

T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

METASTATİK PANKREAS SAFRA KESESİ, SAFRA YOLLARI KANSERLERİ İLE
RHO-KİNAZE GEN POLİMORFİZM İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Handan HARDAROĞLU ŞAHİN

UZMANLIK TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Alper SEVİNÇ

GAZİANTEP

MART 2010

INVESTIGATION OF THE RELATION BETWEEN RHO-KINASE GENE POLYMORFIZM AND METASTASIS IN CANSERS OF PANCREAS, GALLBLADDER AND BILE DUCTS

The aim of this study is to investigate the possible relationship between ROCK-2 gene polimorfizm, Rho-kinase, known its efficacious in metastasis biology and cansers of pancreas, gallbladder, and bile ducts in Turkish population.

This study involved patients of cancer without metastasis (pancreas n=16, gallbladder and bile ducts n=23) and patients of cancer with metastasis (pancreas n=78, gallbladder and bile ducts n=76), and healty volunteers (control group n=162). DNA isolations were performed on the blood samples obtained from the patients and control group, and NCBI SNP data base (<http://www.....>)

analized dissolution curve

ROCK-2 gene in terms of Thr431Asn polimorfism, Thr-Thr, Thr-Asn and Asn-Asn genotip frecances comparing to control group are found statistically insignificante in both cancer groups nonmetastatic pancreas, and nonmetastatic gallbladder and bile ducts ($p>0,05$). Similarly, among groups of metastatic carcinomas of pancreas, gallbladder, and bile ducts are found statistically insignificant ($p>0,05$). No significant correlation is found statistically between both control and nonmetastatic, and metastatic groups in terms of Thr and Asn allele frecance ($p>0,05$).

This study is the first investigating the role of ROCK-2 gene polimorfism in cancers of pancreas, gallbladder and bile ducts. In the light of obtained data, ROCK-2 gene polimorfism seems to be possible marker both early determinig the cansers of pancreas, gallbladder and bile ducts and predicting metastasis.

1. GİRİŞ

Safra kesesi ve safra yolları kanserleri, gastrointestinal sistemin sık rastlanan, son derece hızlı yayılan ve oldukça düşük yaşam süresine sahip malign tümörleridir. (1).Bilinen en ölümcül kanser olarak tanımlanan pankreas kanseri, tüm GİS kanserleri içindeki %11 oranı ile de ikinci sıklıkta görüldüğü bilinmektedir.

Çalışmamızın temelini oluşturan bu kanser grubunda tedaviye cevabı dolayısıyla prognozu belirleyen en önemli faktör hastalığın tanı anındaki evresi ve metastaz durumudur. Hastalığın ve metastazın erken saptanması hastalığın tedavisinde önemli bir yol alınmasını sağlayabilir.

Rho, başlıca aktin hücre iskeletinin organizasyonunun düzenlenmesinde, hücre göçü, hücre adezyonu ve sitokinez gibi çok çeşitli hücresel olayların kontrolünde rol oynar. (2,3). Rho ile etkileşen ve aktive olan Rho-kinaz, düz kas kasılması, hücre büyümesi, adezyonu, migrasyonu, motilitesi, gen ekspresyonunu ve apoptozu da içeren farklı hücresel fonksiyonlara aracılık eder (4).

Rho/Rho-kinaz yolağı, hücre adezyonu, migrasyonu, şekil değişimleri ve sitokinezide etkili olmaktadır (5,6). Bu etkileri ile kanser hücrelerinin invazyonu ve metastatik aktivitelerini düzenlemektedirler. Rho-kinaz inhibitörleri ile bu hücresel fonksiyonların azaltıldığı ve kanser hücrelerinde metastazın baskılandığı gösterilmiştir (7,8). Hücrelerin onkolojik değişikliğe uğramasında Rho proteinleri ve dolayısı ile Rho-kinazın aktivasyonu önemli rol oynamaktadır (9).

Bu çalışmadaki amacımız; Rho-kinaz (ROCK) enziminin gen polimorfizminin safra kesesi, safra yolları ve pankreas kanserindeki rolünü saptamaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. SAFRA KESESİ KANSERİ

Safra kesesi kanserleri (SKK), son derece hızlı yayılan ve oldukça düşük sürviye sahip gastrointestinal sistemin beşinci en sık rastlanan malign tümörleridir. Kolesistektomi piyeslerinde tesadüfen rastlanması dışında klinik belirti verdiğinde genellikle ilerlemiş evrelerde ortaya çıkmaktadır. Yüksek lenfatik yayılım ve implantasyon yeteneğine de sahip olan safra kesesi kanserlerinin, halen uygun cerrahi tedavi dışında uzun yaşam veya şifa sağlayıcı bir tedavisi yoktur (1).

2.1.1. Epidemiyoloji

SKK'lerinin görülme sıklığı coğrafi ve etnik farklılıklar göstermektedir. Örneğin şili gibi güney Amerika lkelerinde, yerli Amerika'lılarda, bazı Avrupa lkelerinde ve İsrail'de sık görülürken, siyah Amerika'lılar, İspanya ve Hindistan'da daha az grlmektedir. Ayrıca düşük sosyoekonomik seviyeli toplumlarda da sık rastlandığı bildirilmektedir (10). Kadın-erkek oranı ortalama 4-6:1 olup, görülme sıklığı yaşla paralel olarak artmaktadır.

2.1.2. Etyoloji

SKK'lerinin epidemiyolojik özellikleri safra kesesi taşları ile aşırı benzerlik gösterdiğinden genellikle kolelityazis-kanser ilişkisi kabul görmektedir. Ancak tüm kolelityazis olgularının %0.5-3'nde kanser görülmesi, daha ziyade kronik enflamasyonun kansere yol açıcı faktör olduğunu düşündürmektedir. Bu yüzden asemptomatik safra kesesi taşlarında profilaktik kolesistektomi tartışmalıdır (11).

Kronik inflamasyonun en ileri şeklini temsil eden 'porselen kese' olgularında kanser görülme oranı yaklaşık %25 olup, kolesistektomi her olguda endikedir (12). Ayrıca yapılan deneysel çalışmalar, kanserli hastaların safralarında daha yüksek sekonder safra asitleri bulunduğunu göstermiştir (13). Metildopa, oral kontraseptifler, isoniazid kullanımı ve lastik endüstrisinde çalışmak etyolojik faktörler arasında sayılmıştır, ancak kanıtlanmamıştır (11).

2.1.3. Patoloji

Kronik enflamasyon zemininde gelişen displazinin önce insitu kansere, daha sonra invazif karsinoma dönüştüğü kabul edilmektedir. Bu değişim sırasıyla 5 ve 10 yıllık sürelerde gerçekleşmektedir (14).

SKK'lerinin en yaygın histopatolojik tipi adenokarsinom'dur. Adenoskuamoz kanser, yulaf hücreli kanser, sarkoma, karsinoid, lenfoma ve melanoma daha nadir rastlanan diğer histolojik tiplerdir.

Adenokarsinomların da; iyi diferansiye, papiller, intestinal tip, pleomorfik dev hücreli, az diferansiye küçük hücreli, kolloid, koriokarsinoma-like hücreli gibi alt grupları mevcuttur. Bunların içinde papiller tip en iyi, az diferansiye küçük hücreli tip de en kötü prognoza sahiptir (15).

SKK'leri iyi diferansiye (G1), orta dereceli diferansiye (G2), az diferansiye (G3) ve indiferansiye (G4) olarak grade'lendirilirler. Maalesef olguların çoğu az diferansiye gruba girmektedir.

SKK'lerinin bir bölümünde p53, K-ras mutasyonları, DCC varlığı gibi moleküler değişiklikler saptanmaktadır. C-erbB-2 geni aşırı ekspresyonu veya nm23 düşük ekspresyonu da SKK'lerinde rastlanan genetik anormalliklerdendir (16,17).

Safra kesesi ince duvarlı olduğundan, bu organın kanserleri kolaylıkla lenfatik ve vasküler yapılara ulaşmanın yanında, yine kolaylıkla safra kesesinin dışına (karaciğer veya peritona) yayılabilmektedir. Yapılan çalışmalar ancak %10 olguda kanserin safra kesesine sınırlı kaldığını, geri kalanlarda ise lenfatik-hematojen yayılım (%65-95) veya karaciğer invazyonu (%90) bulunduğunu bildirmektedir (18).

Karın dışı uzak metastazlar en sık akciğerlerde görülmektedir.

2.1.4. Evreleme

Hastalığın evresi, prognoz tayininde, patolojik parametrelerden daha önemli bir belirteçtir. Modifiye Nevin sistemi, JBSS (Japanese Biliary Surgical Society) sistemi ve AJCC/UICC (American Joint Commission on Cancer/Union International Centre le Cancer) TNM sistemi gibi çeşitli evreleme metodları bildirilmiştir (11).

TNM sınıflaması;

- T1: Tümör muskuler tabakaya invaze
- T2: Tümör kese duvarının tüm katlarına invaze
- T3: Tümör seroza bütünlüğünü bozmuş
- T4: Tümör ana portal vene ya da hepatik artere invaze olmuş

Lenf nodu;

- N0: Nod tutulumu yok
- N1: Bölgesel lenf nodu metastazı var.

	Tümör	Node	Metastaz
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-T3	N1	M0
III	T4	Herhangi bir N	M0
IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo.1. Safra kesesi kanseri evrelemesi

2.1.5. Klinik

Safra kesesi taşı nedeniyle bilier kolik anamnezi olan bir hastada, ağrının sürekli bir karakter kazanması malign değişime işaret edebilir. Kilo kaybı, sağ üst kadranda kitle ve sarılık eklenmesi şüpheleri artırmakla kalmayıp, çoğu zaman rezeksiyon şansını kaybetmiş ileri bir hastalık anlamına gelir.

Sağ üst kadranda yakınması olan bir hastada birinci adım inceleme ultrasonografidir. Mukoza devamlılığında bozulma, mukoza ekojenitesinde artış veya submukozada hipoekojen kalınlaşma şüphe çekici ultrasonografi bulgularıdır. Safra kesesinin diffüz kalınlaşması diğer benign durumlarla karışabilir.

Diğer yardımcı laboratuvar testleri hematokrit, karaciğer fonksiyon testleri, alkali fosfataz ve bilirubinlerdir. Karaciğer parankimine, intra veya ekstrahepatik safra yollarına invazyon durumlarında bu değerler bozulacaktır. Uygun semptomların varlığında, CEA ve CA 19-9 gibi tümör markerları da olguların bir kısmında yüksek bulunabilir.

Ultrasonografik incelemede kuvvetli kanser şüphesi belirdiğinde, BT görüntülemeye başvurulmalıdır. BT ile karaciğerdeki invazyon veya metastazlar ile büyümüş regional, çöliak veya interaortokaval lenf nodülleri varsa saptanabilmektedir. Metastazların ve safra yolu tutulumlarının değerlendirilmesinde MR-kolanjiografi ile birlikte MR incelemesi BT'den daha duyarlıdır (19).

Peripankreatik ve periportal lenf nodüllerin tesbit edilebilmesi için bazen endoskopik US'den yararlanılabilir. Aynı anda ince iğne biyopsisi yapabilme imkanı sayesinde, inoperabl olguların saptanmasına yardımcı olabilir. Endoskopik retrograd kolanjiografi (ERCP) ve perkutan transhepatik kolanjiografi (PTK) işlemleri de, rezektabilite kararı verirken veya palyatif işlemlerin seçiminde yol gösterici olabilmektedir.

2.1.6. Tedavi

2.1.6.1. Cerrahi Tedavi

Asemptomatik safra kesesi taşı için profilaktik kolesistektomi, laparoskopik cerrahi çağında bile tartışmalı bir konudur. Toplumdaki kolelityazis sıklığı ile kıyaslandığında SKK'i sıklığının oldukça düşük olduğu düşünülerek, rutin profilaktik kolesistektomi bazı merkezlerce önerilmemektedir. Ancak US incelemesinde safra kesesi duvarındaki en küçük bir şüpheli görünüm veya 'porselen safra kesesi' varlığı ameliyat endikasyonudur. Bazı merkezler, kanserli olgularda port yeri implantasyonlarının sıklığı nedeniyle, laparoskopik operasyonları önermemektedirler.

Benign safra kesesi poliplerindeki kanser riski, polip sayısı ve boyutu ile ilişkilidir. Büyük (>1cm) ve az sayıdaki poliplerin malign olma ihtimali, küçük ve multipl olanlardan daha fazladır. Safra kesesinde 3'den az veya 18 mm'den büyük poliplerde kolesistektomi önerilmektedir (20).

Herhangi bir kolesistektomi operasyonu sırasında şüpheli bir lezyon saptandığında, ince iğne aspirasyon veya tru-cut biyopsi ile kanser araştırılmalıdır. Kanser saptanırsa, subserozal plana girilerek yapılacak bir kolesistektomi ile çok sayıda kanser hücresinin peritona yayılması mümkündür. Bu nedenle tümöre dokunulmadan yapılacak bir 'genişletilmiş kolesistektomi' hastanın tek uzun yaşam şansını oluşturmaktadır.

2.1.6.2. Adjuvant Tedaviler

SKK'leri genel olarak kemoterapiye (KT) yanıt vermezler. Peritoneal ve lenfatik yayılım özelliği de radyoterapiye (RT) uygun değildir. Yine de 5-fluorourasil ve mitomycin-C ile KT ve RT uygulanan çalışma yapılmış ve ancak birkaç aylık sürvi avantajı bildirilmiştir (21). Bu çalışma randomize-kontrollü çalışma olmadığından, sonuçları ihtiyatla karşılanmaktadır.

Bir çalışmada ise, Evre IV olgularda uygulanan intraoperatif RT ile 3 yıllık sürvide anlamlı fark (%10'a karşı %0) elde edildiği bildirilmiştir (22). İleri evre kanserlerde ayrıca regional (intraarteryel) veya intraperitoneal KT yöntemleri de denenmiş, fakat yüzgüldürücü sonuçlar elde edilememiştir (23).

Nonrezektabl olgularda, tek başına KT veya RT bugün için sürvi avantajı sağlayamamakla birlikte, bu tedavi modaliteleri ile gelecekte daha iyi sonuçlar alınması ümit edilmektedir.

2.1.6.3. Palyatif Tedaviler

Bilindiği gibi olguların çoğu nonrezektabl olup ortalama yaşam süreleri 2-4 ay civarında ve 1 yıllık sürvi %5'den azdır. Bu hastalarda ağrı, sarılık ve barsak obstrüksiyonuna yönelik palyatif girişimler önem kazanmaktadır. Sarılığın ortadan kaldırılması için 'perkutan safra drenajı' iyi bir seçenektir. Bunun mümkün olmadığı durumlarda karaciğer sol lobunu kullanarak intrahepatik safra kanallarının barsağa drenajı düşünülebilir.

SKK'leri, 5 yıllık sürvisi %5'den az ve median sürvisi 1 yıldan az olan agresif tümörlerdir. Ancak yapılan araştırmalar, iyi bir evreleme sonucu seçilmiş olgularda uygulanacak radikal cerrahi girişimlerin uzun süreli yaşam şansı sağlayabileceğini göstermektedir.

Kolelityazis ile SKK'leri arasındaki ilişkiye rağmen, asemptomatik olgularda rutin profilaktik kolesistektomi önerilmemektedir. Kolesistektomi uygulanacak hastalarda da, operasyon öncesi ve operasyon esnasında ki değerlendirmede çok titiz davranılmalıdır. Gereğinde yapılacak intraoperatif frozensection patolojik inceleme ile kanser saptandığında, aynı seansta radikal cerrahi (genişletilmiş kolesistektomi) uygulanması, sekonder girişimlerden daha iyi sonuç vermektedir.

Rezeke edilemeyen olgularda, mümkünse en az invazif metodlarla ağrı, sarılık ve barsak obstrüksiyonu palyasyonu düşünülmelidir.

2.2. SAFRA YOLU KANSERLERİ (KOLANJİOKARSİNOMLAR)

Kolanjiokarsinomlar (KKA) intrahepatik ve ekstrahepatik safra kanallarının epitel hücrelerinden kaynaklanan kanserlerdir. Çoğu prezente olduğunda lokal olarak ilerlemiş lezyonlardır. Son yıllarda KKA terimi intrahepatik, perihiler ya da distal ekstrahepatik safra kanallarının kanserlerini tanımlamada kullanılmaktadır. Bu tanımlamada safra kesesi ve ampulla vateri kanserleri yer almamaktadır.

2.4. EPİDEMİYOLOJİ VE ETYOLOJİ

KKA insidansı yaşla artar, 65 yaşında pik yapar. Kadın ve erkekteki sıklığı benzerdir. Tüm karaciğer ve safra yolları kanserlerinin %15-25'ni, bütün kanserlerin ise %2'den az kısmını oluşturur (24) .

KKA sporadik olarak nadir görülür, genelde altta yatan patolojilere sahiptir. KKA için risk faktörlerinin bir kısmı saptanmıştır. Primer sklerozan kolanjit (PSC)'li

hastaların yaklaşık %6-11'inde KKA gelişir. KKA; PSC tanısı olan hastalarda daha erken görülme eğilimindedir (24). Kronik ülseratif kolitli (ÜK) hastalarda KKA gelişme riski genel popülasyondan 10 kat daha fazladır (24). Safra yolunda kistik anomalisi olan hastaların yaklaşık %2.5-28'de KKA veya SKK'li gelişebileceği bildirilmiştir (25).

Etiyolojik Faktörler

- Primer sklerozan kolanjit
- Safra yolu adenoması ve biliyer papillomatosis
- Ülseratif kolit
- Cerrahi biliyer-enterik drenaj prosedürleri
- 65 yaş üzeri
- KC parazitik enfestasyonları
- Koledokal kist
- Kronik hepatit C ve siroz
- Hepatolitiyazis
- Karoli hastalığı
- Kronik intraduktal taş
- Kimyasal ajanlar (thorotrast, radionuclides, vinylklorid, nitrozaminler,)
- Tifo taşıyıcılığı
- Sigara

KKA'lar için tüm risk faktörlerinin ortak noktası kronik biliyer inflamasyon varlığıdır.

2.5. PATOLOJİ

Histolojik olarak vakaların büyük bir kısmı (%95) adenokarsinomdur ve iyi differansiye olmuş müsin üretenden kötü differansiye olmuşa kadar değişebilirler. KKA'lar gland sayısı oranına göre iyi differansiye (%95), orta differansiye (%40-94) ve kötü differansiye (%5-39) olarak sınıflandırılır (26).

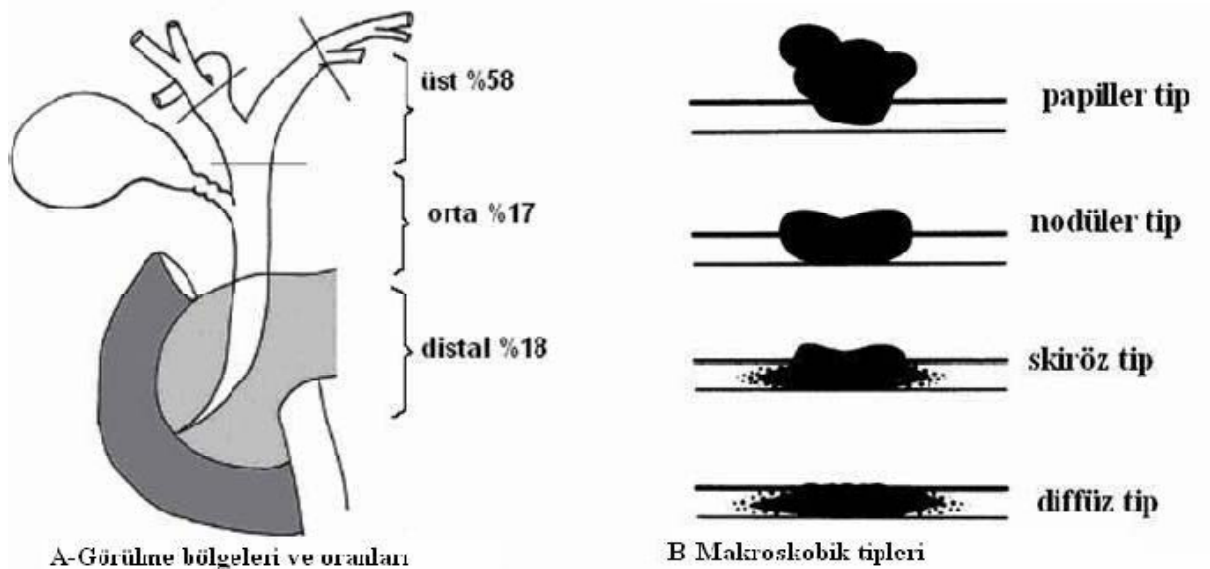
Morfolojik özellikleri dikkate alınırsa KKA'ları papiller, sklerozan ve nodüler olmak üzere subklasifiye edilebilir. En sık olanı sklerozan tiptir. Bunu papiller ve nodüler KKA'lar takip eder. (27).

Ekstrahepatik safra yolu tümörlerinin %58'si üst , %17'si orta ve %18'i de alt 1/3'lük kısımdan kaynaklanır. Makroskopik olarak 4 tipte görülür.

- Papiller
- Nodüler

- Skiröz
- Diffüz

KKA'ların histolojik tipleri şunlardır: karsinoma in situ, adenokarsinoma, papiller adenokarsinom, intestinal tip adenokarsinom, musinöz adenokarsinom, clear cell adenokarsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom, adenoskuamöz karsinom, skuamöz hücreli karsinom, küçük hücreli karsinom ve undifferansiye karsinom.



Şekil.1. A-) KKA'ların görülme bölgeleri ve yüzdeleri. B-) Makroskobik görünüşleri (48).

2.6.YAYILIM

KKA'lar longitudinal ve vertikal invazyonun her ikisi ile infiltre olur. Mikroskobik yayılımı kolanjiografiyle gösterilen makroskobik sınırının dışındadır ve mikroskobik pozitif köken olarak tanı konulur.

Perinöral yayılım hepatik arterin etrafındaki otonom sinirler aracılığı ile olabilmektedir. Perinöral yayılım varlığında prognoz kötüdür. Perinöral yayılım diğer yayılım yollarından bağımsız bir prognostik faktördür (28).

2.7.KLİNİK BULGULAR

KKA'lı hastaların klinik bulguları tümörün lokalizasyonuna bağlıdır. Ekstrahepatik yerleşimli KKA'sı olan hastalarda genellikle ağrısız sarılık, koyu renkli idrar, açık renkli gaita, kaşıntı, kilo kaybı, ateş ve halsizlik şikâyetleri gözlenir. Sarılık (%90) en sık gözlenen fizik muayene bulgusu iken bunu hastaların yaklaşık %40'ında gözlenen hepatomegali takip eder. Ek olarak kilo kaybı (%29), karın ağrısı (%20), ateş (%9) görülebilir. Sarılığa bağlı olarak hastaların %30'unda kaşıntı görülür.

Sadece sağ hepatik duktus veya sol hepatik duktus tutulumu gibi segmental obstrüksiyon olgularında sarılık olmasa da kaşıntı tek semptom olabilir. İntrahepatik KKA'lı hastalarda ise sarılık nadiren gözlenirken en yaygın şikâyet abdominal rahatsızlık, kilo kaybı, iştah azalması gibi nonspesifik şikâyetlerdir (29).

İntrahepatik KKA nadiren kritik olarak karaciğerde (KC) santral bir alanda yerleşebilir ve sonuç olarak eksternal basıyla ana kanalların obstrüksiyonundan dolayı sarılığa sebep olabilir (29).

2.8.LABORATUAR

Perihiler ve distal KKA'lı hastaların çoğunda ilk tanı konduğunda total serum bilürubuni, alkalen fosfataz (ALP) ve gama glutamil transpeptidaz (GGT) belirgin olarak artmıştır. Alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) genellikle yalnızca minör derecede artmıştır (30). CA 19-9 düzeylerinde artma gözlenir ancak her vakada CA19-9 yüksekliği olmayabilir. CA19-9 nonspesifik bir testtir ve KKA dışında pankreas, kolon ve mide kanserlerinde, bakteriyel kolanjitte ve jinekolojik malignitelerde CA19-9'un artmış düzeyleri tespit edilebilir. Ana safra yolları ve hepatik kanalların uzun süreli obstrüksiyonu sonucu yağda eriyen vitaminlerin eksikliği ve uzamış protrombin zamanı gözlenebilir (31).

KKA için diagnostik bir tümör belirteci yoktur. Tümör belirteçlerinin tek başına sensitivite ve spesifitesi düşük ancak başka tanısal yöntemlerde desteklendiğinde yararlı olabilir. Ayrıca KKA gelişmesi için risk grubunda yer alan hastalarda tarama testi olarak faydalı olabilir.

2.11.Evreleme

Hasta için en uygun tedavi planı yalnızca anatomik yayılım, evre ve cerrahi risk belirlenerek yapılır. American Joint Commission on Cancer (AJCC) tarafından yapılan tümör, lenf nodu, metastaza (TNM) göre intrahepatik ve ekstrahepatik KKA'nın klasifikasyonu sırasıyla Tablo ? ve Tablo ?'te görölmektedir. Uygun teknikler kullanılarak tümörün safra yollarındaki yayılımı, bölgesel lenf nodlarının durumu, damarsal yapıların invazyonu ve metastazların varlığı ayrıntılı olarak değerlendirilmelidir.

Stage	Tümör	Node	Metastaz
I	T1	N0	M0

II	T2	N0	M0
IIIA	T3	N0	M0
IIIB	T4	N0	M0
IIIC	Herhangi bir T	N1	M0
IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo 2. İntrahepatik KKA'nın AJCC göre TNM sınıflaması.

Stage	Tümör	Node	Metastaz
0	T1S	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-3	N1	M0
III	T4	Herhangi bir N	M1
IV	Herangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo 3. Ekstrahepatik KKA'nın AJCC göre TNM sınıflaması.

2.12.RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME

Tanıdaki tümör markırları (CA 19–9, CEA gibi) KKA'lar için spesifik değildir. Bu nedenle de görüntüleme yöntemleri tümörün varlığı ve yaygınlığını saptama ile tedavinin planlanmasında en önemli tanısal araçlar haline gelmektedir.

Görüntülemede amaç, proksimal ve distal safra yollarında tümörsüz cerrahi sınırın sağlanmasına yardımcı olmaktır. Evrelemede tek başına hiçbir görüntüleme yöntemi yeterli değildir ve birden fazla yöntemin birlikte değerlendirilmesi gereklidir (32).

2.13.TEDAVİ

2.13.1.Cerrahi Rezeksiyon

Cerrahi rezeksiyon küratif tek tedavi olmasına rağmen hastaların büyük bir kısmı ileri yaş, komorbid durumların varlığı ve hastalığın yayılımından dolayı operasyona aday değildirler. Tümörün biliyer ağaç içinde yayılımı, vasküler invazyon, hepatik lobar atrofi ve metastatik hastalığın değerlendirilmesi cerrahi rezeksiyona uygunluğun araştırılmasında en önemli kriterlerdir.

2.13.2.Kemoterapi

KKA'larda lokal rekürrens ve metastaz sık gözlenir. Aynı zamanda tanı anında hastaların üçte ikisi cerrahi için uygun değildir. Bu hastalarda KT hastalığı kontrol altına almakta kullanılmıştır. Ancak KKA'lı hastalarda KT'nin sağ kalım süresi ve yaşamın kalitesi üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu gösterilememiştir. En sık kullanılan KT ajanlarından biri 5-Fluorouracil'dir (5-FU). Çalışmaların çoğunda 5-FU tek olarak ve kombinasyon tedavisi olarak kullanılmıştır. 5-FU tek kemoterapötik ajan olarak kullanıldığında parsiyel cevap oranı %10-20 arasında değişmektedir. Kombinasyon KT'sine parsiyel cevap oranı ise %20-40 arasındadır (33).

2.13.3.Radyoterapi

Cerrahi rezeksiyonu takiben lokal rekürrens sıktır. Birçok otör post-op RT'yi tavsiye etmektedir. KKA'da eksternal RT, intraoperatif RT, internal RT, radyoimmünoterapi ve yüklenmiş partikül radyasyonu içeren bir dizi metot kullanılabilir. RT'nin sağ kalım süresi üzerine etkisi gösterilememiştir. Ancak lokal hastalığın kontrolü üzerinde etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. RT ve KT kombinasyonunun tek tedavi rejimlerinden daha üstün olduğu düşünülse de bu durum açık olarak ortaya konmamıştır (29).

2.13.4.Palyatif Tedavi

Küratif tedavinin olanaksız olduğu hastalarda yaşam kalitesinin artırmak için uygun palyatif tedavi planlanmalıdır.

Palyatif tedavinin amaçları;

- Bilier obstrüksiyonun neden olduğu hepatik yetmezliğin önlenmesi
- Sarılığın düzeltilmesi
- Rekürren kolanjitin önlenmesi
- Gastrik çıkış obstrüksiyonunu düzeltmesi şeklinde sıralanabilir.

2.13.5.Biliyer Stentleme

Biliyer stentleme malign biliyer darlığı olan hastalarda sarılığın düzeltilmesinin etkili bir yoludur fakat sağ kalım üzerinde anlamlı etkiye sahip değildir. Stent sayısı ve stent tipi tümörün anotomik yerleşimine göre ve beklenen sağ kalım süresine göre bireyselleştirilmelidir. Stent yerleştirilirken endoskopik veya perkutan yol kullanılabilir.

2.3. PANKREAS ADENOKARSİNOMU

2.3.1. Epidemiyoloji

Pankreas adenokarsinomu (PAK) insidansı tüm kanserler arasında 11'inci sırada, PAK'a bağlı ölümler de tüm kansere bağlı ölümler arasında 5'inci sırada yer almaktadır (34). 2008 verilerine göre ABD'de PAK insidansı her 100.000 nüfusta 11,5 olarak bildirilmiştir. Türkiye'de hastalığın insidansı bilinmemektedir.

2.3.2. Etiyoloji

Cinsiyet: PAK'ının görülme sıklığı cinsiyete göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak erkeklerde biraz daha sık görülmektedir (34).

Yaş: PAK oranı yaşla birlikte hızla artmaktadır. PAK ağırlıklı yaşlı bireylerin hastalığıdır (35).

İrk: Farklı ırklarda PAK moleküler seviyede farklılıklar göstermektedir. ABD'de K-ras gen mutasyonu siyah ırk mensuplarında beyazlara göre daha fazladır (36).

Edinilmiş Risk Faktörleri: PAK gelişiminde sigara önemli bir risk faktörüdür. Sigara içenlerde PAK görülme oranı içmeyenlere göre iki kat daha fazladır (37). Kahve tüketimi ile PAK görülme sıklığı arasında ilişki olduğunu gösteren araştırmalardan birinde haftalık 17,5 fincandan fazla kahve tüketenlerin 7 fincandan az tüketenlere göre PAK'ne yakalanma riskinin 2 kez fazla olduğu belirtilmiştir (37). PAK'ı ile çay tüketimi arasında ilişki bulunamamıştır (37).

PAK gelişiminde rol alan diğer risk faktörleri yüksek oranda yağ ve kırmızı et içeren diyet, düşük serum folat düzeyi, obezite, uzun süre olan diyabet ve kronik pankreatittir (38). Alkol tüketimi ve kronik pankreatit ilişkisi kanıtlanmıştır. Ancak; alkol tüketiminin PAK insidansında artışa neden olduğu gösterilememiştir (37).

Meslek: Klorlu hidrokarbonlar, formaldehid, pestisidler, organik kloridler gibi karsinojen maddeler kullanılan boya sanayi, ağır metal sanayi, tarım ve tekstil sanayisi'nde çalışanlarda PAK riski artmaktadır (39).

Öncül hastalıklar: Kronik pankreatitin tüm tipleri kısmi de olsa PAK geliştirme potansiyeli taşırlar. (40).

Diyabetli hastalarda PAK gelişmesi normal popülasyona göre 2 kat fazladır (41). Yalnız, diyabet ve PAK arasındaki ilişkinin patofizyolojik mekanizmasını aydınlatılamamıştır.

Genetik etkenler: PAK olan hastaların %5-10'unda genetik bozukluklar vardır (41). BRCA2 gen mutasyonunun PAK ile sıkı ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Sporadik

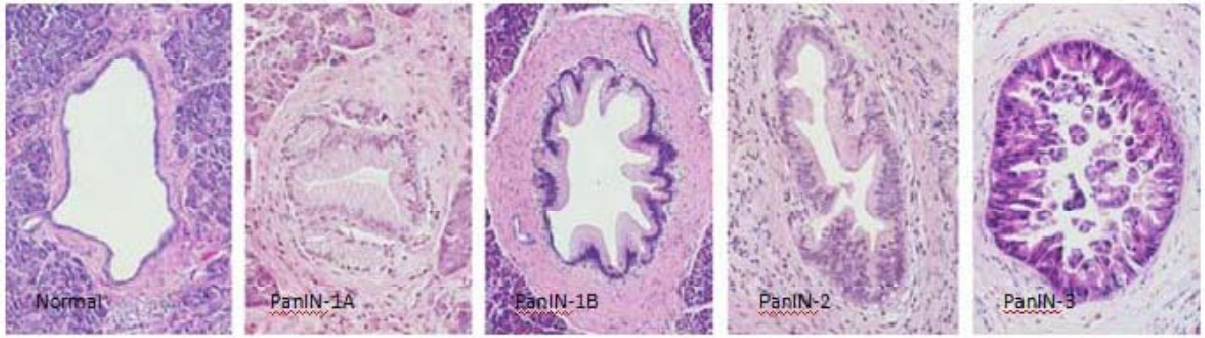
PAK olan hastaların % 7-10'unda ve ailevi PAK olan hastaların %15-20'sinde BRCA2 gen mutasyonu görülmektedir (42).

2.3.3. Patofizyoloji

PAK'inde orijin hücre tipi tam olarak karakterize edilememiştir. Pankreatik duktal adenokarsinomda asiner, duktal ve adacık hücrelerden her birinin belirteci eksprese edilebilir. Bunun dışında mide, duodenum ve kolon epiteli belirteçleri de bulunabilir. PAK'inin öncü lezyonları hastalığın patofizyolojisinde önemli yer tutmaktadır. Bunlar pankreatik intraepitelyal neoplaziler (PanIN), intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar (IPMN) ve müsinöz kistik neoplazmlardır.

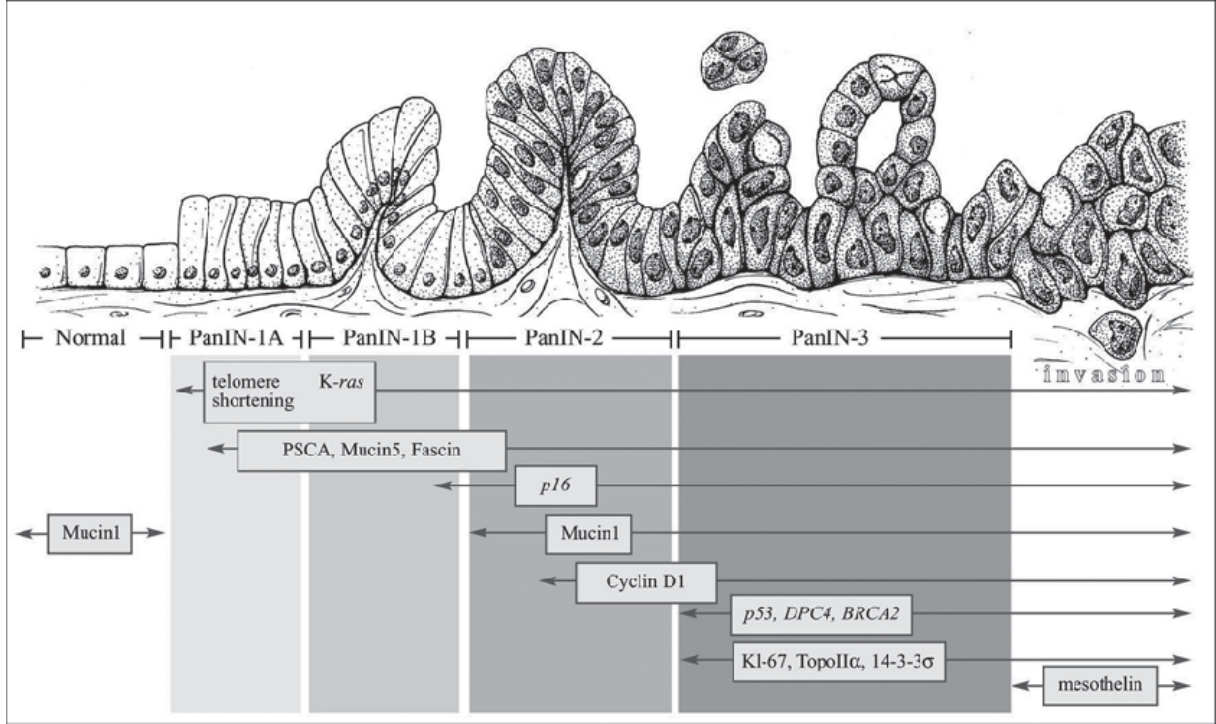
Pankreatik intraepitelyal neoplaziler histolojik gelişimine göre 4 derecede incelenir: PanIN-1'de nukleer atipi ve polarite kaybı yoktur. PanIN-1A'da lezyon yassıdır, PanIN-1B'de ise papiller projeksiyon gözlenir. PanIN-2'de seyrek mitoz, nukleer atipi ve mikropapillarite vardır. Karsinoma in situ olarak isimlendirilen PanIN-3'de ise geniş polarite kaybı, nukleer atipi ve yaygın mitoz alanları gözlemlenmektedir (Şekil ?).

ŞEKİL?. PanIN lezyonlar: progresif histolojik değişiklikler. http://pathology.jhu.edu/pancreas_panin/ den alınmıştır.



Normal duktal epitelin değişimini başlatan ve invazif karsinoma kadar sürdüren faktörler genetik değişiklikler ve inflamatuvar etkenler olarak ikiye ayrılır.

Tümör supressor genlerde, onkogenler ve genom koruyucu genlerde olan bozukluklar pankreas kanseri progresyonunda esas olan genetik değişikliklerdir. Şekil 3'de PAK gelişimi aşamalarında rol alan genetik değişiklikler verilmiştir.



ŞEKİL 7. Pankreas duktal adenokarsinom gelişim modeli. Histolojik progresyon spesifik genetik bozuklukların birikimi ile ilişkilidir. (Maitra ve diğerleri. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. Mod Pathol 2003; 16: 902–912.’dan alınmıştır.)

İnflamasyon PAK gelişiminde rolü olan diğer anahtar mekanizmadır. Kronik pankreatitin hem sporadik, hem de herediter formlarının artmış PAK riski ile ilişkili olduğu bilinmektedir. İnflamasyonla birlikte görülen artmış gen zedelenmeleri ve sellüler proliferasyon pankreas hücrelerinin malign transformasyonuna sebep olur. Sitokinler, reaktif oksijen radikalleri ve inflamatuvar mediatörler (NF- κ B ve COX-2) hücre siklusünü artırır, tümör supressor gen fonksiyon bozukluğu ve onkojen ekspresyonunu tetikleyerek pankreas kanseri oluşumunu başlatır.

2.3.4. Histopatoloji

Pankreas duktal adenokanseri tüm pankreas kanserlerinin %80’ini oluşturur. Gros olarak beyaz–sarı renkte, sert, düzensiz kitle şeklindedir. Kitle olguların %60’ında pankreas başına, %15’inde gövdesine ve kuyruğuna, %20’sinde de diffüz şekilde tüm beze yerleşmiştir.

Mikroskopik olarak pankreas duktal adenokarsinomu müsin içeren kısa kolumnar hücrelerden oluşmuştur. Kanser etrafında belirgin desmoplastik reaksiyon olması tipiktir. Nukleuslar pleomorfizm, hiperkromazi, polarite kaybı ve nukleollerde belirginleşme sergilerler. Tümör basısı ile küçük duktusların obstruksiyonuna bağlı olarak oluşan, tümörü çevrelemiş kronik pankreatit halosu karakteristik bir bulgudur.

Duktal adenokarsinomlar sık oranda vasküler, lenfatik ve perinöral doku invazyonu göstermektedir (43).

2.3.5. Kliniği

PAK genellikle sinsi seyirlidir ve uzun süre klinik bulgu vermeden büyüyebilir. PAK'e bağlı bulgular tümörün yerleşim yerine göre değişkenlik gösterir. Pankreas başı veya unsinat çıkıntı yerleşimli tümörlerde pankreatik kanal, safra kanalı ve duodenal tıkanıklık sonucu pankreatit atakları, sarılık, bulantı, kusma, steatore, kilo kaybı gibi belirtiler oluşabilir. Hastalığın retroperitoneal ilerlemesi ile birlikte peripankreatik sinir ağının tutulumuna bağlı olarak üst karın ve sırt ağrısı; peritoneal yayılım veya portal ven tutulumuna bağlı olarak ise asit ortaya çıkabilir. Pankreas boynu, gövdesi ve kuyruğuna yerleşmiş olan tümörlere bağlı tıkanma sarılığı ve mide çıkım obstruksiyonu bulguları olmaz. Bu hastalarda görülen belirtiler kilo kaybı ve tümörün pankreas boyunca yayılımı ile birlikte artan özelliksiz karın ağrılarıdır. Bazı olgularda yeni ortaya çıkan diyabetes mellitus okkült PAK'inin ilk belirtisi olabilir. PAK'inde tümöre bağlı hiperkoagulabilite sonucu gezici tromboflebitler görülebilir. Tümörün yerleşim yerine göre pankreas kanserli hastalarda görülen klinik bulgular Tablo3'te verilmiştir.

	Pankreas başı kanserinde	Pankreas gövde/kuyruk kanserinde
Kilo kaybı	%92	%100
Ağrı	%72	%87
Sarılık	%82	%7
İdrarda koyulaşma	%63	%5
Gaita renginde açılma	%64	%6
İştahsızlık	%62	%33
Bulantı	%37	%45
Halsizlik	%35	%43
Kusma	%37	%37
Kaşıntı	%24	%4

Tablo 3. Pankreas kanserinde klinik belirti ve bulgular.

2.3.6. Evreleme

Hastalığın evresi, prognoz tayininde, patolojik parametrelerden daha önemli bir belirteçtir. American Joint Comission on Cancer/Union International Centre le Cancer) TNM sistemi gibi çeşitli evreleme metodları bildirilmiştir.

TNM sınıflaması;

- Tis: Karsinoma in situ

- T1: Tümör pankreasa sınırlı, <2cm
- T2: Tümör pankreasa sınırlı,>2cm
- T3: Pankreası aşmış ama çölyak plexusu ve superior mezenterik arter sağlam
- T4: Tümör çölyak plexus ve/veya superior mezenterik arteri tutmuş
Lenf nodu;
- N0: Nod tutulumu yok
- N1: Bölgesel lenf nodu metastazı var.

	Tümör	Node	Metastaz
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-T3	N1	M0
III	T4	Herhangi bir N	M0
IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo.__. PAK evrelemesi

2.3.7. Tedavi

2.3.7.1. Cerrahi Tedavi

Günümüzde PAK'lerinin cerrahi tedavisinde Kausch-Whipple ameliyatı, pilor koruyucu pankreatiko-duodenektomi ve regional pankreatiko-duodenektomi ameliyatları kullanılmaktadır. Günümüzde de Whipple prosedürü pankreas başı adenokarsinomu tedavisinde birçok cerrahın tercih ettiği ameliyattır. Pankreas kanserinde lenfadenektominin yeri tartışmalıdır.

2.3.7.2. Kemoradyoterapi

PAK tedavisi zor ve mortalite oranları insidansına eşit olan bir hastalıktır. Hastaların %90'ı tanı konduğunda unrezektabl ve bunların da %40- 50'si lokal ileri evrede oldukları belirlenmiş (44) ve ortalama yaşam süresi 6-10 ay olup, metastatik hastalık için belirtilen yaşam süresi yaklaşık 3-6 aydır (45).Gross olarak rezektable

hastaların % 25-60 ' ının rezeksiyon sınırları mikroskopik olarak pozitiftir. Bu hastaların ortalama yaşam süresi 1 yıldan az olup, rezeke edilemeyen ve palyatif KRT tedavisi uygulanan lokal ileri evre hastalarla aynıdır. Yalnız cerrahi uygulanan PAK'lu hastaların sonuçları cerrahi sınırların pozitif ve negatif olmasından bağımsız, kötü olarak kalmakta ve %50-80 lokal rekurrens oranları, %40 peritoneal yayılım ve %60-90 karaciğer metastaz oranları bildirilmektedir (46). Bu yüzden PAK tedavisinde adjuvan ve neoadjuvan tedavi modaliteleri uygulanmaya başlanmış ve yeni ajanlar, protokoller geliştirilmekte devam etmektedir.

Palyatif tedavi kapsamında tek veya diğer ajanlarla kombine olarak florpirimidin, gemesitabin KT'leri ve KRT kullanılmaktadır (47). Gemesitabinin tek başına ve diğer kemoterapötiklerle kombine kullanılmasını karşılaştıran çalışmalarda kombine tedavi ile tümörün progressiyon zamanı/progressiyonsuz yaşam süresi açısından küçük, ama anlamlı üstünlük olduğu anlaşılmıştır (48).

5FU'in kombine kullanımı tek başına kullanımı ile karşılaştırıldığında tümörün progressiyon zamanında ve genel yaşam süresinde her hangi üstünlük saptanmamıştır (49).

PAK tedavisinde kullanılan intraoperatif RT (İORT) normal dokulara etki etmemekle, yukarı karın bölgesinin radyasyonu sonucu toksik etkilere sebep olan eksternal RT'den (EBRT) üstündür (50). İORT tek fraksiyonla yüksek dozda RT kullanımına izin vermektedir. Yalnız yapılan çalışmalar İORT'nin lokal kontrol açısından üstünlük sağladığını gösterse de, genel yaşama her hangi bir etkisinin olmadığını tespit etmişler (51).

2.3.8. Prognoz

PAK tedavisinde cerrahi önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle prognoz cerrahi uygulanan ve uygulanmayan hastalarda olmak üzere iki grupta incelenebilir. Yalnız %20'sine yapılabilmesine rağmen, cerrahi rezeksiyon PAK'lu hastaların yaşam sonuçlarını iyileştirmektedir. Tedavideki başarısızlıkların büyük çoğunluğu genellikle cerrahiden 1-2 yıl sonra ortaya çıkan lokal rekurrens, karaciğer metastazları, veya her ikisinin oluşması ile ilgilidir.

Postoperatif mortalite oranlarının hayli azaltılmış olması ve komplet rezeksiyon oranlarında belirgin artış olmasına karşılık, halen kütatif rezeksiyon sonrası 5 yıllık yaşam süresi %25 in altındadır(52,53).

PAK'unun prognostik belirteçlerini araştıran çalışmalara baktığımızda bazı farklılıklarla birlikte, orta ve/veya kötü tümör differansasyonu, pozitif rezeksiyon

sınırları, tümör boyutu bağımsız negatif faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır (54). Aynı zamanda lenf nodu metastazı ve total lenf nodu metastatik lenf nodu oranı da araştırmacılar tarafından prognostik açıdan anlamlı bulunan belirteçlerdir. (55).

2.7. RHO-KİNAZ

2.7.1. Rho/Rho-Kinaz Yolağı

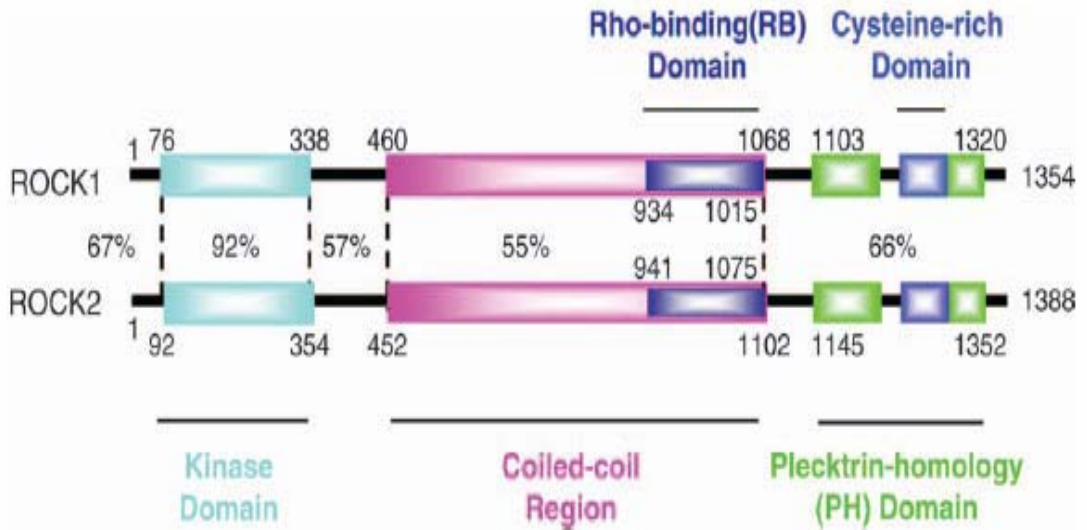
Rho, sitoplazmada bulunan guanozin difosfat/guanozin trifosfat (GDP/GTP)-bağlayıcı bir proteindir ve guanozin trifosfataz (GTPaz) aktivitesi içerir (56). Rho proteinleri GDP-bağlı iken inaktif haldedirler. G proteini ile ilişkili reseptörleri aktive eden çeşitli agonistlere yanıt olarak Rho aktive olmaktadır Rho aktivitesini kontrol eden başlıca üç protein bulunur (57):

- GTPaz aktive edici proteinler (GAP): İntrinsik GTPaz aktivitesini artırarak Rho'yu inaktif ederler.
- GTPaz disosiyasyon inhibitörleri (GDI): Rho GTPaz'ların nükleotid disosiyasyonunu ve membrana bağlanmasını önleyerek Rho aktivasyonunu inhibe eder.
- Rho-spesifik guanin nükleotid değiş-tokuş faktörleri (GEF): GDP'nin disosiyasyonunu hızlandırarak Rho'yu aktive eder.

Rho, başlıca aktin hücre iskeletinin organizasyonunun düzenlenmesinde, hücre göçü, hücre adezyonu ve sitokinez gibi çok çeşitli hücresel olayın kontrolünde rol oynar. Rho ailesinin üyelerinin, aktinin yeniden şekillenmesinde ve farklı yönlerinin düzenlenmesindeki rolü, ilk olarak fibroblast büyüme faktörü uyarısına yanıt çalışmaları ile açığa çıkarılmıştır (58). Büyüme faktörleri uyarımı sonucunda oluşan hücre iskeleti değişiklikleri arasında yüzey uzantılarının (filopodlar, lamellipodlar ve zar kıvrımları), fokal adezyonların ve stres liflerinin oluşumu yer alır. Daha sonraki çalışmalar, Rho ailesi üyelerinin fibroblastlarla sınırlı kalmadığını, bütün ökaryot hücre tiplerinde aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde benzer rol aldıklarını göstermiştir (59). Rho, sinir sistemi gelişimi sırasındaki akson uzama ve kısaltmalarını düzenler, düz kas hücrelerinin kasılmasının düzenlenmesine katılır, epitel hücrelerinde kaderinler ile aktin hücre iskeleti bağlantısını içeren adherens bağlantıların oluşumunu düzenler. Bu yüzden Rho ailesi üyeleri, hücre dışı sinyaller ile hücre şekli, hareketi ve değişikliklerini ilişkilendiren aktin hücre iskeletinin genel düzenleyicileri olarak görev yaparlar (60). Rho proteinlerinin hücre iskeleti değişikliklerinin düzenlenmesindeki anahtar hedeflerden birisi, ROCK olarak adlandırılan enzimdir. Hücreye Rho'yu aktive eden uyarılar geldiğinde veya Rho'nun

aşırı ekspresyonu olduğunda ROCK sitoplazmadan membrana göç eder (61). Rho proteini GTP ile bağlandıktan sonra aktif hale gelir ve ROCK üzerindeki Rho bağlayan bölgeye bağlanarak enzimi aktive eder. RhoA'dan bağımsız olarak arakidonik asid ve sfingosinfosforilkolin, Rho-kinaza bağlanarak enzimi stimüle ederler (62). Statinler ise RhoA düzeylerini azaltarak Rho-kinaz aktivitesini inhibe ederler.

Rho-kinaz bir serin/treonin protein kinazdır (56). Rho-kinaz enziminin ROCK1 (ROCK I, p160ROCK, ROCK β , ROK β) ve ROCK2 (ROCK II, ROCK α , ROK α) olan iki izoformu vardır (64). Her iki enzim tüm hücrelerde eksprese edilir. ROCK2 mRNA özellikle kas ve beyin hücrelerinde daha fazla eksprese edilmektedir (65). İnsan ROCK1 geni 18. kromozomda (18q11.1) ve ROCK2 geni ise 2. kromozomda (2p24) yerleşiktir (Şekil ?).



Şekil ?. Rho-kinaz izoformlarının yapısı. “Coiled-coil” bölgesi Rho-bağlayıcı domain içerir. Amino asit dizilişinde ROCK1 ve ROCK2 toplam %65 homoloji içerirken, kinaz domain’lerinde %92 homoloji içerir (66).

Rho ile etkileşen ve aktive olan Rho-kinaz, düz kas kasılması, hücre büyümesi, adezyonu, migrasyonu, motilitesi, gen ekspresyonu ve apoptozu da içeren farklı hücresel fonksiyonlara aracılık eder (67). Rho-kinaz, addusin, ezrin-radixin-moesin (ERM) proteinlerini, LIM kinaz, miyozin hafif zincir fosfataz (MLCP) ve Na/H değiştirici (exchanger) (NHE) 1’in serin-treonin fosforilasyonu ile hücre kontraksiyonunu düzenler (67).

ROCK aktivasyonu, miyozin II hafif zincirinin aktivasyonunu iki mekanizma ile artırır: ROCK miyozin hafif zincirini direkt olarak fosforile etmekle kalmaz, aynı

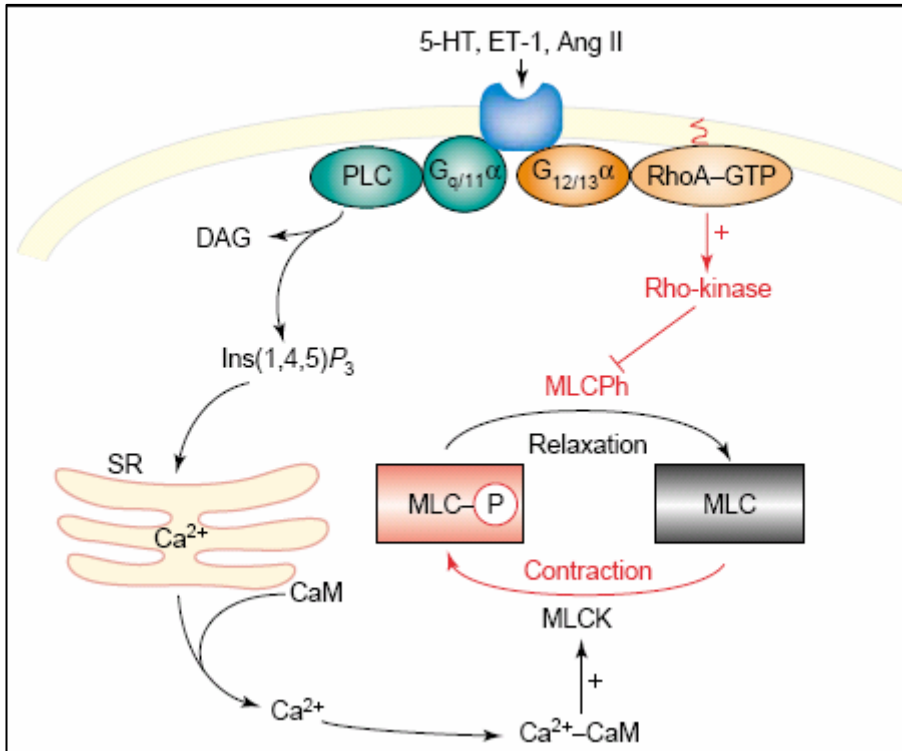
zamanda miyozin hafif zincir fosfatazlarını da fosforilleyerek inhibe eder. Sonuçta miyozin hafif zincir fosforilasyonundaki artış, miyozini aktive eder ve aktin miyozin flamanlarının yapılanmasına yol açar (68). Bu da stres liflerinin, fokal adezyonların, adherens bağlantıların ve sitokinezin oluşumu gibi hücre iskeleti değişiklikleri ile sonuçlanır.

2.7.2. Rho-kinaz inhibitörleri

Rho-kinaz inhibitörleri arasında fasudil, hidroksifasudil, Y-27632, H-1152P, Wf-536 gibi maddeler bulunur. Hidroksifasudil, Rho-kinazın selektif bir inhibitörü olup, fasudilin aktif bir metabolitidir (69). Nonselektif Rho-kinaz inhibitörleri yüksek konsantrasyonlarda protein kinaz A ve protein kinaz C gibi diğer kinazları da inhibe edebilirler (67).

2.7.3. Kardiyovasküler etkileri

Rho/Rho-kinaz yolağının kardiyovasküler sistem fizyolojisi ve patofizyolojisinde yeri olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (70). Vazospastik anjina, iskemik inme ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda Rho-kinazın önemli rol oynadığı gösterilmiştir (67). Rho-kinaz, miyozin fosfataz inaktivasyonu ve direkt miyozin hafif zincir fosforilasyonu ile kalsiyumdan bağımsız olarak düz kas kasılmasını artırır (71)(Şekil?).



Şekil 2. Vasküler düz kas kasılmasının mekanizması (72).

Rho-kinaz, vasküler düz kas hücrelerinin adhezyonu, migrasyonu ve proliferasyonunda önemli rol oynar (70). Aterosklerozun patogeneğinde de yer aldığı gösterilmiştir (73). Rho-kinazın kardiyovasküler yeniden yapılanma (remodeling) patogeneğinde rolü olduğu ortaya konmuştur (74). Rho-kinaz inhibisyonu; vazodilatasyona (75), spazmolitik etkilere (76), penis ereksiyonuna (77), nörotransmitter salınımının inhibisyonuna (78) sebep olur. Fasudil ile doza bağımlı uzun süreli tedavi, allogreftte bağı kardiyak vaskülopatinin oluşumunu ve miyokardiyal iskemi sonrasında ventriküldeki yeniden yapılanmayı (remodeling) baskılar, bu etki Rho-kinaz aktivitesinin azalmasıyla ilişkilidir (79). Rho-kinaz inhibisyonu vasküler ve solunum düz kas hücre migrasyonunu da bloke etmektedir (80).

Yapılan çalışmalar, Rho-kinazın hipertansiyon ve koroner arter spazmları gibi hastalık etyopatogeneğinde rolü olduğunu göstermiştir (81,82). Rho/Rho-kinaz yolunun önemi, pulmoner vazokonstrüksiyonda (83), sıçanlardaki mineralokortikoid-kaynaklı hipertansiyonda (84), artan vasküler reaktivitede ve serebral vazospazmda gösterilmiştir (85). Rho-kinaz proteini, arterlerde sentezlenir ve agonist kaynaklı düz kas kontraksiyonunu düzenler ve Rho-kinaz inhibitörünün vazodilatör etkisi endotel tabakasından bağımsızdır. Bu nedenle Rho/Rho-kinaz sinyali vasküler direncin kontrolünde rol oynayabilir ve Rho-kinaz inhibitörleri, hipertansiyon, vazospazm ve ateroskleroz gibi bazı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde etkili olabilir. Rho-kinaz, düz kasın depolarizasyonu sırasında aktive olur ve MLCP aktivitesinin inhibisyonuna yol açar (86).

Rho-kinaz makrofaj fagositik aktivitesini ve endotel hücre permeabilitesini de düzenler (67). Fasudilin ET-1 veya vazopressin ile oluşturulan vazospastik iskemide de miyokardiyal hasarı önlediği gösterilmiştir (87). İskemi reperfüzyonunun, kalpte RhoA yapımını artırdığı ve miyokardiyal Rho-kinaz aktivitesini yükselttiği saptanmıştır (88). Rho-kinaz aktivasyonu, muhtemelen Bax upregülasyonu ve apoptozisi indükleyerek iskemi-reperfüzyonla oluşan hücre ölümüne katkıda bulunur (89).

RhoA/Rho-kinaz yolağının inhibisyonu kardiyovasküler hastalıklarda yararlı olduğu ve potansiyel terapötik hedef olabileceğine ilişkin kanıtlar artmaktadır. RhoA/Rho-kinaz yolağının anjiogenez, ateroskleroz, serebral ve koroner vazospazm, serebral iskemi, erektil disfonksiyon, glomeruloskleroz, hipertansiyon, miyokardiyal hipertrofi, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı, neointima oluşumu, pulmoner

hipertansiyon, astım, glokom, osteoporoz, Alzheimer hastalığı, vasküler remodeling, diabetes mellitus ve kanserde katkısının olduğu gösterilmiştir (67).

2.8. RHO-KİNAZ ve KANSER

RhoA/Rho-kinaz yolağı, hücre adezyonu, migrasyonu, şekil değişimleri ve sitokinezde etkili olmaktadır (71,90). Bu etkileri ile kanser hücrelerinin invazyon ve metastatik aktivitelerini düzenlemektedir. Rho-kinaz inhibitörleri ile bu hücre fonksiyonların azaltıldığı ve kanser hücrelerinde metastazın baskılandığı gösterilmiştir (91,92). Onkogenik değişim, hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybı ve hücrenin morfolojik değişiklikleri ile karakterizedir. Hücre morfolojik değişiklikleri aktin stres lifleri vasıtası ile sağlanmaktadır. Hücrelerin onkolojik değişikliğe uğramasında Rho proteinleri ve dolayısı ile Rho-kinazın aktivasyonu önemli rol oynamaktadır (93). Glioma hücrelerinde Rho-kinaz inhibisyonu apoptozisi indüklemektedir (94). Metastatik özofagial kanser hücre kültüründe invazyon ve mobilitenin Rho-kinaz aracılı arttığı ve Y-27632 ile inhibe edildiği gösterilmiştir (95). Sıçanlarda karaciğer transplantasyonu sonrasında hepatoselüler karsinom modelinde, Y-27632 kanser hücre migrasyonunu baskılamış ve yaşam süresini uzatmıştır (96). Testiküler tümörlerde de RhoA ve Rho-kinaz mRNA ekspresyonu artmaktadır (97). B16 melanoma hücrelerinde Rho-kinaz inhibitörü invazyonu baskılamış ve farelerde yapılan in vivo denemelerde akciğer metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (98). Bu çalışmada, Rho-kinaz inhibitörünün metastaz inhibisyonunda paklitakselden daha etkili olduğu ve kombine kullanımında ise sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur. Farelere oral uygulanan Rho-kinaz inhibitörü tümör hücrelerinin akciğere metastazını ve tümör hücresi tarafından indüklenen anjiogenetik yanıtı inhibe etmiştir (99). Rho-kinaz inhibitörü tümör hücresi invazyon ve migrasyonunu anlamlı olarak inhibe etmiştir (99). İnsan over kanser hücrelerinde ROCK1 migrasyon ve invazyonunu artırırken antisens oligodeoksinükleotid bu hücrelerin motilitesini ve invaziv özelliğini inhibe etmiştir (100).

Trombosit kökenli endotel hücre büyüme faktörü (PD-EDGF) uygulanan kültür hücrelerinde ROCK1'in aşırı ekspresyonuna ve kanser hücresi motilitesinin artmasına neden olduğu bulunmuştur (101). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile indüklenen endotel hücre migrasyon ve anjiogeneze Rho/Rho-kinaz yolağının aktive olduğu gösterilmiştir (102). Ayrıca, hipoksi ile indüklenen anjiogeneze Rho-kinaz aracılık eder ve Rho-kinaz inhibisyonu anjiogenezi inhibe eder (103,104). Kolon kanseri hücrelerinde hipoksi ile VEGF indüksiyonunun

fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Rho/ROCK ve c-Myc aracılıklı olduğu gösterilmiştir (105).

Meme kanserinin ilerlemesinde tümör metastazı ve invazyonu önemli rol almaktadır. Metastaz hücre iskeletinin, hücre-hücre ve hücre matriks bağlantılarının yeniden yapılandırılması ile tümör kitlesinden hücrelerin ayrılması, çevre dokuları istila ederek vücuda yayılması sürecidir. Metastazda görülen bu olaylarda Rho GTPaz ailesinin rolü vardır (106). Tümörlerin invaziv ve metastatik forma dönüşmesi için tümör hücrelerinin Rho GTPazları ile düzenlenen ciddi morfolojik değişiklikler geçirmesi gereklidir. Son yıllarda yapılan *in vitro* çalışmalarda meme kanseri agresyonu ile Rho ekspresyonu arasında ilişki olabileceği gösterilmiştir. Meme tümörlerinde Rho proteinleri (RhoA, B, C) aşırı eksprese olmaktadır (107). RhoA protein düzeyleri ile artan meme tümör gradı arasında korelasyon saptanmıştır (108). RhoC ekspresyonu ile metastaz arasında bağlantı olduğu saptanmıştır ve RhoC'nin metastatik özelliği olan invaziv meme kanserlerinde bir tanı belirteci olarak kullanılabileceği önerilmiştir (109,110). Meme kanseri migrasyon ve metastazında Rho/Rho-kinaz yolağı gereklidir (111).

Ayrıca Rho-kinaz inhibitörlerinin hayvan modelinde meme tümörü gelişimini inhibe ettiği de gösterilmiştir (92). Rho-kinaz inhibitörleri kullanılarak kanser hücrelerinde metastatik özelliklerin azaltıldığı *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (96).

Metastazik memeli karsinom hücreleriyle yapılan bir çalışma *in vivo* ortamdaki herhangi bir uzatılmış çıkıntıya sahip olmayan yuvarlatılmış hücrelerin artan lineer translasyonel hareketine dikkat çekmektedir (112). Bu hücreler metastazik olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında artan seviyelerde ROCKII eksprese etmişlerdir (113). Bununla tutarlı olarak, diğer çalışmalar ROCK'un inhibisyonunun *in vivo* ortamdaki tümör hücrelerinin invazif davranışını muhtemelen yuvarlatılmış tümör hücresi hareketindeki bir azalma aracılığıyla azalttığını göstermişlerdir (114,115). Bu yüzden, Rho yada ROCK işlevini hedef alan terapilerin yuvarlatılmış hareketliliği kullanan tümör hücrelerinin invazif davranışını engellemede en etkili yöntem olması olasıdır.

2.9. RHO-KİNAZ GEN POLİMORFİZMİ

Rho kinaz gen polimorfizmi ile ilgili şimdiye kadar yayınlanmış araştırmaların çoğu hipertansiyon ile ilişkilidir. Kanser konusunda sadece 2008 yılında Camcı ve arkadaşlarının yaptığı meme kanserinde Rho-kinaz gen polimorfizmi ile ilgili bir çalışma vardır (116).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin toplanması

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gaziantep Onkoloji Hastanesi, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda safra kesesi, safra yolları ve pankreas kanseri tanısıyla takip edilen hastalar ve sağlıklı gönüllü kişiler bilgilendirilmiş onam formları okutulup imzalatıldıktan sonra çalışmaya alındı. Bu araştırmada, metastaz gelişmiş pankreas kanseri olan hastalar (metastatik grup, n=78), metastaz gelişmemiş pankreas kanseri hastaları (non-metastatik grup, n=16), metastaz gelişmiş safra kesesi ve safra yolları kanseri olan hastalar (metastatik grup, n= 76), metastaz gelişmemiş safra kesesi ve safra yolları kanseri olan hastalar (non-metastatik grup, n= 23) ve herhangi bir hastalığı olmayan, kanser geçmişi olmayan, ilaç kullanmayan, sigara içmeyen ve alkol kullanmayan sağlıklı gönüllüler (kontrol grubu, n=162) çalışmaya alındı. Kanserli hastaların tamamının tanıları patolojik inceleme sonucu konmuştu.

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu _____ tarih ve ____ sayılı kararı ile onay almıştır.

3.2. Klinik tanı ve veri toplanması için yapılan işlemler

Hastalar hazırlanmış standart bir protokole uygun olarak değerlendirildi ve tetkikleri yapıldı. Değerlendirmeye alınan tüm hastaların anamnez, fizik muayene, demografik özellikleri, tedavi öyküleri, görüntüleme yöntemleri, tümör belirteçleri ve rutin laboratuvar özellikleri kaydedildi. Aile anamnezi sorgulandı.

Araştırmanın moleküler analizleri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Hastanesi, Moleküler Onkoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Her bireyden 5 ml periferik kan alınarak EDTA'lı tüplere konuldu ve DNA izolasyonu yapıldı.

3.3. DNA izolasyonu

5 ml EDTA'lı kan üzerine 5 ml (kendi hacmi kadar) distile soğuk su eklenerek yavaşça 5 dk alt-üst edildi. 4000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilip, santrifüj sonunda süpernatant döküldü. Çökeltinin hacmi kadar tekrar distile soğuk su eklendi ve 4000 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek aynı işlem üç kez tekrarlandı. Süpernatant atılıp, pellete 3 ml üre içeren parçalama çözeltisi eklendi (Üre Lysis Buffer). Pellet tamamen çözüldükten sonra 400 µl %20'lik SDS (sodium dodecyl sulphate) eklendi. 100 µl 10mg/ml proteinaz K eklenip, 1 gece için 37 °C'deki hibridizasyon fırınında bekletildi. Ertesi gün hibridizasyon fırınından alınan örneklerle

2 ml 5M NaCl eklendi. Üzerlerine 14 ml kloroform konularak 4000 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan üç ayrı fazın en üst fazı temiz bir tüpe alınarak hacmi kadar soğuk etil alkol eklendi. Etil alkolde yumak şeklinde oluşumu gözlenen DNA'lar, içinde 1ml. %70'lik etil alkol bulunan 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Tüpler 10 dk. 13000 rpm'de santrifüj edilerek DNA'ların tüpün dibine yapışması sağlandı. Üzerindeki alkol dökülerek tekrar 1ml. %70'lik etil alkol eklendi. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Yıkama işleminden sonra alkol tamamen dökülerek tüpler ağzı açık olarak vakumlu kurutucuya yerleştirildi ve bir saat kurutuldu. Kuruyan DNA'ların üzerine miktarına göre (400 µl) dH₂O eklenerek +4 derecede bir gece çözünmeye bırakıldı. Daha sonra derin dondurucuya kaldırıldı.

3.4. Real Time PCR

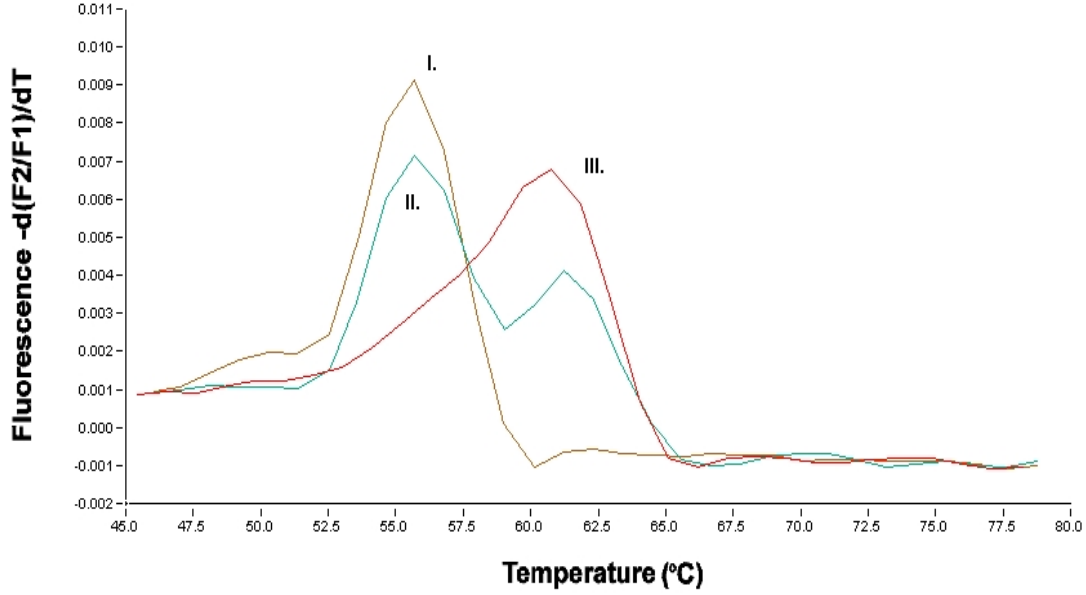
ROCK II geni Ekzon 10 (rs9808232) Thr431Asn polimorfizmi için real-time PCR yöntemi ile kullanıldı. Bu bölge ile ilgili primer ve prob dizileri tablo1'de verilmiştir.

Tablo--- ROCK2 geni ekzon 10 SNP bölgesi ve primer prob dizileri(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=6093)' den alınmıştır.

Bölge	Reference No.	PCR Primers and Hybridization Probes
Exon 10	rs9808232	Forward 5'-ATgAAACTAAAATAACTACAgCAG Reverse 5'-AACTTgAATAAAACAgCACATAg Probe1 5'-TTgTATggAATCATTTTCTCTACAAgAT-FL Probe25'-LC640AgAgTCACTTAATAATCTACATggAgggg- PH

PCR karışımı için 1µL genomik DNA, 5 µM primer ve prop, 1 µL LightCycler FastStart DNA Master HybProbe kit (Roche), 2.5 mM MgCl₂ kullanılarak hazırlandı. Karışım kapiller tüplere aktarılarak reaksiyona geçildi. 95°C'de 10 dakika denatürasyon yapıldı. Daha sonra 50 döngü amplifikasyon için denatürasyon (95°C 10 s), anealing (50°C 10 s), extansiyon (72°C 15 s) yapıldı. Amplifikasyonun

tamamlanmasından sonra, sıcaklığın saniyede 0.2°C artırılarak 40°C'den 85°C'ye yükseltilmesiyle erime eğrileri oluşturuldu. Floresan/sıcaklık negatif türevinin sıcaklığa göre çizilmesiyle de, erime eğrileri, erime tepelerine dönüştürüldü.



Şekil-1. ROCK2 enzimini kodlayan gen bölgeleri üzerindeki Thr431Asn (C125592A) erime eğrisi analiz sonuçları. Erime noktası (T_m) C için 55 °C, A için 61 °C bulunmuştur. I.Homozigot doğal tip (Thr/Thr), II. Heterozigot (Thr/Asn), III. Homozigot mutant (Asn/Asn)

3.5. İstatistiksel analiz

Hasta-kontrol grubu için istatistiksel analizler GraphPad Instat yazılımı kullanılarak yürütüldü. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Genotip dağılımı ve allel sıklıkları gruplar arasında χ^2 ve fisherman testleri kullanılarak karşılaştırıldı.

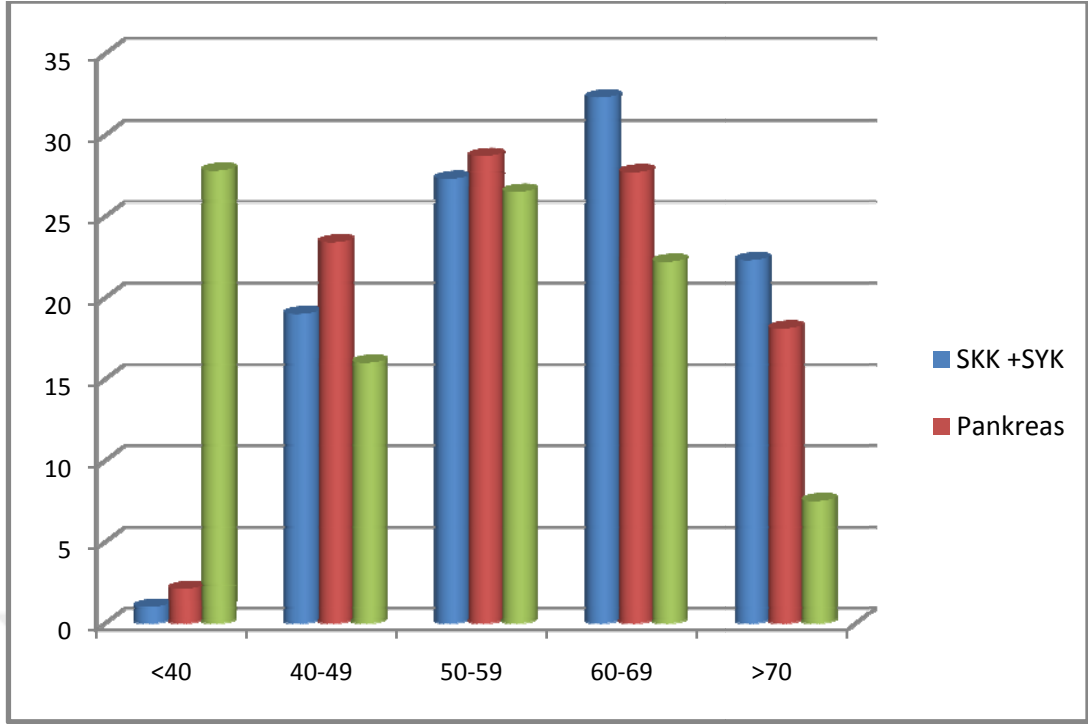
4. BULGULAR

Çalışmaya Gziaantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Dalı'nda takip edilen 78'i metastatik olan toplamda 95 pankreas kanseri ve 76'sı metastatik olan toplamda 101 safra kesesi ve safra yolları kanseri tanısı olan hasta ve kontrol grubu olarak 162 tane önceden bilinen kronik bir hastalığı olmayan sağlıklı gönüllüler dahil edildi. Kontrol grubundaki 162 gönüllünün 76'sı kadın, 86'sı erkekti. Pankreas kanseri tanısı olan grupta 42 kadın, 53 erkek hasta bulunmaktadır. Safra kesesi ve safra yolları kanseri tanısı olan grupta ise 55 kadın, 46 erkek hasta bulunmaktadır.

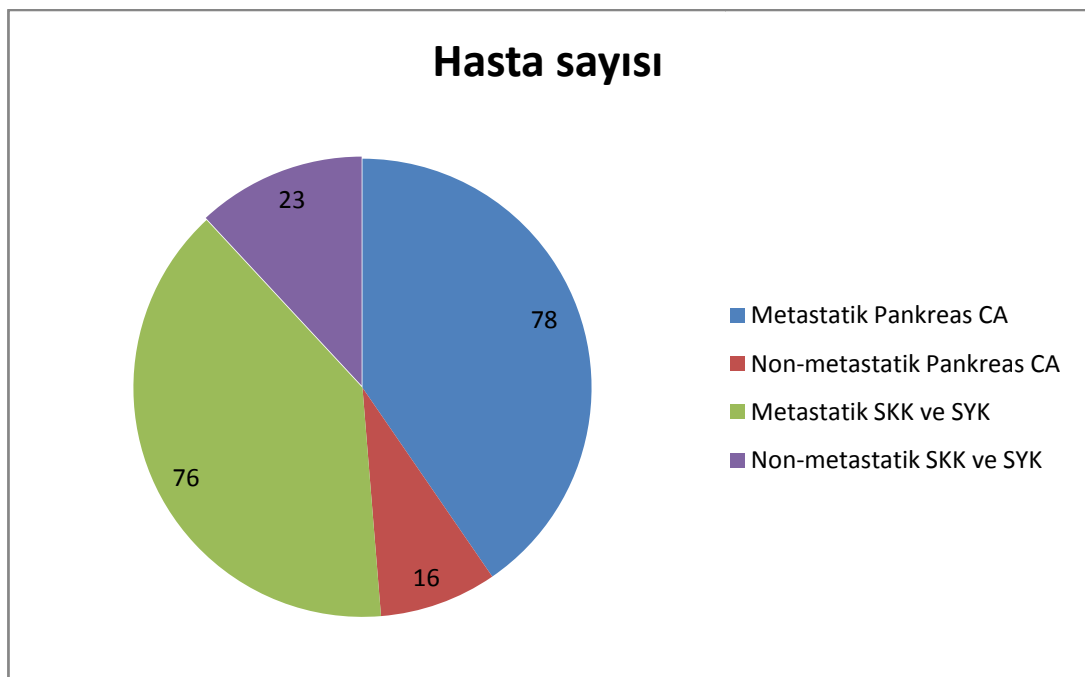
Hasta ve kontrol gruplarıyla ilgili demografik veriler tablo____'da özetlenmiştir.

	Safra kesesi ve safra yolları kanseri	Pankreas kanseri	Kontrol grubu
Yaş (yıl)	60.7± 11.4	58.1± 11.5	49.6± 15.7
Cinsiyet (K/E)	55/46	42/53	76/86
Sayı	101	95	162

Kontrol grubunun yaş ortalaması 49.6±15.7 yıl, pankreas kanseri olan hastaların yaş ortalaması 58.2±11.5 yıl ve son olarak safra kesesi ve safra yolları kanserli hasta grubunu yaş ortalaması ise 60.7±11.4 yıl saptandı. Kontrol grubunun ve hasta grubunun yaşlarının dağılım yüzdeleri şekil____'de gösterilmiştir.



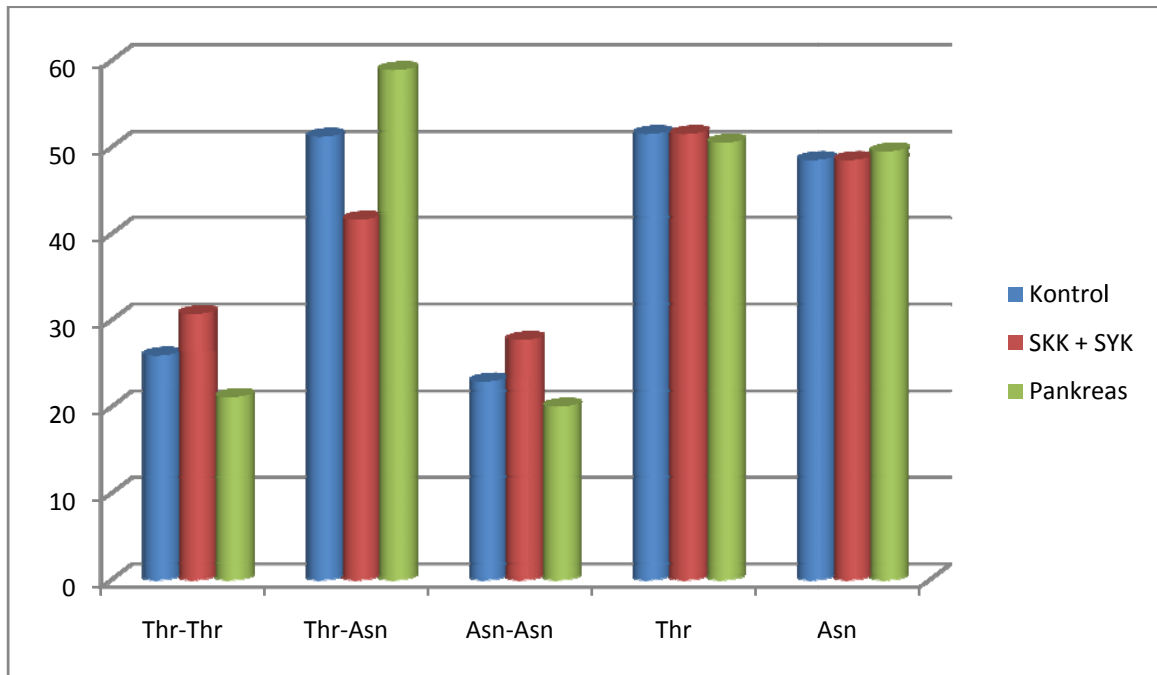
Safra kesesi ve safra yolları kanseri tanısı olan toplamda 101 hastanın 2'sinin evresi saptanamadı. Hastaların 76'sı çalışmaya alındığı dönemde metastatik iken kalan 23'ü non-metastatik evredeydi. Aynı şekilde pankreas kanseri tanısı olan toplamda 95 hastanın 78'i metastatik iken sadece 16'sı non-metastatik evredeydi. Bir hastanın ise evresi saptanamadı. Hastaların metastaz durumuna göre dağılımı şekil ____'de özetlenmiştir.



Metastaz durumu fark etmeksizin pankreas, safra kesei ve safra yolları kanserli grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında ROCK2 geni Thr431Asn polimorfizmi için Thr-Thr, Thr-Asn ve Asn-Asn genotip frekansları kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$ Tablo____ , Şekil____). Thr ve Asn allel frekansları bakımından kontrol ve metastaz durumu fark etmeksizin tüm hasta grubu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$, Tablo____).

	N	Genotip n (%)			p	Allel n (%)		P
		Thr-Thr	Thr-Asn	Asn-Asn		Thr	Asn	
Kontrol	162	42 (25.9)	83 (51.2)	37 (22.9)	>0.05	167 (51.5)	157 (48.5)	>0.05
Pankreas CA	95	20 (21.1)	56 (58.9)	19 (20.0)		96 (50.5)	94 (49.5)	
SKK + SYK	101	31 (30.7)	42 (41.6)	28 (27.7)		104 (51.5)	98 (48.5)	

Tablo____. Metastaz durumu fark etmeksizin tüm hasta grubu ile kontrol grubunda ROCK2 geni ekzon Thr431Asn polimorfizmi genotip dağılımı ve allel sıklıkları

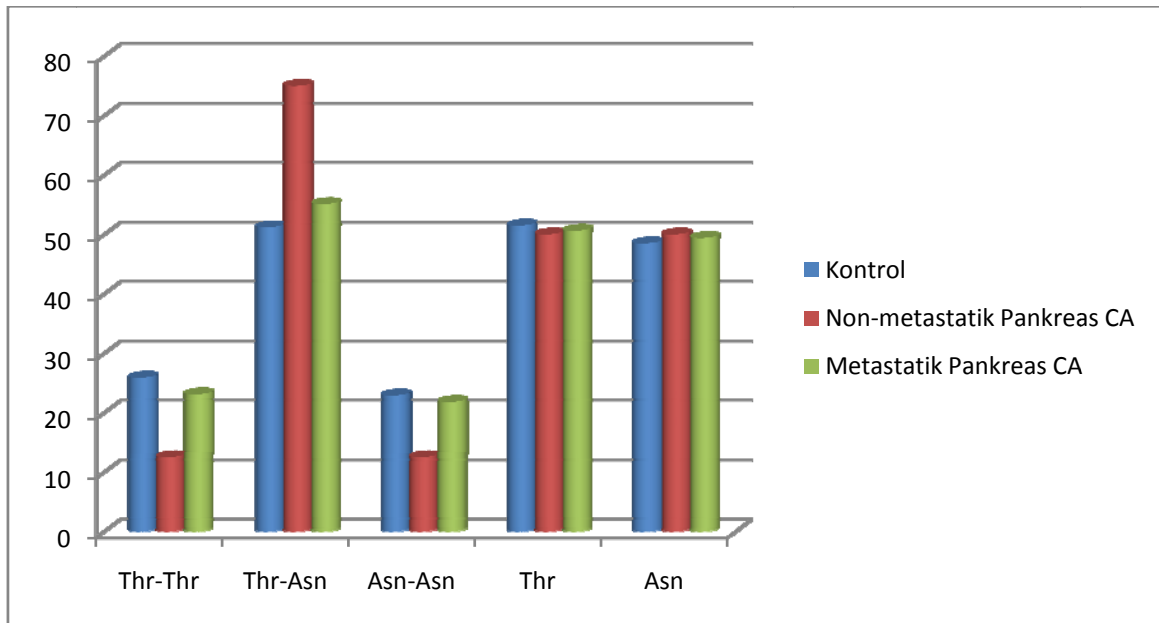


Şekil___: Metastaz durumu fark etmeksizin tüm hasta grubu ile kontrol grubunda ROCK2 geni ekzon Thr431Asn polimorfizmi genotip dağılımı ve allel sıklıkları

ROCK2 geni Thr431Asn polimorfizmi için Thr-Thr, Thr-Asn ve Asn-Asn genotip frekansları pankreas kanseri ve kontrol grubu karşılaştırıldığında; hem metastatik grupla kontrol grubu arasında hemde non-metastatik grupla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$ Tablo___ , Şekil___). Thr ve Asn allel frekansları bakımından da hem metastatik grubun hem de non-metastatik grubun kontrol grubu ile arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$, Tablo___).

	N	Genotip n (%)			p	Allel n (%)		P
		Thr-Thr	Thr-Asn	Asn-Asn		Thr	Asn	
Kontrol	162	42 (25.9)	83 (51.2)	37 (22.9)	>0.05	167 (51.5)	157 (48.5)	>0.05
Non-metastatik Pankreas CA	16	2 (12.5)	12 (75.0)	2 (12.5)		16 (50.0)	16 (50.0)	
Metastatik Pankreas CA	78	18 (23.1)	43 (55.1)	17 (21.8)		79 (50.6)	77 (49.4)	

Tablo___.Metastatik ve non- metastatik pankreas CA hastaları ile kontrol grubunun ROCK 2 geni Thr431Asn polimorfizmi genotip dağılımı

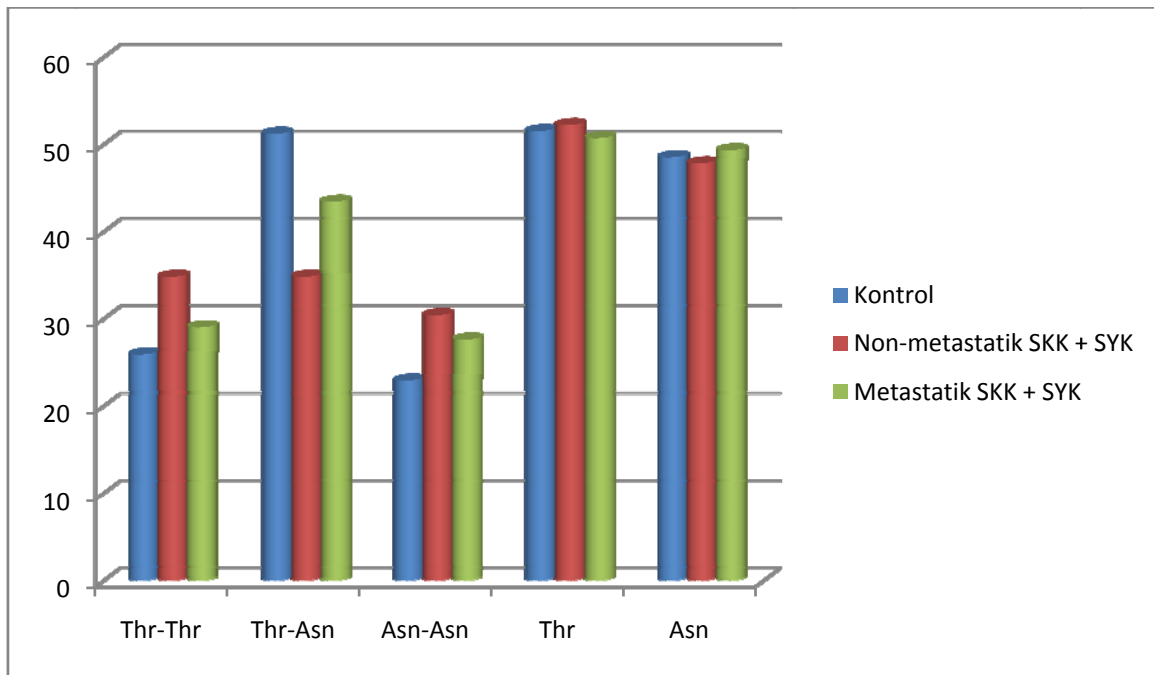


Şekil__.Metastatik ve non- metastatik pankreas ca hastaları ile kontrol grubunun ROCK 2 geni Thr431Asn polimorfizmi genotip dağılımı

ROCK2 geni Thr431Asn polimorfizmi için Thr-Thr, Thr-Asn ve Asn-Asn genotip frekansları safra kesesi ve safra yolları kanseri ve kontrol grubu karşılaştırıldığında; hem metastatik grupla kontrol grubu arasında hemde non-metastatik grupla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$ Tablo__ , Şekil__). Thr ve Asn allel frekansları bakımından da hem metastatik grubun hem de non-metastatik grubun kontrol grubu ile arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$, Tablo__).

	N	Genotip n (%)			p	Allel n (%)		P
		Thr-Thr	Thr-Asn	Asn-Asn		Thr	Asn	
Kontrol	162	42 (25.9)	83 (51.2)	37 (22.9)	>0.05	167 (51.5)	157 (48.5)	>0.05
Non-metastatik SKK + SYK	23	8 (34.8)	8 (34.8)	7 (30.7)		24 (52.2)	22 (47.8)	
Metastatik SKK + SYK	76	22 (29.0)	33 (43.4)	21 (27.6)		77 (50.7)	75 (49.3)	

Tablo__.Metastatik ve non- metastatik SKK +SYK hastaları ile kontrol grubunun ROCK 2 geni Thr431Asn polimorfizmi genotip dağılımı



Şekil____.Metastatik ve non- metastatik SKK +SYK hastaları ile kontrol grubunun ROCK 2 geni Thr431Asn polimorfizmi genotip dağılımı

5.TARTIŞMA

Safra kesesi kanserleri, son derece hızlı yayılan ve oldukça düşük sürviye sahip gastrointestinal sistemin beşinci en sık rastlanan malign tümörleridir. Kolesistektomi piyeslerinde tesadüfen rastlanması dışında klinik belirti verdiğinde genellikle ilerlemiş evrelerde ortaya çıkmaktadır. Yüksek lenfatik yayılım ve implantasyon yeteneğine de sahip olan safra kesesi kanserlerinin, halen uygun cerrahi tedavi dışında uzun yaşam veya şifa sağlayıcı bir tedavisi yoktur (1).

Safra yollarının kanserleri, tedavisi zorluk ve özellik arzeden ve nadir görülen malign tümörlerdir. Daha çok hepatik duktusların bileşkesine yakın yerde veya peri-ampuller bölgede görülürler. Olguların çoğu müracaat ettiğinde rezeke edilemez durumdadır ve 1 yıl içinde hastaların ölümüne neden olur. Safra yolu kanserleri, tüm kanserlerin %2'sini oluşturur ve toplumdaki insidansı yılda 100.000'de 1-2 kadardır. Erkeklerde kadınların yaklaşık iki katı daha sık rastlanmaktadır. Hastaların çoğu 65 yaşın üzerinde olup, 40 yaşından önce nadirdir (24).

Tedavi edilmemiş pankreas kanseri olgularında sağkalım sonuçları kötüdür ve tüm evreleri ele alındığında ortalama 1 yıllık sağkalım oranı % 19 iken, 5 yıllık sağkalım oranı %4'tür (33). Pankreas kanserlerinin çoğunluğu (%80) tanı anında metastatiktir. Cerrahi sınırları tümörsüz olan ve lenf nodu tutulumu olmayan olgularda en iyi kür şansı tanıyan yaklaşım, cerrahi rezeksiyondur ve 5 yıllık sağkalım oranı uzmanlaşmış bir merkezde %40'a çıkabilmektedir (46). Çoğu olguda hastalık lokal ileri veya metastatik olduğu için ancak %10-15 olgu rezeksiyona uygundur ve cerrahi ile ortalama sağkalım 13-18 aydır (32).

Tüm kanser tiplerinde olduğu gibi çalışmamızın konusu olan pankreas, safra kesesi ve safra yolları kanserlerinde de yaşam süresini belirleyen en önemli faktör metastaz gelişimidir. Metastaz gelişim riskinin önceden belirlenmesine ilişkin tanı ve/veya tarama yöntemleri hastalığın tedavisinde önemli başarılar elde edilmesine zemin oluşturacaktır. İlgili mekanizmaların aydınlatılması ile potansiyel tedavi hedefleri belirlenebilecek ve bu sayede daha az toksik etki ve daha spesifik hedeflerin yok edilmesi sonucunda hastalığın tamamen eradikasyonu sağlanabilecektir.

Kimura ve arkadaşları çalışmalarında; Rho/Rho-Kinaz yolağının hücre adezyonu, migrasyonu, şekil değişimleri ve sitokinezde etkili olduğunu göstermişlerdir (119). Ying ve arkadaşları çalışmalarında meme kanserinde Rho-Kinaz inhibitörleri ile hücre adezyon, migrasyon ve invazyon yeteneklerinin baskılanarak, kanser hücrelerinin metastaz yapma yeteneğinin azaltıldığını saptamışlardır (120). Ayrıca Kamai ve arkadaşları Rho proteinlerinin ve Rho-Kinaz yolunun Germ hücreli testiküler tümörde etkili olduğunu saptamışlardır (121).

Fritz ve arkadaşları ise; meme tümör dokusunda Rho protein düzeylerinin arttığını belirtmişlerdir (122). Yine Fritz ve arkadaşlarının yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise artan meme tümör gradı ile RhoA protein düzeyleri arasında korelasyon saptanmıştır (123).

Kleer ve arkadaşları ise; meme kanserinde RhoC ekspresyonu ile metastaz arasında anlamlı bir ilişki saptamışlar ve buna istinaden RhoC'nin invaziv meme kanserinde metastazın önceden tahmininde bir tanı aracı olarak kullanılabileceğini savunmuşlardır (124,125).

Lin ve arkadaşları ise çalışmalarında; meme kanseri migrasyon ve metastazında Rho/Rho-Kinaz yolağının aktif rol oynadığını göstermişlerdir (126). Yapılan hücre kültürü ve hayvan deneylerinde, çeşitli Rho-Kinaz inhibitörlerinin kullanımı ile kanser hücrelerinde migrasyon ve metastaz özelliklerinin baskılandığı gösterilmiştir (127,128,129).

Rho-kinaz gen polimorfizmi ile ilgili bugüne kadar yapılmış araştırmalar hipertansiyonla ilişkilidir. Kanserli hastalarda Rho-kinaz gen polimorfizminin incelendiği ilk çalışma 2008 yılında Camcı ve arkadaşlarının meme kanserli hastalarda yapmış olduğu çalışmadır. Bu çalışmada Camcı ve arkadaşları meme kanserinde ROCK-1 ve ROCK-2 gen polimorfizmlerinin rolünü araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda ROCK-1 geninde kontrol grubu ile hasta grupları arasında

anlamalı bir fark saptanmazken, ROCK-2 geni Thr431Asn (bizim çalışmamızda ana konusudur) polimorfizmi için Thr-Thr, Thr-Asn ve Asn-Asn genotip frekansları kontrol grubu ile nonmetastatik grup arasında fark saptanmazken ($p>0.05$), kontrol grubu ile metastatik grup arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Yine aynı çalışmada Thr ve Asn allel frekansları bakımından kontrol ve non-metastatik grup arasında anlamlı bir ilişki bulunmazken ($p>0.05$), metastaik grupta kontrol grubuna göre Thr allel frekansı anlamlı yüksek saptanmıştır ($p<0.05$) (130).

Bu çalışma tüm kanser tiplerinde ROCK-2 gen polimorfizmlerinin rolünü araştıran literatürdeki ikinci çalışma olmakla beraber pankreas, safra kesesi ve safra yolları kanserlerindeki ROCK-2 gen polimorfizmini araştıran ilk çalışmadır.

Araştırmamızın sonucunda ROCK-2 geni Thr431Asn polimorfizmi için Thr-Thr, Thr-Asn ve Asn-Asn genotip frekansları kontrol grubu ile metastaz durumu fark etmeksizin tüm pankreas kanserli hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Yine kontrol grubu ile metastatik ve non-metastatik tüm pankreas kanserli hastaların Thr ve Asn allel frekansları yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Benzer şekilde ROCK-2 geni Thr431Asn polimorfizmi için Thr-Thr, Thr-Asn ve Asn-Asn genotip frekansları kontrol grubu ile metastaz durumu fark etmeksizin tüm safra kesesi ve safra yolları kanserli hasta grubu arasında fark saptanmadı ($p>0.005$). Kontrol grubu ile metastatik ve non-metastatik tüm safra kesesi ve safra yolları kanserli hastaların Thr ve Asn allel frekansları yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.005$).

Çalışmanın devamında hastaları metastatik ve non-metastatik diye gruplara ayırdık. ROCK-2 geni Thr431Asn polimorfizmi için Thr-Thr, Thr-Asn ve Asn-Asn genotip frekansları kontrol grubu ile non-metastatik safra kesesi ve safra yolları kanserli hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Benzer şekilde kontrol grubu ile non-metastatik tüm pankreas kanserli hastaların Thr ve Asn allel frekansları yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Çalışmanın diğer ayağı olan metastatik pankreas kanserli hastaların ROCK-2 geni Thr431Asn polimorfizmi için Thr-Thr, Thr-Asn ve Asn-Asn genotip frekansları ile kontrol grubu arasında fark saptanmadı ($p>0.05$). Benzer şekilde kontrol grubu ile non-metastatik tüm pankreas kanserli hastaların Thr ve Asn allel frekansları yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu bulgular ışığında Rho-kinaz ailesinden olan ROCK-2 geninde Thr431Asn polimorfizminin, pankreas, safra kesesi

ve safra yolları kanserlerinde metastaz gelişiminin önceden tahmininde bir belirleyici olarak kullanılabilmesi mümkün görünmemektedir. Ancak bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

1. Pankreas, safra kesesi ve safra yolları kanserlerinde metastaz gelişim riskinin önceden belirlenmesine ilişkin tanı ve/veya tarama yöntemleri hastalığın tedavisinde önemli başarılar elde edilmesine zemin oluşturacaktır.
2. ROCK-2 geni Thr431Asn polimorfizmi bakımından Thr-Thr, Thr-Asn, Asn-Asn genotip frekansları kontrol grubu ile metastaz durumu fark etmeksizin tüm pankreas kanserli hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.005$).
3. ROCK-2 gen geni Thr431Asn polimorfizmi bakımından Thr-Thr, Thr-Asn, Asn-Asn genotip frekansları kontrol grubu ile non-metastatik pankreas kanserli hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).
4. ROCK-2 geni Thr431Asn polimorfizmi bakımından Thr-Thr, Thr-Asn, Asn-Asn genotip frekansları bakımından kontrol grubu ile metastatik pankreas kanserli hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).
5. ROCK-2 geni Thr431Asn polimorfizmi bakımından Thr-Thr, Thr-Asn, Asn-Asn genotip frekansları kontrol grubu ile metastaz durumu fark etmeksizin tüm safra kesesi ve safra yolları kanserli hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).
6. ROCK-2 geni Thr431Asn polimorfizmi bakımından Thr-Thr, Thr-Asn, Asn-Asn genotip frekansları kontrol grubu ile non-metastatik safra kesesi ve safra yolları kanserlerinde hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

7. ROCK-2 geni Thr431Asn polimorfizmi bakımından Thr-Thr, Thr-Asn, Asn-Asn genotip frekansları bakımından kontrol grubu ile metastatik safra kesesi ve safra yolları kanserlerinde hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).
8. ROCK-2 geni Thr ve Asn allel frekansları bakımından kontrol ve metastaz durumu fark etmeksizin tüm pankreas kanserli hastalar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.005$).
9. ROCK-2 geni Thr ve Asn allel frekansları bakımından kontrol ve non-metastatik pankreas kanserli hastalar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$).
10. ROCK-2 geni Thr ve Asn allel frekansları bakımından kontrol ve metastatik pankreas kanserli hastalar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$).
11. ROCK-2 geni Thr ve Asn allel frekansları bakımından kontrol ve metastaz durumu fark etmeksizin tüm safra kesesi ve safra yolları kanserli hastalar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$).
12. ROCK-2 geni Thr ve Asn allel frekansları bakımından kontrol ve non-metastatik safra kesesi ve safra yolları kanserli hastalar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$).
13. ROCK-2 geni Thr ve Asn allel frekansları bakımından kontrol ve metastatik safra kesesi ve safra yolları kanserli hastalar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$).
14. Bu bilgiler ışığında Rho-kinaz ailesinden olan ROCK-2 geninde Thr431Asn polimorfizminin, pankreas, safra kesesi ve safra yolları kanserlerinde metastaz gelişiminin önceden tahmininde bir belirleyici olarak kullanılabilmesi mümkün görünmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Bartlett DL, Fong Y. Gallbladder Cancer. In Hepatobiliary Cancer, Eds: LH Blumgart, Y Fong, WR Jarnagin; London: B.C.Decker Inc Hamilton, 2001. pp:211-224
2. Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K. Rho-kinase mediated contraction of isolated stress fibers. J Cell Biol. 2001 Apr 30;153(3):569-84.
3. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. Physiol Rev. 2001;81(1):153-208.
4. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol. 2006 Mar;290(3):C661-8.
5. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). Science. 1996 Jul 12;273(5272):245-8.
6. Fukata Y, Oshiro N, Kinoshita N, Kawano Y, Matsuoka Y, Bennett V, Matsuura Y, Kaibuchi K., Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility, J Cell Biol., 145, 347-61, (1999).
7. Takamura M, Sakamoto M, Genda T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S. Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. Hepatology. 2001 Mar;33(3):577-81.
8. Ying H, Biroc SL, Li WW, Alicke B, Xuan JA, Pagila R, Ohashi Y, Okada T, Kamata Y, Dinter H. Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. Mol Cancer Ther. 2006;5(9):2158-64.
9. Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. Nat Med. 1999 Feb;5(2):221-5.
10. Serra I, Calvo A, Baez S, Yamamoto M. Risk factors for gallbladder cancer. An international collaborative casecontrol study. Cancer 1996; 78:1515-17.
11. Bartlett DL, Fong Y. Tumors of the Gallbladder. In Surgery of the Liver and Biliary Tract, Eds: LH Blumgart, Y Fong; 3rd ed. London: W.B.Saunders Co, 2000. pp:993-1015.

12. Berk RN, Armbuster TG, Saltzstein SL. Carcinoma in the porcelain gallbladder. *Radiology* 1973; 106:29-31.
13. Shukla VK, Tiwari SC, Roy SK. Biliary bile acids in cholelithiasis and carcinoma of the gallbladder. *Eur J Cancer Prev* 1993; 2:155-60.
14. Albores-Saavedra J, Henson DE. Atlas of tumor pathology, second series fascicle 22: Tumors of the gallbladder and extrahepatic bile ducts. 2nd ed. Bethesda (MD): Armed Forces Institute of Pathology 1986; p.28-123.
15. Carriaga MT, Henson DE. Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts and pancreas. *Cancer* 1995; 75(1 suppl):171-90.
16. Chow NH, Huang SM, Chan SH, et al. Significance of c-erbB-2 expression in normal and neoplastic epithelium of biliary tract. *Anticancer Res* 1995;15:1055-9.
17. Fujii K, Yasui W, Shimamoto F, et al. Immunohistochemical analysis of nm23 gene product in human gallbladder carcinomas. *Virchows Arch* 1995; 426:355-9.
18. Kimura W, Nagai H, Kuroda A, Morioka Y. Clinicopathologic study of asymptomatic gallbladder carcinoma found at autopsy. *Cancer* 1989; 64:98-103
19. Schwartz LH, Coakley FV, Sun Y, et al. Neoplastic pancreaticobiliary duct obstruction: evaluation with breathhold MR cholangiopancreatography. *Am J Roentgenol* 1998; 170:1491-5.
20. Shinkai H, Kimura W, Muto T. Surgical indications for small polypoid lesions of the gallbladder. *Am J Surg* 1998; 175:114-7.
21. Houry S, Haccart V, Huguier M, Schlienger M. Gallbladder cancer: role of radiation therapy. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:1578-84.
22. Todoroki T, Iwasaki Y, Orii K, et al. Resection combined with intraoperative radiation therapy (IORT) for stage IV (TNM) gallbladder carcinoma. *World J Surg* 1991; 15:357-66.
23. Makela JT, Kairaluoma MI. Superselective intra-arterial chemotherapy with mitomycin for gallbladder cancer. *Br J Surg* 1993; 80:912-5.
24. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005; 366:1303-14.
25. Chalasani N, Baluyut A, Ayaaz I, Zaman A, Sood G. Cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: A multicenter case-control study. *Hepatology* 2003;31: 7-11.
26. de Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. Biliary tract cancers. *N Engl J Med* 1999;341: 1368-78.
27. Hirohashi K, Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T, Tanaka H. Macroscopic types of intrahepatic cholangiocarcinoma: clinicopathologic features and surgical outcomes. *Hepatogastroenterology* 2002;49: 326-9.
28. Sarmiento JM, Nagorney DM. Hepatic resection in the treatment of perihilar cholangiocarcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:893-908.

29. Anderson CD, Pinson CW, Berlin J, Chari RS. Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. *The Oncologist* 2004;9: 43-57.
30. Chalasani N, Baluyut A, Ayaaz I, Zaman A, Sood G. Cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: A multicenter case-control study. *Hepatology* 2003;31: 7-11.
31. Goydos JS, Brumfield AM, Frezza E, Booth A, Lotze MT, Carty SE. Marked elevation of serum interleukin-6 in patients with cholangiocarcinoma: validation of utility as a clinical marker. *Ann Surg* 1998;227:398-404.
32. Slattery JM, Sahani DV. What is the current state-of-the-art imaging for detection and staging of cholangiocarcinoma. *Oncologist* 2006;11: 913-922.
33. Thongprasert S. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 2005; 16 (supp): ii93-6.
34. Lowenfels, A.B. and P. Maisonneuve, *Epidemiology and prevention of pancreatic cancer*. *Jpn J Clin Oncol*, 2004. 34(5): p. 238-44.
35. Makary, M.A., et al., *Pancreaticoduodenectomy in the very elderly*. *J Gastrointest Surg*, 2006. 10(3): p. 347-56
36. Pernick, N.L., et al., *Clinicopathologic analysis of pancreatic adenocarcinoma in African Americans and Caucasians*. *Pancreas*, 2003. 26(1): p. 28-32.
37. Harnack, L.J., et al., *Smoking, alcohol, coffee, and tea intake and incidence of cancer of the exocrine pancreas: the Iowa Women's Health Study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1997. 6(12): p. 1081-6.
38. Koorstra, J.B., et al., *Pancreatic carcinogenesis*. *Pancreatology*, 2008. 8(2): p. 110-25.
39. Schwartz, G.G. and I.M. Reis, *Is cadmium a cause of human pancreatic cancer?* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000. 9(2): p. 139-45.
40. Lowenfels, A.B., et al., *Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group*. *J Natl Cancer Inst*, 1997. 89(6): p. 442-6.
41. Rosewicz, S. and B. Wiedenmann, *Pancreatic carcinoma*. *Lancet*, 1997. 349(9050): p. 485-9.
42. Ghataorhe, P., et al., *A carrier of both MEN1 and BRCA2 mutations: case report and review of the literature*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007. 179(2): p. 89-92.
43. Winter, J.M., A. Maitra, and C.J. Yeo, *Genetics and pathology of pancreatic cancer*. *HPB (Oxford)*, 2006. 8(5): p. 324-36.
44. White, R., et al., *Preoperative chemoradiation for patients with locally advanced adenocarcinoma of the pancreas*. *Ann Surg Oncol*, 1999. 6(1): p. 38-45.
45. Kleeff, J., et al., *Pancreatic cancer: from bench to 5-year survival*. *Pancreas*, 2006. 33(2): p. 111-8.
46. Fazal, S. and M.W. Saif, *Supportive and palliative care of pancreatic cancer*. *JOP*, 2007. 8(2): p. 240-53.

47. Mancuso, A., F. Calabro, and C.N. Sternberg, *Current therapies and advances in the treatment of pancreatic cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. 58(3): p. 231-41.
48. Boeck, S. and V. Heinemann, *The role of second-line chemotherapy after gemcitabine failure in patients with advanced pancreatic cancer*. Future Oncol, 2008. 4(1): p. 41-50.
49. Sultana, A., et al., *Systematic review, including meta-analyses, on the management of locally advanced pancreatic cancer using radiation/combined modality therapy*. Br J Cancer, 2007. 96(8): p. 1183-90.
50. Ihse, I., et al., *Intraoperative radiotherapy for patients with carcinoma of the pancreas*. Pancreatology, 2005. 5(4-5): p. 438-42.
51. O'Connor, J.K., et al., *Survival after attempted surgical resection and intraoperative radiation therapy for pancreatic and periampullary adenocarcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. 63(4): p. 1060-6.
52. Michalski, C.W., et al., *Systematic review and meta-analysis of standard and extended lymphadenectomy in pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer*. Br J Surg, 2007. 94(3): p. 265-73.
53. Richter, A., et al., *Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience*. World J Surg, 2003. 27(3): p. 324-9.
54. Sohn, T.A., et al., *Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators*. J Gastrointest Surg, 2000. 4(6): p. 567-79.
55. Sierzega, M., et al., *The ratio of metastatic/resected lymph nodes is an independent prognostic factor in patients with node-positive pancreatic head cancer*. Pancreas, 2006. 33(3): p. 240-5.
56. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. Trends Pharmacol Sci. 2001;22:32-9.)
57. Lai A, Frishman WH. Rho-kinase inhibition in the therapy of cardiovascular disease. Cardiol Rev. 2005;13:285-92.
58. Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K. Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. J Cell Biol. 2001;153:569-84.
59. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. Physiol Rev. 2001;81:153-208.
60. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. Nature. 2002;420:629-35.
61. Sin WC, Chen XQ, Leung T, Lim L. RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. Mol Cell Biol. 1998;18:6325-39.
62. Loirand G, Guérin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. Circ Res. 2006;98:322-34.

63. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* 1996;392:189-93.
64. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, et al. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 1996;15:2208-16.
65. Tanaka T, Nishimura D, Wu RC, Amano M, Iso T, Kedes L, et al. Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. *J Biol Chem.* 2006;281:15320-9.
66. Liao JK, Seto M, Noma K. Rho kinase (ROCK) inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;50:17-24.
67. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:C661-8.
68. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 2000;522 Pt 2:177-85.
69. Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res.* 2003;93:767-75.
70. Shimokawa H. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;39:319-27.
71. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 1996;273:245-8.
72. Budzyn K, Paull M, Marley PD, Sobey CG. Segmental differences in the roles of rho-kinase and protein kinase C in mediating vasoconstriction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317:791-6.
73. Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H, Urakami L, Usui M, Takeshita A. Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation.* 2002;105:1545-7.
74. Kobayashi N, Horinaka S, Mita S, Nakano S, Honda T, Yoshida K, et al. Critical role of Rho-kinase pathway for cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. *Cardiovasc Res.* 2002;55:757-67.
75. Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, et al. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca^{2+} sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ Res.* 2002;91:112-9.
76. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Morimatsu M, Kaibuchi K, et al. Role of Rho-associated kinase in neointima formation after vascular injury. *Circulation.* 2001;103:284-9.
77. Chitaley K, Wingard CJ, Clinton Webb R, Branam H, Stopper VS, Lewis RW, et al. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nat Med.* 2001;7:119-22.

78. Büyükaşar K, Levent A. Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and acetylcholine release in the mouse gastric fundus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;303:777-81.
79. Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, Hiroki J, Mukai Y, Tsutsui H, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2004;109:2234-9.
80. Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res.* 2007;100:607-21.
81. Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, Amano M, Kozai T, Yamawaki T, et al. Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res.* 1999;43:1029-39.
82. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 1997;389:990-4.
83. Boer C, van der Linden PJ, Scheffer GJ, Westerhof N, de Lange JJ, Sipkema P. RhoA/Rho kinase and nitric oxide modulate the agonist-induced pulmonary artery diameter response time. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:990-8.
84. Weber DS, Webb RC. Enhanced relaxation to the rho-kinase inhibitor Y-27632 in mesenteric arteries from mineralocorticoid hypertensive rats. *Pharmacology.* 2001;63:129-33.
85. Batchelor TJ, Sadaba JR, Ishola A, Pacaud P, Munsch CM, Beech DJ. Rho-kinase inhibitors prevent agonist-induced vasospasm in human internal mammary artery. *Br J Pharmacol.* 2001;132:302-8.
86. Brozovich FV. Rho signaling: agonist stimulation and depolarization come together. *Circ Res.* 2003;93:481-3.
87. Sato S, Ikegaki I, Asano T, Shimokawa H. Antiischemic properties of fasudil in experimental models of vasospastic angina. *Jpn J Pharmacol.* 2001;87:34-40.
88. Bao W, Hu E, Tao L, Boyce R, Mirabile R, Thudium DT, et al. Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61:548-58.
89. Del Re DP, Miyamoto S, Brown JH. RhoA/Rho kinase up-regulate Bax to activate a mitochondrial death pathway and induce cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 2007;282:8069-78.
90. Fukata Y, Oshiro N, Kinoshita N, Kawano Y, Matsuoka Y, Bennett V, et al. Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J Cell Biol.* 1999;145:347-61.
91. Takamura M, Sakamoto M, Genda T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S. Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology.* 2001;33:577-81.
92. Ying H, Biroc SL, Li WW, Alicke B, Xuan JA, Pagila R, et al. Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:2158-64.

93. Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med*. 1999;5:221-5.
94. Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I. Rho/ROCK pathway as a target of tumor therapy. *J Neurosci Res*. 2006;83:243-55.
95. Lawler K, Foran E, O'Sullivan G, Long A, Kenny D. Mobility and invasiveness of metastatic esophageal cancer are potentiated by shear stress in a ROCK- and Ras-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291:C668-77.
96. Ogawa T, Tashiro H, Miyata Y, Ushitora Y, Fudaba Y, Kobayashi T, et al. Rho-associated kinase inhibitor reduces tumor recurrence after liver transplantation in a rat hepatoma model. *Am J Transplant*. 2007;7:347-55.
97. Kamai T, Arai K, Sumi S, Tsujii T, Honda M, Yamanishi T, et al. The rho/rho-kinase pathway is involved in the progression of testicular germ cell tumour. *BJU Int*. 2002;89:449-53.
98. Nakajima M, Hayashi K, Egi Y, Katayama K, Amano Y, Uehata M, et al. Effect of Wf-536, a novel ROCK inhibitor, against metastasis of B16 melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003;52:319-24.
99. Nakajima M, Hayashi K, Katayama K, Amano Y, Egi Y, Uehata M, et al. Wf-536 prevents tumor metastasis by inhibiting both tumor motility and angiogenic actions. *Eur J Pharmacol*. 2003;459:113-20.
100. Han Z, Xu G, Zhou J, Xing H, Wang S, Wu M, et al. Inhibition of motile and invasive properties of ovarian cancer cells by ASODN against Rho-associated protein kinase. *Cell Commun Adhes*. 2005;12:59-69.
101. Yoshinaga K, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Utsunomiya T, Mori M. Platelet-derived endothelial cell growth factor mediates Rho-associated coiled-coil domain kinase messenger RNA expression and promotes cell motility. *Ann Surg Oncol*. 2003;10:582-7.
102. van Nieuw Amerongen GP, Koolwijk P, Versteilen A, van Hinsbergh VW. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:211-7.
103. Hyvelin JM, Howell K, Nichol A, Costello CM, Preston RJ, McLoughlin P. Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation. *Circ Res*. 2005;97:185-91.
104. Yin L, Morishige K, Takahashi T, Hashimoto K, Ogata S, Tsutsumi S, et al. Fasudil inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:1517-25.
105. Mizukami Y, Fujiki K, Duerr EM, Gala M, Jo WS, Zhang X, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor through the induction of phosphatidylinositol 3-kinase/Rho/ROCK and c-Myc. *J Biol Chem*. 2006;281:13957-63.
106. Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*. 2008;582:2093-2101.

107. Fritz G, Brchetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer*. 2002;87:635-44.
108. Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer*. 1999;81:682-7.
109. Kleer CG, van Golen KL, Zhang Y, Wu ZF, Rubin MA, Merajver SD. Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. *Am J Pathol*. 2002;160:579-84.
110. Kleer CG, Griffith KA, Sabel MS, Gallagher G, van Golen KL, Wu ZF, et al. RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;93:101-10.
111. Lin M, van Golen KL. Rho-regulatory proteins in breast cancer cell motility and invasion. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;84:49-60.
112. Wyckoff, J. B., Jones, J. G., Condeelis, J. S. & Segall, J. E. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res*. 60, 2504–2511 (2000).
113. Wang, W. et al. Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res*. 62, 6278–6288 (2002).
114. Itoh, K. et al. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nature Med*. 5, 221–225 (1999).
115. Takamura, M. et al. Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology* 33, 577–581 (2001).
116. Seasholtz TM, Wessel J, Rao F, Rana BK, Khandrika S, Kennedy BP, et al. Rho kinase polymorphism influences blood pressure and systemic vascular resistance in human twins: role of heredity. *Hypertension*. 2006;47:937-47.
117. Rao F, Wessel J, Wen G, Zhang L, Rana BK, Kennedy BP, et al. Renal albumin excretion: twin studies identify influences of heredity, environment, and adrenergic pathway polymorphism. *Hypertension*. 2007;49:1015-31.
118. Zhao Q, Wang L, Yang W, Chen S, Huang J, Fan Z, et al. Interactions among genetic variants from contractile pathway of vascular smooth muscle cell in essential hypertension susceptibility of Chinese Han population. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18:459-66.
119. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996;273:245-8.
120. Ying H, Biroc SL, Li WW, Alicke B, Xuan JA, Pagila R, et al. Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:2158-64.

121. Kamai T, Arai K, Sumi S, Tsujii T, Honda M, Yamanishi T, et al. The rho/rho-kinase pathway is involved in the progression of testicular germ cell tumour. *BJU Int.* 2002;89:449-53.
122. Fritz G, Brchetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer.* 2002;87:635-44.
123. Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer.* 1999;81:682-7.
124. Kleer CG, van Golen KL, Zhang Y, Wu ZF, Rubin MA, Merajver SD. Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. *Am J Pathol.* 2002;160:579-84.
125. Kleer CG, Griffith KA, Sabel MS, Gallagher G, van Golen KL, Wu ZF, et al. RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;93:101-10.
126. Lin M, van Golen KL. Rho-regulatory proteins in breast cancer cell motility and invasion. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;84:49-60.
127. Takamura M, Sakamoto M, Genda T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S. Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology.* 2001;33:577-81.
128. Lawler K, Foran E, O'Sullivan G, Long A, Kenny D. Mobility and invasiveness of metastatic esophageal cancer are potentiated by shear stress in a ROCK- and Ras-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291:C668-77.
129. Ogawa T, Tashiro H, Miyata Y, Ushitora Y, Fudaba Y, Kobayashi T, et al. Rho-associated kinase inhibitor reduces tumor recurrence after liver transplantation in a rat hepatoma model. *Am J Transplant.* 2007;7:347-55.

130. INVESTIGATION OF ASSOCIATION BETWEEN THE RHO-KINASE GENE POLYMORPHISM AND METASTASIS IN BREAST CANCER