and M. Griffin, "Tissue Transglutaminase in Tumour Progression: Friend or Foe?", *Amino Acids*, Vol. 33, No. 2, pp. 373-384, 2007
- 115 Mehta, K., A. Kumar and H. I. Kim, "Transglutaminase 2: a Multi-tasking Protein in the Complex Circuitry of Inflammation and Cancer", *Biochemical Pharmacology*, Vol. 80, No. 12, pp. 1921-1929, 2010
- 116 Mehta, K., J. Fok, F. R. Miller, D. Koul and A. A. Sahin, "Prognostic Significance of Tissue Transglutaminase in Drug Resistant and Metastatic Breast Cancer", *Clinical Cancer Research*, Vol. 10, No. 23, pp. 8068-8076, 2004
- 117 Herman, J. F., L. S. Mangala and K. Mehta, "Implications of Increased Tissue Transglutaminase (TG2) Expression in Drug-resistant Breast Cancer (MCF-7) Cells", *Oncogene*, Vol. 25, No. 21, pp. 3049-3058, 2006.
- 118 Mangala, L. S., J. Y. Fok, I. R. Zorrilla-Calancha, A. Verma and K. Mehta, "Tissue Transglutaminase Expression Promotes Cell Attachment, Invasion and Survival in Breast Cancer Cells", *Oncogene*, Vol. 26, No. 17, pp. 2459-2470, 2006.
- 119 Fok, J. Y., S. Ekmekcioglu and K. Mehta, "Implications of Tissue Transglutaminase Expression in Malignant Melanoma", *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 5, No. 6, pp. 1493-1503, 2006.
- 120 Verma, A., H. Wang, B. Manavathi, J. Y. Fok, A. P. Mann, R. Kumar and K. Mehta, "Increased Expression of Tissue Transglutaminase in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Implications in Drug Resistance and Metastasis", *Cancer Research*, Vol. 66, No. 21, pp. 10525-10533, 2006.
- 121 Belkin, A. M., S. S. Akimov, L. S. Zaritskaya, B. I. Ratnikov, E. I. Deryugina and A.Y. Strongin, "Matrix-dependent Proteolysis of Surface Transglutaminase by Membrane-type Metalloproteinase Regulates Cancer Cell Adhesion and Locomotion", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 21, pp. 18415-18422, 2001
- 122 Bell, S. E., A. Mavila, R. Salazar, K. J. Bayless, S. Kanagala, S. A. Maxwell and G.E. Davis, "Differential Gene Expression during Capillary Morphogenesis in 3D Collagen Matrices: Regulated Expression of Genes Involved in Basement Membrane Matrix Assembly, Cell Cycle Progression, Cellular Differentiation and G-protein Signaling", *Journal of Cell Science*, Vol. 114, pp. 2755-2773, 2001
- 123 . Jones, R. A., P. Kotsakis, T. S. Johnson, D. Y. Chau, S. Ali, G. Melino and M.Griffin, "Matrix Changes Induced by Transglutaminase 2 Lead to Inhibition of Angiogenesis And Tumor Growth", *Cell Death and Differentiation*, Vol. 13, No. 9, pp. 1442-1453, 2006.
- 124 Erdem M, Erdem S, Sanli O, Sak H, Kilicaslan I, Sahin F, Telci D. Up-regulation of TGM2 with ITGB1 and SDC4 is important in the development and metastasis of renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2013 Mar 14. pii: S1078-1439(12)00322-5. doi: 10.1016/j.urolonc.2012.08.022.
- 125 Hidaka H, Seki N, Yoshino H, Yamasaki T, Yamada Y, Nohata N, Fuse M, Nakagawa M, Enokida H. Tumor suppressive microRNA-1285 regulates novel molecular targets: aberrant expression and functional significance in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2012 Jan;3(1):44-57.

¹²⁶ EAU Guidelines on renal cell carcinoma 2012 edition

¹²⁷ Kenny PA, Wood CG (2012) Integration of surgery and systemic therapy for renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 39:211–231

¹²⁸ Kyoda Y, Kobayashi K, Hirobe M et al. *Int J Clin Oncol*.2013 Feb 13. [Epub ahead of print]

¹²⁹ Brian R. Lane MD, PhD^a, Michael W. Kattan PhD; Prognostic Models and Algorithms in Renal Cell Carcinoma: *Urol Clin North Am*. 2008 Nov;35(4):613-25

¹³⁰ Cindolo L, Patard JJ, Chiodini P, et al: Comparison of predictive accuracy of four prognostic models for nonmetastatic renal cell carcinoma after nephrectomy: a multicenter European study. *Cancer* 104:1362-1371, 2005.

¹³¹ Akar U, Ozpolat B, Mehta K, Fok J, Kondo Y, Lopez-Berestein G (2007) Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res* 5:241–249

¹³² Kausar T, Sharma R, Hasan MR, Tripathi SC, Saraya A, Chattopadhyay TK, Gupta SD, Ralhan R. Clinical significance of GPR56, transglutaminase 2, and NF- κ B in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest*. 2011 Jan;29(1):42-8.