

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNSAN MESANE KANSERLERİNDE TRANSİENT RESEPTOR
POTANSİYEL MELASTATİN (TRPM) İYON KANALI
GENLERİNİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ
DR. GÜLAY GÜLEÇ CEYLAN

2015

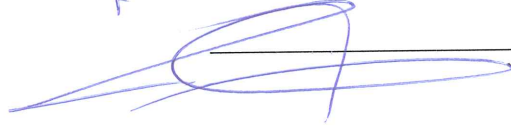
FÜBAP DESTEK NO: 1264

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

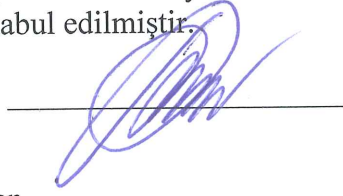


Prof. Dr. Halit ELYAS

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç Dr. Ebru ÖNALAN



Danışman

Doktora Tezi Sınavı Jüri Üyeleri

.....
Prof. Dr. Ramazan BAL
Doç. Dr. İbrahim Tekedereli
Prof. Dr. Ertuğrul Yeşilada
Prof. Dr. Halit ELYAS
Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

İTHAF SAYFASI

Canım Aileme

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince eğitimime olan katkıları ve tez hazırlığı sırasında esirgemediği yardımları nedeniyle danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ebru ETEM ÖNALAN'a, patolojik incelemelerde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, yönlendirmeleri için Prof. Dr. Halit ELYAS'a, tez çalışmalarım boyunca sürekli desteğini gördüğüm eşim Doç. Dr. Cavit CEYLAN'a, ihtiyaç duyduğumda yanımda olan bölüm arkadaşlarıma ve canım aileme teşekkür etmeyi bir borç biliyorum. Ayrıca doktoram boyunca bana en büyük mutluluğu yaşatan kızlarıma da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
İTHAF SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
1. ÖZET	x
2. ABSTRACT	xii
3. GİRİŞ	1
3.1. Mesane Tümörleri	1
3.1.1. Etyoloji	2
3.1.2. Tümör Morfolojisi.....	3
3.1.3. Tanı	4
3.1.3.1. Semptomlar	4
3.1.3.2. Radyoloji	5
3.1.3.3. Sistoskopi	5
3.1.4. Evreleme	5
3.1.4.1. Patolojik Evreleme	5
3.1.4.2. WHO Sınıflaması	8
3.2. Mesane Tümörü ve İyon Kanalları	11
3.2.1. TRPM2 Kanalı	14

3.2.2. TRPM4 ve 5 Kanalları	15
3.2.3. TRPM7 Kanalı	16
3.2.4. TRPM8 Kanalı	18
3.3. Çalışmanın Amacı	19
4. GEREÇ ve YÖNTEM	20
4.1. Hastaların Seçimi	20
4.2. Kullanılan Aletler	20
4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
4.4. Kullanılan Yöntemler	22
4.4.1. Total RNA İzolasyonu	22
4.4.1.1. Kullanılan Çözeltiler	22
4.4.1.2. İzolasyon	22
4.4.1.3. Spektrofotometrik RNA Ölçümü	23
4.4.2. Komplementer DNA Sentezi	23
4.4.2.1. Kullanılan Çözeltiler	24
4.4.2.2. İzolasyon	24
4.5. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Hedef Genlerin cDNA Amplifikasyonu:	25
4.6. İmmunohistokimya	27
4.7. İstatistiksel Değerlendirme	28
5. BULGULAR	29
5.1. İmmunohistokimyasal Bulgular	30
5.1.1. TRPM2 İmmünreaktivitesi	31
5.1.2. TRPM4 İmmünreaktivitesi	31

5.1.3. TRPM5 İmmünreaktivitesi.....	32
5.1.4. TRPM7 İmmünreaktivitesi.....	32
5.1.5. TRPM8 İmmünreaktivitesi.....	33
5.2. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi Bulguları.....	34
6. TARTIŞMA	36
7. KAYNAKLAR	42
8. ÖZGEÇMİŞ	55

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: cDNA karışım miktarı	24
Tablo 2: cDNA sentezi için uygulanan PZR programı	25
Tablo 3: RT-PCR' da kullanılan primerler	25
Tablo 4: RT-PCR için her bir kuyucuğa konan bileşikler	26
Tablo 5: Uygulanan RT-PCR programı .	26
Tablo 6: Hastaların ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin demografik verileri	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: TRPM2 İmmünreaktivitesi	31
Şekil 2: TRPM4 İmmünreaktivitesi.	31
Şekil 3: TRPM 5 İmmünreaktivitesi.	32
Şekil 4: TRPM 7 İmmünreaktivitesi	32
Şekil 5: TRPM8 İmmünreaktivitesi.	33
Şekil 6: Kontrol ve kanser dokularındaki TRPM2,TRPM4, TRPM5, TRPM7 ve TRPM8 iyon kanallarının mRNA kat artışı grafiği	35

1. ÖZET

Tüm dünyada mesane kanserleri erkeklerde 7, kadınlarda ise 17. sıklıkta görülen kanser türüdür. Türkiye’de görülme sıklığı akciğer kanserinden sonra 2. sırada, urogenital kanserler arasında ise erkeklerde ilk sıradadır. Genellikle 6. ve 7. dekatta ortaya çıkar. Erkek kadın oranı 3:1 olmasına rağmen mesane kanseri nedeniyle ölenlerin %31’i kadındır. Artmış proliferasyon sonucu malign hücrelerin transformasyonu, bozuk farklılaşma, ölüm yeteneğinin bozulması anormal doku gelişiminin temel sebebidir. Bunun sonucunda kontrolsüz yayılım ve invazyon ortaya çıkabilmektedir. Transformasyon sıklıkla iyon kanal ekspresyonundaki değişimlerle gerçekleşebilmektedir. Plazma membranında yer alan iyon kanalları hücrel elektrogenез ve elektrik iletiminden sorumludur. Bu kanallar apoptoz, proliferasyon ve farklılaşma gibi doku homeostazının korunması için gerekli olan tüm temel hücre davranışlarının yerine getirilmesinde görev almaktadırlar. İyon kanallarının bu kritik süreçlere katkısında birkaç ana mekanizma vardır. Bunlar membran potansiyelinin korunması, hücre volümünün düzenlenmesi ve temel sinyal iletimini sağlayan iyonların girişidir. Sonuç, hücrel cevapların anormal progresyonudur. Kanserin ortaya çıkmasını ve ilerlemesini düzenleyen farklı ekspresyon ve iyon kanalı aktiviteleri önerilmesine rağmen, mesane kanseri hücrelerinde, iyon kanalı bağımlı mekanizmaları incelemek oldukça kıymetli olacaktır. Çalışmamıza transisyonel hücreli mesane kanseri tanısı almış 40 hasta ve 7 kontrol dokusu alınmıştır. Bu dokuların immunohistokimyasal olarak ekspresyonları ve gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM7 ve TRPM8’in mRNA ekspresyonları çalışılmıştır. İmmunohistokimyasal olarak sadece TRPM2 tüm

dokularda (epitelyum hücreleri, tümör hücreleri, kas dokusu) eksprese olurken, TRPM5 ekspresyonu hiçbir dokuda gözlenmemiştir. TRPM4, TRPM7 ve TRPM8 ekspresyonları ise sadece epitelyum hücrelerinde gözlenmiştir. TRPM7 mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre çalışma grubunda belirli derecede yükselmiş olarak tespit edilirken, TRPM5 ve TRPM8 mRNA ekspresyonları yine çalışma grubunda anlamlı derecede düşük, TRPM2 ve TRPM4 mRNA ekspresyonlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Çalışmamızda, mesane kanser oluşumunda TRP iyon kanallarının etkilerinin incelenmiş, özellikle TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM7 ve TRPM8'in terapötik bir hedef olup olamayacağını belirlenmesi yönünde yol gösterici bir özelliği olduğu gibi, sonuçlarımız da bu iyon kanallarının mesane kanseri tedavisinde yeni hedef genler olabileceğini ve böylece daha sonraki bir aşamada invivo koşullarda bu proteinler hedeflenerek deneysel anlamda mesane kanseri tedavi yöntemlerinin denenebilmesine olanak sağlayacağını düşünüyoruz.

**2.INVESTIGATION OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL
MELASTATIN (TRPM)ION CHANNELS GENES EXPRESSIONS
IN HUMAN BLADDER CARCINOMAS**

Bladder cancers are among the most seen cancers all over the world. It is the 7th most seen cancer in males and 17th in females. It is the second most seen cancer after lung cancer and the most seen cancer among the urogenitalial cancers in males. It usually occurs in the 6th and 7th decades. Although the frequency rate of males to females is 3:1, it causes usually to death in females (31%). Ion channels located in the plasma membrane are responsible from cellular electrogenesis and electricity transmission. These channels are involved in performing the basic cellular functions like apoptosis, proliferation and differentiation to protect the tissue homeostasis. There are several main mechanisms in contributing to this critical process. These are the protection of membrane potential, to regulate the cell volume and the entrance of ions which provides the basic signal transduction. The basic reason of abnormal tissue development is transformation of malign cells, impaired differentiation and disrupted death ability. This results in uncontrolled spread and invasion. Transformation usually occurs by the changes in ion channel expressions. The result is the abnormal progression of cellular responses. Although some different expression and ion channel activities that regulate the formation and progression of cancer are suggested, to investigate the ion-channel related mechanisms in bladder cancer cells will be precious. 40 tissues of patients with transitional cell bladder cancer and 7 normal tissues of the same group are included to the study.

Immunohistochemical expressions and mRNA expressions of TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM7 and TRPM8 by real-time Polymerase Chain Reaction were studied. Immunohistochemically, only TRPM2 was expressed in all of the tissues (epithelium cells, tumor cells, muscle cells), no TRPM5 expression was detected. TRPM4, TRPM7 and TRPM8 expressions were detected only in epithelium cells. mRNA expression of TRPM7 was significantly higher in study group according to control group. mRNA expressions of TRPM5 and TRPM8 were lower in study group according to control group. There was no statistically significant difference for mRNA expressions of TRPM2 and TRPM4. The effects of TRP ion channels in the development of bladder cancer will be searched. TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM7 and TRPM8 can be important therapeutic targets for bladder cancer. We think that our results will provide new target genes for these ion channels at bladder cancer. So, in a later stage, these proteins can be targeted under invivo conditions and new bladder cancer therapy methods can be tried.

3. GİRİŞ

3.1. Mesane Tümörleri

Mesane kanseri en sık tanı konulan genitoüriner sistem tümörlerindedir. Genitoüriner sistem tümörleri içinde en sık görülen ikinci kanser türü mesane kanseridir (1). 2013 yılında, tahmini olarak 74690 yeni vaka (56390 erkek ve 18300 kadın) ve 15580 ölüme (11170 erkek ve 4410 bayan) neden olduğu bildirilmiştir (2,3). Dünyada tüm kanser türleri içinde görülme sıklığı açısından erkeklerde 4. kadınlarda ise 10. sıradadır. Ortalama görülme yaşı 73'tür (4). Hastaların yaklaşık %90'ı tanı anında 55 yaş üzerindedir. Erkek/kadın oranı 3:1'dir (4). T.C. Sağlık Bakanlığı 2005 verilerine göre 100.000'de 9.59 insidans ile Türkiye'de en sık görülen kanserler arasında 6. sıradadır (5). 2006 yılında İzmir'de Kanser İzlem ve Denetim Merkezi tarafından yapılan çalışmanın verilerine göre erkekler arasında en sık görülen kanser olduğu belirlenmiştir. Erkeklerde insidansı yüzbinde 27,5, kadınlarda yüzbinde 3,8 olarak raporlanmıştır. Hastaların çoğunluğu başlangıçta noninvaziv mesane kanseri olarak tanı alsalar da, bunların %25'i zamanla invaziv forma dönüşmektedir, %5'i ise metastatik hastalığa dönüşmektedir. Yüksek rekürrens oranından dolayı hastalığın cerrahi ve medikal tedavisi oldukça önemlidir (6,7). Sigara içme, mesane tümörü etyolojisinde önemli bir risk faktörü olduğu gibi ayrıca önemli bir prognostik faktördür. Sigara içme yanında pulmoner, kardiyovasküler ve periferel damar hastalığı da varsa prognoz daha kötüdür (8). Bir çalışmada sigara ile mesane tümörünün evresi, derecesi, tümör çapı ve tümör sayısı arasında ilişki saptanmış (9), bir başka çalışmada ise aynı parametrelerle sigara arasında ilişki

bulunmamıştır (10). Yüzeyel mesane tümörlü hastalarda geç nüksler meydana gelmektedir. Bu nükslerin bir sebebi de sigaradır. Sigara içenlerin %50'sinde geç meydana gelen nüks görülmektedir. Geç nüks meydana gelen hastaların %70'i ise ağır sigara içen gruptadır (9,10).

20 yaşlarına kadar görülen mesane tümörleri genellikle iyi differansiye ve invazyon yapmayan tümörlerdir, bu yüzden prognozları daha iyidir (11). Nüks açısından 31–40 yaş arasındaki hastalarla diğer grup hastalar arasında fark bulunmamaktadır. Mesane kanseri tanısını yeni almış olguların yaklaşık olarak %70'i kasa invaze olmayan kanser türündedir. Çeşitli tedavilere rağmen (endoskopik ve intravezikal), kanserlerin %50–70'i tekrarlar, %10–30'u ise kasa invaze olur. Hastalığın tekrarı çoğunlukla ilk 5 yıl içinde görülür. Tümörün ilerleme riski, yüksek dereceli lezyonlarla doğrudan ilişkilidir. Mesane tümörü tarama programı popülasyonda önerilmemektedir (12).

3.1.1. Etyoloji

Mesane kanseri etyolojisinde;

- Sigara
- Boya fabrikalarında kullanılan anilin boyaları
- Siklofosfamid
- Aromatik aminler (Benzidin, beta naftilamin, 4 aminobifenil gibi)
- Yüksek arsenik seviyeleri (özellikle içme sularındaki)
- Pelvik radyoterapi
- Kronik idrar yolu enfeksiyonu ve/veya kronik irritasyon

- Mesane enfeksiyonu (*Schistosoma haematobium* paraziti) gibi faktörler yer alır (13,14,15)

3.1.2. Tümör morfolojisi

Mesane tümörleri papiller, solid, infiltratif, mikst veya intraepitelyal olarak gelişebilirler. Tümör tanısı yeni konulmuş ise, tümör %75-80 oranında papiller, %10-15 oranında solid, %5-10 oranında ise mikst yapıdadır. Tümör solid görünümlü ise tekrar riski daha fazladır. Yapılan bir çalışmada, başlangıç tümörü papiller olduğu takdirde hastaların yaşam süresinin, başlangıç tümörü solid olanlara göre daha uzun olduğu rapor edilmiştir (16). Son zamanlarda, farklı morfolojide tümör tipleri bildirilmiştir.

Mesane kanserlerinin yaklaşık %90'ını değişici hücreli karsinom (TCC) oluşturmaktadır. Fakat bunun yanında agresif davranışları ve alternatif tedavi gerektirmeleri nedeniyle diğer histolojik tipleri de önemlidir. Tamamen TCC tanısı almamış tümörler daha agresiftir, prognozları çok iyi değildir. TCC'lerin %10 kadarı glandular odak içerir. Fokal skuamöz diferansiyasyonu ise %60'ı göstermektedir. Dünyada, mesane kanserli erkek hastaların %1,3'ünde, kadın hastaların ise %3,4'ünde skuamöz hücreli karsinom (SCC) görülmektedir. SCC için de en önemli risk faktörlerinden biri sigara içiciliğidir. Hayvan ve insan kanında yaşayabilen trematodlar olan schistosomaların üç türü vardır. *S. mansoni*, *S. haematobium* ve *S. japonicum* olarak bilinmektedir. *S. haematobium*'un mesane kanseri ile ilişkili olduğu yönünde pek çok yayın bulunmaktadır. Adenokarsinomlar ise histolojik açıdan bütünüyle glandüler olan ürotelyumdan köken almaktadırlar ve kötü huylu tümörlerdir. İnsidansları %2'den az olmakla

birlikte erkek hastalarda kadın hastalara göre 2,6 kat fazla görülür, en sık olarak 6. dekatta görülür. Beş yıllık beklenen yaşam süresi adenokarsinomlarda %31-35 arasındadır. Mesane kanserlerinin farklı bir varyantı ise şeffaf hücreli adenokarsinomdur. Mezonefrik karsinom olarak da adlandırılır. Nadiren görülür, hastalar çoğunlukla kadındır, ortalama görülme yaşı 57 (22 – 83)'dir (17).

Tümör yerleşimi mesanenin farklı bölgelerinde olabilir ve bu bölgelerde gelişmeye devam eder. Transisyonel hücreli karsinom; en sık olarak %37 oranında yan duvarlardan gelişir. Bunu posterior duvar (%18), trigon bölgesi (%12), mesane boynu (%11), üreter orifisleri (%10), mesane kubbesi (%8) ve anterior duvar (%4) izler (18). Genel olarak kubbe yerleşimli tümörler yüksek dereceli iken, yan duvar ve üreter orifisinde lokalize olan tümörler düşük derecelidir. Mesane boynu yerleşimli tümörler, mesanenin farklı bölgelerindeki tümörlere göre kötü prognostik özelliktedirler. Tümörün farklı bölgelerde lokalize olması (prostatik uretra, posterior duvar veya mesane boynu gibi); hastalık belirtilerinin erken başlamasına neden olmaktadır. Bu bölgelerde yerleşen tümörler nüks bakımından daha fazla riske sahiptir (19).

3.1.3. Tanı

3.1.3.1. Semptomlar

Mesane kanserindeki en sık bulgu hematüridir. Bunun yanında sık idrara çıkma, ağrılı idrar yapma (dizüri) gibi işeme şikayetleri olabilir. Yan ağrısı veya diğer bulgular hidronefroz ilişkili olarak ortaya çıkabilir. İleri evrede ise daha çok

sistematik bulgular olan kilo kaybı, kemik ağrıları, alt ekstremitelerde ödem gibi bulgular ortaya çıkar (8).

3.1.3.2. Radyoloji

Mesane kanseri tanısı alan hastalarda tedavi düzenini belirlemede, evreleme oldukça önemlidir. Evrelemede radyolojik görüntülemenin de rolü vardır. Ultrasonografi, bu radyolojik görüntüleme yöntemleri içinde ulaşılması ve uygulaması en ucuz ve en kolay olan yöntemdir. Ayrıca klinik evrelemede önemli yeri olan diğer yöntemler de bulunmaktadır. Bunların arasında bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans (MR), volumetrik MR veya BT yardımıyla mesanenin 3 boyutlu görüntüsünün kullanılabilirdiği sanal sistoskopi ve pozitron emisyon tomografisi (PET/CT) bulunmaktadır (20).

3.1.3.3. Sistoskopi

Mesane kanseri tanısını koymada sistoskopi, oldukça değerli bir muayene şeklidir. Fakat bazı lezyonlar, örneğin yüzeysel veya karsinoma in situ (CIS), klasik sistoskopi esnasında atlanabileceği için, böyle tümörlerin tanısında farklı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, 5-aminolevulinik asit (5-ALA) ile yapılan flüoresan sistoskopidir (20).

3.1.4. Evreleme

3.1.4.1. Patolojik Evreleme

Mesane kanserinde kullanılan TNM sınıflaması aşağıda gösterilmiştir (20):

Primer Tümör (T)

- TX: Primer tümör değerlendirilemiyor.
- T0: Primer tümöre ait kanıt yok.
- Ta: İnvaziv olmayan papiller karsinom.
- Tis: Karsinoma in situ.
- T1: Tümör epitel altı dokuyu tutmuş.
- T2: Tümör kas dokusunu (muskularis propria) tutmuş.
- T2a: Tümör yüzeysel kas (iç yarı) dokusunu tutmuş.
- T2b: Tümör derin kas (dış yarı) dokusunu tutmuş.
- T3: Tümör perivezikal dokuyu tutmuş.
- T3a: Mikroskopik olarak.
- T3b: Makroskopik olarak (ekstravezikal kitle).
- T4: Tümör; prostat, uterus, vajen, pelvik duvar, abdominal duvar gibi yapıları tutmuş.
- T4a: Tümör prostat, uterus veya vajeni tutmuş.
- T4b: Tümör pelvik duvar veya abdominal duvarı tutmuş.

N – Lenf Nodları

- NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor.
- N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
- N1: Gerçek pelviste tek bir bölgesel lenf nodu metastazı (hipogastrik, obturatuvar, eksternal iliak veya presakral lenf nodu).
- N2: Gerçek pelviste birden fazla bölgesel lenf nodunda metastaz (hipogastrik, obturatuvar, eksternal iliak veya presakral lenf nodu).
- N3: Lenf nodu metastazları ana iliak lenf nodlarında.

M – Uzak Metastazlar

- MX: Uzak metastazlar değerlendirilemiyor.
- M0: Uzak metastaz yok.
- M1: Uzak metastazlar.

Evrelemede artık yüzeysel ifadesi artık kullanılmamaktadır. Bunun yerini kasa invaze olmayan hastalık ifadesi almıştır. Muskularis propria'yı invaze etmeyen tümörler, kasa invaze olmayan tümörler olarak adlandırılırlar. Lamina propriayı invazyonu gösteren lezyonlar (T1) ve mukozaya sınırlı lezyonlardır (Ta ve CIS). Yüzeysel, yüksek dereceli, invazyon göstermeyen mesane kanseri için karsinoma in situ (CIS veya Tis) terimi kullanılmaktadır. Tedavi olmadığı takdirde, 5 yıl içinde nüks ve ilerleme riski oldukça yüksektir (20).

Mesane duvarını aşarak perivezikal yağa geçen hastalar (T3), organa sınırlı hastalara göre (T2a ve T2b) daha kötü bir prognoz gösterirler. Üretelyal karsinomlar prostatı invaze ettikleri takdirde (T4a) klinik açıdan sorunlu vakalardır, bu durumda birden çok tedavi modeline ihtiyaç duyulur. Çalışmalar sağkalımın yüksek evreli hastalıklarda kötüleştiğini göstermiştir. Primer mesane tümörünün patolojik evresinin artmasıyla lenf nodu tutulumunun insidansı artmaktadır. Lenf nodu pozitif hastalarda 5 yıllık sağkalım (%34) belirgin şekilde kötüdür. Eksternal iliak, hipogastrik, obturator ve presakral lenf nodları primer lenf nodlarıdır; ana iliak lenf nodları ikincil lenf nodlarıdır ve primer lenf nodlarının drenaj bölgesi olarak görev alırlar. Rekürrens riskini ve sağkalım sonuçlarını tahmin etmede TNM sınıflaması yararlı bilgiler sağlamaktadır, fakat her bir TNM grubu içinde, tümör biyolojisinin ve hastaların özelliklerinin heterojen olması, belirgin farklılıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. TNM

sınıflaması faydalı bilgiler sunmaktadır, fakat hastaların aşırı tedaviye maruz kalmamaları için düşük rekürrens riski olanları ve daha agresif tedavi gerektiren progresyon riski yüksek hastaları ayırmada daha iyi değerlendirme kriterlerine ihtiyaç vardır (20).

Daha önceden, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1973 yılında yayınladığı sınıflandırma ürotelyal malignitelerde en sık kullanılan sınıflandırma biçimi iken, bu sınıflandırma 2004 yılında WHO ve Uluslararası Ürolojik Patologlar Birliği papiller neoplaziler için olan bu sınıflandırmayı gözden geçirerek yenilediler (21).

3.1.4.2. WHO Sınıflamaları

1973 WHO sınıflaması

- Ürotelyal papillom
- Derece 1: İyi diferansiye
- Derece 2: Orta diferansiye
- Derece 3: Kötü diferansiye

2004 WHO sınıflaması

- Ürotelyal papillom
- Düşük malignite potansiyeline sahip papiller ürotelyal neoplazi
- Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom
- Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom

Evrelendirme tüm tümör olgularında olduğu gibi, mesane tümörleri için de tedavi yaklaşımında önemli bir rol oynamaktadır. Evrelendirmenin en önemli ve temel

aşaması; ilk olarak yapılan transuretral rezeksiyon (TUR) sonrasında tümörün derinliğinin saptanmasıdır. Histolojik kesitleri yorumlayan patoloğlar arasında, özellikle tümörün grade ve derinliğini yorumlamada farklı fikirler oluşabilir. Bu fikir farklılıkları başlıca kas tabakası invazyonu ve perivezikal yağ dokusu invazyonu hakkında olabilir. İşte bu sebeple tümör vakalarında evrelendirmeye en doğru şekilde karar verilmesi, en etkin tedavi şeklinin belirlenmesinde de önemlidir. Son zamanlarda, evrelendirmede “Union International Contre le Cancer” (UICC) tarafından yapılan 2002 TNM sınıflandırması daha çok kullanılmaktadır (22).

Yüzeysel mesane tümörlerinin invazyon durumları birbirinden farklıdır. Bu tümörlerin %70'i mukozaya (Ta) sınırlıdır. Yaklaşık %30'u ise submukozal invazyon (T1) göstermektedir (15). Tekrar riski 5 yıl içinde T1 tümörlerde %95 civarındadır, bu oran Ta tümörlerde daha düşüktür (23). Ayrıca, T1 tümörlerde ilerleme riski daha fazladır, bu risk %15-20 civarındadır (24). Yapılan birkaç çalışmada yüzeysel mesane tümörlerinin tekrarlama riski incelenmiş ve ilk 1 yılda tekrar riski %33-56.9 (13), ilk 2 yılda %15-70, ilk 3 yılda ise %55 şeklinde raporlanmıştır (25). 2 yıl sonrası gelişen tekrarlar daha çok belirli bir tıbbi öyküsü olan olgularda (örneğin sigara içimi) gelişmektedir (9). T1 tümörler için 3 yıllık tekrar oranı %60 iken, Ta tümörler için %48 olarak saptanmıştır (26). Ta Grade I tümörlerde tekrar oranı %55 iken, bu tekrarların %46'sı ilk bir yılda, %13'ü 1-2 yıl arasında, %27'si ise 2-5. yıllar arasında gelişmektedir. 4 yıllık bir dönemden sonra yüzeysel tümörlerde nüks görülmesi, bu tümörlerdeki tekrar etme riski hakkında yardımcı olmaktadır (27). Beş yıllık bir süreden sonra da tekrar riski bulunmaktadır, bu risk oranı %14'tür. Bu sebeple bu gruptaki hastaların takibini 5

yıllık bir süreç sonrasında da sürdürmek faydalı olabilir. Birkaç çalışmaya göre, evrelendirme ve tümör derecesinin tekrar açısından anlamlı bir prognostik faktör olmadığı bildirilmiştir (28).

Mesane tümörlerinde sınıflandırma tümörün histolojik özelliklerine göre yapılırken, derecelendirme ise tümörün biyolojik davranışını ele alarak yapılmaktadır. Mesane tümörleri için derecelendirmede normal epitelyum yapısına benzerlik esas alınır, tümörün epitelial ve hücrel özelliklerine bakılarak evrelendirilir. Mesane tümörü için belirli ve tek bir derecelendirme sistemi yoktur. “World Health Organization ve International Society of Urological Pathology” (WHO/ISUP) tarafından 1998 yılında bir uzlaşma sağlanmış ve mesanenin ürotelyal hücreli tümörleri için yeni baştan derecelendirme yapılmıştır (29). Bu derecelendirmede; iyi derece diferansiye (grade 1) ve orta derece diferansiye (grade 2) tümörler düşük derecede (low grade) ürotelyal karsinom şeklinde isimlendirilmiştir. Tümörün derecesi arttıkça yüzeysel mesane tümörünün tekrar ihtimali de artmaktadır. İlk bir yılda oluşan tekrarlarda, tümörlerin grade I ve grade II evreleri arasında tekrar bakımından ciddi bir fark görülmezken (%30-38); grade III olanlarda tekrar oranı %70 civarındadır (30). Grade I-II ve Ta tümörlerde nüks ilk üç ay içinde gerçekleşmezse, izleyen on yılda nüks oluşmama ihtimali %80’dir, ilk üç ay içinde gerçekleşmişse yeni bir tümör gelişim ihtimali %70’e çıkmaktadır (26). Grade 1 tümörler için ilk üç yılda nüks riski %50 iken, bu oran grade II tümörler için %59’a, grade III tümörler için ise %80’e kadar yükselmektedir. Yüzeysel mesane tümörlerinin düşük dereceli ve düşük evreli olanlarında tekrar oranı %50-75 iken, ilerleme ihtimali %5’ten düşüktür. Lamina proprianın invaze olduğu, sıklıkla CIS olan yüksek dereceli tümörler için ilerleme

oranı yaklaşık olarak %30–50 arasındadır. Yapılan bir çalışmada, Ta ve T1 tümörleri, iki farklı sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflandırmada yüksek ve düşük dereceli tümörler bulunmaktadır. Yüksek dereceli tümörlerin prognozunun daha kötü olduğu, evre ile mitotik indeksin arasında ciddi bir bağlantı bulunduğu bildirilmiştir (30). Diğer birkaç çalışmaya göre tümörün derecesi ile ilk yılda meydana gelen tekrar arasında bir ilişkinin olmadığı saptanmıştır (26).

3.2. Mesane Tümörü ve İyon Kanalları

Plazma membranında yer alan iyon kanalları hücresel elektrogenез ve elektrik iletiminden sorumludur. Bu kanallar apoptoz, proliferasyon ve farklılaşma gibi doku homeostazının korunması için gerekli olan tüm temel hücre davranışlarının yerine getirilmesinde görev almaktadırlar. İyon kanallarının bu kritik süreçlere katkısında birkaç ana mekanizma vardır. Bunlar membran potansiyelinin korunması, hücre volümünün düzenlenmesi ve temel sinyal iletimini sağlayan iyonların girişidir. Artmış proliferasyon sonucu malign hücrelerin transformasyonu, bozuk farklılaşma, ölüm yeteneğinin bozulması anormal doku gelişiminin temel sebebidir. Bunun sonucunda kontrolsüz yayılım ve invazyon gerçekleşebilmektedir (31).

Tümör progresyonu, hücre proliferasyonu, apoptoz, migrasyon, invazyon ve anjiogenez gibi fizyolojik süreçlerin değişimi sonucunda oluşur. Bu süreçler, kalsiyum homeostazı ve transient reseptör potansiyel (TRP) katyon kanalları kontrolü altındadır (32). İyon kanalları, önemli ölçüde de TRP kanalları, birçok fizyolojik süreçte yer almaktadır. Bu kanalların, kanser gibi bazı ciddi hastalıklarla da ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kanser başlangıcı ve progresyonu

sürecinde, bir veya daha fazla TRP proteininin değişmiş ekspresyonu önem arz etmektedir (33).

Transient reseptör potansiyel (TRP) kanalları ilk defa *Drosophila*'da tanımlanmıştır (34). TRP geni ürünü 1989'da klonlanmıştır ve TRP ailesinin kurucu üyesi olan ve Ca^{2+} 'a geçirgen olan bir katyon kanalını kodlar. TRP kanallarının bazı ortak özellikleri vardır. Hepsi katyon selektif kanallardır. Genel olarak, homo- ve heterotetramerler olarak fonksiyonel kanalları oluşturan 4 subunitten oluştuğu düşünölmektedir. Hücresel seviyede, multifonksiyonel algılayıcılar olarak fonksiyon görürler. Fiziksel veya kimyasal uyarılar ve spesifik ligandların bağlanmasıyla aktive olurlar. TRP gen mutasyonuna sahip olan fotoreseptörler sürekli ışığa maruz bırakıldıklarında fazik olarak (transient) voltaj değişikliğine yol açmaları nedeniyle bu isim verilmiştir. Farklı türlerde, 50'den fazla TRP kanalı tanımlanmıştır (35). Memelilerde 20'den fazla TRP kanal tipi tanımlanmıştır (33). Bu kanal ailesinin iyon kanalları ısı ve/veya mekanik gibi çok değişik formdaki uyarılarla aktive edilirler. Sekans homolojisine bağlı olarak 28 memeli TRP'si, 6 alt gruba ayrılır. 1) vanilloid reseptör ailesi (TRPV), 2) Kanonikal (TRPC) , 3) melastatin (veya uzun) TRPM, 4) polisitinin. (TRPP), 5) mukolipinin (TRPML), 6) Ankirin (TRPA) (36,37).

TRP kanalları, yüksek derecede değişken aktivasyon mekanizmalarıyla karakterize olan selöler algılayıcılarıdır. Farklı TRP genlerindeki mutasyonlar, çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. TRP kanalları, mesane disfonksiyonu tedavisinde de potansiyel farmakolojik hedefler olarak önemlidir. Ürotelyum, üriner mesane duvarı içyüzünde uzanan kompleks bir epitelyal hücre tabakasıdır. Ürotelyal

hücreler, pek çok iyon kanalını eksprese ederler, bunların arasında TRP kanalları da bulunmaktadır. (37).

TRP'ler, normal mesane fizyolojisinde yer alırlar. Bu kanalların aşırı ekspresyonu veya disfonksiyonu patofizyolojik süreçlere, bu da fonksiyonel mesane bozukluklarına neden olur. Mesanedeki TRP kanalları hakkındaki araştırmalar henüz yeterli değildir ve bu kanallara ilişkin çalışmalar, moleküler mekanizmalar hakkında bize yardımcı olacaktır. TRP kanalları ayrıca hücre farklılaşması, büyümesi ve apoptozda da yer alır. Bildiğimiz gibi Ca^{2+} artışı hücrelerde apoptozu indükler. Bu yüzden, tümör hücresi membranında lokalize olan TRP kanalları ilaç terapisi, immunoterapi ve hatta gen terapisinde yeni hedefler olacaktır. Bu kanalların farklılaşma ve karsinogenez esnasındaki ekspresyon değişiklikleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu kanalların ekspresyon yolları, karsinogeneze katkıları ve kanser tedavisinde TRP agonistlerinin uygulamaya konmasıyla ilgili araştırmalara ihtiyaç vardır (35).

TRPM alt grubu, potansiyel bir tümör supresor olarak tanımlanan bir proteinden olan melastatinden adını almaktadır. Bu gruba ait 8 protein tanımlanmıştır. TRPM alt grubunun birçok üyesi kalsiyuma geçirgendir ve kalsiyumla aktive olan proteinlerdir (38,39). TRPM iyon kanallarındaki değişiklikler fizyolojik fonksiyonları etkileyerek, patolojik süreçlerin oluşumuna zemin hazırlar (40).

3.2.1. TRPM2 Kanalı

TRPM2 geni kromozom 21q22.3 üzerinde lokalizedir. TRP kanallarının çoğunda olduğu gibi TRPM2 kanalları voltaj kapılı olmayan katyon kanallarıdır ve önemli bir ikinci haberci olan Ca^{2+} 'a önemli geçirgenlikleri vardır (41). TRPM2 kanalı intrasellüler N ve C uçlarına sahip olan 6 transmembran alanı içermektedir. TRPM2 kanalları en fazla hipokampus, serebral korteks, talamus ve orta beyin bölgeleri olmak üzere merkezi sinir sisteminde yoğun olarak eksprese edilmektedir (36,42). Kemik iliği, dalak, kalp, lökosit, karaciğer, akciğer ve pankreas gibi çok sayıda insan dokusunda eksprese edildiği belirlenmiştir (43). TRPM2 ve TRPM8 düşük sekans homolojisine sahiptir ve herhangi bir alt gruba dahil edilmemişlerdir. Kanser hücrelerindeki fazla TRPM2 düzeyleri, hücre proliferasyonu ile ilgili olarak enzimatik bir fonksiyona sahip olabilir (44). Zeng ve arkadaşları eksik TRPM2'nin bir endoplazmik retikulum kalsiyum kanalı olarak rol oynayabileceğini ifade etmiştir (45). İntrasellüler kalsiyum regülasyonu hücre replikasyonu ve apoptozu düzenleyen temel mekanizmalardan biri olup tümör oluşumunda temel bir role sahiptir. TRPM2'nin inhibisyonu bu reseptörün eksprese olduğu beyin ve periferik kan hücreleri gibi hücrelerde yaşamın devam etmesinde faydalı olabilir (46). Bu proteinlerin nükleusa transmigrasyonun veya ekspresyonunun seçici olarak baskılanması normal hücreler üzerinde herhangi bir etki oluşturmazken kanser hücrelerinin apoptozunu sağlayabileceğinden kanser için önemli bir terapötik hedef konumundadır (46). Ancak TRPM2 inhibitörlerinin kanser hücrelerinde nasıl bir etki göstereceği bilinmemektedir ve bu alanda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

3.2.2. TRPM4 ve TRPM5 Kanalları

TRPM4, intraselüler Ca^{2+} ile aktive edilen nonselektif bir katyon kanalıdır. Beyin, plasenta ve testis cDNA kütüphanesinin taranmasından sonra 2001'de klonlanmıştır (47). TRPM4, arteriyel endotelial hücreler, venöz endotelial hücreler, immun sistem hücreleri, nöronlar, düz kas hücreleri, pankreatik islet- β hücreleri gibi birçok dokuda eksprese olmaktadır. TRPM4 ilk olarak Launay ve arkadaşları tarafından klonlanmış ve tanımlanmıştır (48). TRPM4 geni, 19q13.33 üzerinde lokalizedir (49). TRPM5 monovalent spesifik bir katyon kanalıdır (50). TRPM5, cAMP kaskadında aşağı yönde olan bir hedeftir (50). TRPM5 iyon kanalı, tat reseptör hücrelerinde fonksiyon görür ve fosfolipaz C'ye bağlı G-protein ilişkili reseptörlerle aktive olduğu bildirilmiştir. TRPM5 geni 11p15.5 üzerinde lokalizedir (49). TRPM5'i düzenleyen spesifik mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır (46). TRPM4 ve TRPM5 kanalları Ca^{2+} 'a geçirgen değildir. Fakat Ca^{2+} , aktivitelerinde önemli yer tutar, çünkü her iki kanal internal Ca^{2+} 'un artışıyla aktive olur. Bu yüzden, TRPM4 ve TRPM5 pek çok dokuda bulunan Ca^{2+} -aktive non selektif katyonik akımlardır. Aktivasyonları, hücre membranı depolarizasyonunu indükler ve hücre fizyolojisini kuvvetli olarak etkiler (50).

Son yıllarda, sürekli eksprese edilen TRPM4 kanalının insülin sekresyonunda, immun yanıtta, serebral arter tıkanıklığında, nöron aktivitesinde ve kardiyak disfonksiyonda da etkisi olduğu bildirilmiştir (51). Buna karşın, ekspresyonu daha sınırlı olan TRPM5'in tat iletiminde görev aldığı bildirilmiştir. TRPM8, TRPM1, TRPM4 ve TRPM5'in farklı kanserlerde ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (52).

3.2.3. TRPM7 Kanalı

TRPM7 ilk olarak Nadler ve arkadaşları tarafından klonlanmıştır (53). TRPM2 kanalı ile heterodimer yaptığı bilinmektedir. Kanal, 15q21.2 üzerinde lokalizedir. Fare ve insanda TRPM7 kanalı %95 oranında yüksek bir homolojiye sahiptir. 39 ekzona sahip olan 85kb'lik bir DNA bölgesini kapsamaktadır. İnsanda 1864 aminoasitlik ve farede 1863 aminoasitlik büyük bir protein kodlamaktadır. Protein yaklaşık 212 KDa'dur. 6 transmembran alanına sahiptir. Fosfatidilinositol 4,5-fosfat (PIP2), ile etkileşen TRPM7 diğer bazı kanalların pozitif düzenleyicisidir. Kanalin C ucu atipik serin/threonin protein kinaz alanına sahiptir. Ancak bu kinaz alanı direkt kanalın aktivitesi ile ilişkili değildir (54).

TRPM7, endotelial hücreler (55), monosit (56), nöron (57,58,59), osteoblastlar (60,61), mezenkimal kök hücreleri (62) ve vasküler düz kas hücreleri (63) gibi, hemen hemen tüm dokularda eksprese olmaktadır. Diğer TRPM kanalları ile karşılaştırıldığında dokulardaki ekspresyon düzeyi daha yüksektir. Özellikle hipokampus ve kolinerjik veziküllerde ekspresyonu tespit edilmiştir. Seçici olmayan bir katyon kanalıdır. Özellikle kalsiyum ve magnezyum gibi divalent katyonlara geçirgendir. Kanal aktivitesi ekstrasellüler Ph tarafında düzenlenmektedir. TRPM7'nin hücre proliferasyonunda etkili olduğu tespit edilmiştir (54). TRPM7 kanalları, yeni Ca^{+2} -geçirgen non-selektif katyon kanallarıdır. TRPM7 kanallarının aktivasyonu, hücresel Mg^{2+} homeostazında, anormal magnezyum absorpsiyonunun neden olduğu hastalıklarda ve iskemik koşullar altında Ca^{2+} ilişkili nöronal hasarlarda yer aldığı gösterilmiştir. TRPM7 kanalları, ayrıca hücresel çinko (Zn^{2+}) homeostazı ve Zn^{2+} ilişkili nöronal hasarlarda da önemli bir rol oynamaktadır. Transient reseptör potansiyel

melastatin 7 (TRPM7), hemen her doku ve hücre tipinde eksprese olan büyük TRP kanalı ailesinin bir üyesidir. TRPM7 kanallarının artan aktivasyonunun çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlere katkıda bulunduğu dair çeşitli bilgiler bulunmaktadır (64). TRPM7 kanalları, Zn toksisitesinin önemli bir yer aldığı nörolojik hastalıklarda yeni bir hedef olabilir (65).

Hücre Mg homeostazının ana faktörleri olan TRPM7 ve TRPM6 kanallarının tanımlanması, Mg araştırmalarında çok önemli bir yer tutmaktadır. TRPM7 ve TRPM6'nın öyküleri oldukça karmaşıktır. TRPM7 hücresele seviyede Mg homeostazının hazır bir kapıcısı olarak görev görürken, TRPM6 ise kolon mukozası ve böbrek tübüllerine spesifiktir. Bazı dokularda, iki kanal birlikte eksprese olur, heteromerler oluştururlar, bunlar da fonksiyonel ilişkileri hakkındaki soruları gündeme getirir. Endotelial hücrelerde TRPM7'nin sessizleştirilmesi beklenmedik bir şekilde hücre proliferasyonunu artırır. Memeli tümör hücrelerinde, TRPM7 ilişkili hücre proliferasyonunun Mg transportundan ziyade, Ca girişiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Her iki kanalı eksprese eden memeli epitelyal hücrelerinde, sadece TRPM6 extraselüler Mg değişikliklerine cevap verir. Bu iki kanalın Mg transportundaki rolünün hücreden hücreye değiştiği düşünölmektedir. TRPM7 ve TRPM6'nın bu rolü, yeni antikanser terapötik stratejilerde önemli bir yer tutmaktadır (65).

TRPM7, hücresele canlılıkta önemlidir ve eksprese edilir. İntraselüler Mg ve Ca dinökleotidleriyle inhibe edilir. Everaerts ve arkadaşlarına göre, ürotelyal hücrelerde TRPM7'nin aşırı bir ekspresyonu söz konusu iken, benzer fonksiyonel özelliklere sahip olan ve TRPM7'ye yakın bir homolojisi olan TRPM6 mRNA'sı

ürotelyal hücrelerde bulunamamıştır. TRPM7 plazma membranında sitoplazmik veziküller olarak bulunmaktadır (37,66).

3.2.4. TRPM8 Kanalı

TRPM8 kanalı, bir katyon kanalıdır ve fiziksel şartlarda plazma membranı depolarizasyonuna neden olan Ca^{2+} ve Na^{+} 'un plazma membranından geçişini kolaylaştırır. TRPM8 geni 2q37.1 üzerinde lokalizedir (49). “Melastatin” TRP ailesinden olan TRPM8 (Cold/menthol-sensitive), karsinogenezde önemli bir rol oynamaktadır (67,68). TRPM8-mRNA bazı fare genitoüriner trase dokularında tanımlanmıştır (69). TRPM8- immunoreaktif sinir lifleri insan üriner mesanesinde de gösterilmiştir (70). Bu yüzden, TRPM8 mesane soğuk termoreseptörü olarak düşünülmesine rağmen, mesane affarent nöronlarında TRPM8'in ekspresyon modeli tam olarak bildirilmemiştir (67).

TRPM8, prostatta bazal epitelyal hücrelerin hücre membranında lokalize olarak eksprese edilmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda, ayrıca testis, penis, mesane ve dorsal kök gangliyon dokusunda da bulunduğu gösterilmiştir. İnsan ürogenital trasesinde, TRPM8 testis, seminiferöz tübüller, skrotal deri ve mesanede eksprese olmaktadır. Stein ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre, insan mesanesinde TRPM8 ekspresyonu ürotelyuma sınırlıdır (35). Spinal kord lezyonlu hastalarda, mesaneye buzlu soğuk su infüzyonu detrusor kası kontraksiyonuna neden olur. Bu işlem tanısal bir test olarak kullanılabilir. Bu refleksin TRPM8 gibi soğuğa sensitif olan TRP kanallarıyla ilişkili olabildiği düşünülmektedir (52).

3.3. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmadaki amacımız, ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülen ve belirli ölüm nedenleri arasında bulunan mesane kanserinin TRPM kanalları ile ilişkili olup olmadığını belirlemek, elde edilecek verilerin mesane kanseri tedavisine hizmet edecek şekilde kullanılmasına yardımcı olmaktır.

4.GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Hastaların Seçimi

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunca onaylanan çalışmada (Etik kurul no: 09/08, 10.05.2012), hastalar Ankara ili ve çevresinde yaşayan, Türkiye Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği ve Ankara Atatürk Hastanesi Tıbbi Genetik ABD'na başvuran bireylerden seçilmiştir. Primer olarak tümör tespit edilmiş hastalar çalışmaya dahil edilirken, nüksü olan hastalar çalışmaya dahil edilmediler. Tanısı diğer hastanelerde konulan hastalar da çalışma dışı bırakıldılar.

4.2. Kullanılan Aletler

- -20°C derin dondurucu: Arçelik, Türkiye
- -80°C derin dondurucu: Nuaire, Meksika
- Etüv: Gallenkamp, Economy Incubator Size, Ukrayna
- Falkon Tüp: Corning® 430766, 15 mL Centri füge Tube, Meksika
- Homojenizatör :Next Advance, Averill Park NY, Bullet Blender Storm, ABD
- Homojenizatör Boncuğu: Next Advance, GB05-RNA 0.5mm Dia, RNase-Free Glass Beads, ABD
- Mini Plate Spin: Labnet C1000, ABD
- Otomatik Pipetler: Socorex, Acura 825, İsviçre
- PZR ve Qubit tüpleri (0.6ml): Neptune, Katalog: 3737.S.X,Biotix Laboratory Media, İngiltere

- Plate Yapıştırıcı: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Optical Adhesive Film, ABD
- Plate: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Fast Optical 96-Well Reaction Plate With Barcode (0.1 mL), Singapur
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Biometra, Almanya
- Qubit® 2.0 Fluormeter: Invitrogen by life technologies, Avustralya
- Real Time- PZR: AB Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, CA
- Santrifüj: Sigma, Almanya
- Spin: Labnet International, Katalog No:C1031B-230V, Kore
- Vorteks: Elektro-Mag, Türkiye

4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 2-Merkaptoethanol: C_2H_6OS , Biotechnology Grade, AMRESCO, Katalog No:36/37/39.15, Ohio
- cDNA Kiti: AB Applied Biosystems, High- Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Part No:437522 REVB, Foster City, CA
- Qubit® RNA Kiti: Invitrogen/Molecular Probes, Qubit® RNA Assay kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer, ABD
- RNA Kiti: Invitrogen, Ambion by life technologies™ , PureLink™ RNA Mini Kit, Katalog No: 12183018A, ABD
- TaqMan® Gene Expression Master Mix: AB Applied Biosystems, Katalog No:4369016, ABD

- Temizleme Solüsyonu: Bioshop, Nuclease Removal Reagent (500 mL), Kanada

4.4. Kullanılan Yöntemler

4.4.1. Total RNA İzolasyonu

4.4.1.1. Kullanılan Çözeltiler

- i) Lizis buffer: Kullanıma hazır şekilde kitin içinde bulunuyor.
- ii) Wash I: Kullanıma hazır şekilde kitin içinde bulunuyor.
- iii) Wash II: Kullanıma hazır şekilde kitin içinde bulunuyor.
- iv) %70'lik etanol

4.4.1.2. İzolasyon

Mesane tümörü tespit edilmiş hastaların tümörlü dokularının parafin bloklarından RNA izolasyonu için PureLink™ RNA Mini Kiti kullanıldı. Çalışma prosedürü aşağıdaki gibidir:

Kit içerisindeki lizis buffer'dan 1ml ve 2-merkaptoetanol'dan 10 µl falkon tüpüne alınıp karıştırılarak Lizis tampon çözeltisi elde edildi. Tümör dokusu, doku ile eşit miktarda homojenizatör boncuğu ve hazırladığımız çözeltilerden 600µl alınarak kilitli eppendorf tüplere bırakıldı. Homojenizatörde 3 dakika (dk) 8. hızda parçalama işlemi yapıldı. Örnekler 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. RNA içeren sıvı fazın hepsi yeni bir eppendorfa alınarak üzerine 500 µl %70'lik etanol eklendi ve vortekslendi. Örneklerden 700 µl alınarak kit

içerisindeki kolonlara aktarıldı ve 12.000xg'de 15 saniye(sn) oda sıcaklığında santrifüj edildi. Kalan örneklerde kolonlara aktarılarak aynı şekilde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpünün altında biriken sıvı boşaltıldı. Yıkama işlemleri kitin içindeki Wash I ve Wash II ile yapıldı. Örneklere 700 µl Wash I eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Toplam tüpü değiştirildi. Örneklere 500 µl Wash II eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi ve bu işlem iki defa tekrarlandı. Tüpün altındaki sıvı boşaltılarak hiçbir şey eklenmeden 12.000xg'de 2 dk santrifüj edildi. Kolonlar alınarak yeni eppendorf tüplere bırakıldı ve üstüne 30 µl RNase içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletildi ve 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Eppendorf tüpün dibindeki sıvı kısım bu aşamadan sonra RNA içermektedir. RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

4.4.1.3. Spektrofotometrik RNA Ölçümü:

RNA ölçümü için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer (İnvitrogen/Molecular Probes) kullanıldı. RNA miktarı µg/ml olarak ölçüldü. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı.

4.4.2. Komplementer DNA Sentezi

4.4.2.1. Kullanılan Çözeltiler

High- Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti: Kit içinde 10X RT Buffer, 25XdNTP mix, 10XRT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase hazır halde bulunmaktadır.

4.4.2.2 İzolasyon

cDNA sentezi için RNA örneklerinden 10 µl kullanıldı. cDNA sentezi toplam 20µl hacimde gerçekleştirildi. Sentez için 10µl RNA örneği, 2 µl 10XRT random primer, 2 µl 10XRT buffer, 0.8 µl 25XdNTP mix, 4.2 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 1µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve 4°C'de ∞ olacak şekilde cihazda bekletildi. Oluşan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Tablo 1: cDNA karışım miktarı

Bileşik	Hacim (µl)	Katalog No
10X RT Tamponu	2.0	4319981
25X dNTP karışımı (100mM)	0.8	4367381
MultiScribe™ Revers Transkriptaz	1.0	4319983
10XRT Random Primer	2.0	4319979
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4.2	
Reaksiyon toplamı	10.0	

Tablo 2: cDNA sentezi için uygulanan PZR programı

PZR	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

4.5. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Hedef Genlerin cDNA Amplifikasyonu:

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile amplifiye edildi. TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM7 VE TRPM8 genleri ile gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geninin belirlenmesi için aşağıdaki tabloda verilen primerler kullanıldı.

Tablo 3: RT-PZR' da kullanılan primerler

TaqMan Gene Expression Assay Gex: AB Applied Biosystems, ABD, 250µl	
Test	Katalog Numarası
Gapdh	Hs02758991_g1
TRPM2	Hs01066071_m1
TRPM4	Hs00214167_m1
TRPM5	Hs00175822_m1
TRPM7	Hs00918956_m1
TRPM8	Hs00375481_m1

Real Time PZR 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PZR Plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 2µl kondu. Buz üzerinde her

bir örnek için 5µl TaqMan Master Mix, 2.5 µl nükleaz içermeyen su ve 0.5 µl primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara kondu ve vortekslendi. Plate'deki cDNA örneklerinin üzerine 8µl hazırlanan karışımdan bırakılarak plate'in üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı. Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla Mini plate spin cihazında 1 dakika santrifüj edildi.

Tablo 4: RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

Bileşikler	Hacim(µl)X Örnek Sayısı
cDNA	2.0
Primer	0.5
TaqMan Mix	5.0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2.5
Toplam	10.0

Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PZR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 50°C'de 2 dakika, 95°C'de 10 dakika X 40 siklüs, 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 5: Uygulanan RT-PZR programı

RT-PZR X 40 döngü				
	1. Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Zaman	2dk	10dk	15sn	1dk

4.6. İmmünohistokimya

Hasta gruplarının parafin blokları immunohistokimya boyama yöntemi ile çalışıldı. Parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6’da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, USA) ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksid blok solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block , TA-125-HP, Lab Vision Corporation, USA).

PBS ile 3x5 dakika yıkanana dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA–125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulandıktan sonra 1/200 oranında dilue edilen TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM7, TRPM8 primer antikorlar (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) ile 60 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), TP–125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, Sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS–125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali

alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX 50 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. Skala bar: 50µm.

Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <25, 0.4:26-50, 0.6:51-75, 0.9:76-100) ve şiddeti (0:yok, +0.5: çok az, +1:az, +2: orta, +3:şiddetli) esas alınarak histoskor (histoskor= yaygınlık x şiddet) oluşturularak istatistiksel analizleri yapıldı.

4.7. İstatistiksel Değerlendirme

Bu tez çalışmasında istatistiksel değerlendirme; Fırat Üniversitesi Lisanslı (193.255.124.131) IBM SPSS 22.0 paket program kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Student's t testi kullanılmıştır. İmmünboyamaların gruplar arasında değerlendirilmesi için Independent Samples T Test uygulandı. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir (71).

5. BULGULAR

Çalışma grubu 56-78 (ortalama 67.35yaş) yaş aralığında iken, kontrol grubu 59-70 (ortalama 64.6 yaş) aralığında idi. Çalışma grubunda 33 erkek, 7 kadın; kontrol grubunda ise 5 erkek, 2 kadın bulunmaktaydı. Çalışmaya giren tüm hastaların onamları alındı. Ağrısız pıhtılı hematüri ve alt üriner sistem semptomu olan tüm hastalara genel anestezi altında tanısal sistoskopi yapıldı. Sistoskopiye takiben makroskopik tümör odakları rezeke edildi. Şüpheli odaklardan transüretral rezeksiyon ile biopsi alındı. Rezeksiyon ve biopsi sonucunda tümör çıkan hastalar çalışma grubunu, benign çıkan hastalar ise kontrol grubunu oluşturdular. Çalışma grubundaki hastaların tümü transisyonel hücreli mesane tümörü idi. 40 mesane tümörü olan hasta ve 7 kontrol grubu olmak üzere toplam 47 birey çalışmaya alındı. Çalışma grubundaki hastaların 37'si sigara (1 paket/gün) kullanıyordu. Kontrol grubunun tümü sigara bağımlıydı (anamneze göre 1 paket/gün). Bunun dışında çalışmaya dahil edilen tüm hastalarda ek komorbidite yoktu. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin demografik sonuçları Tablo 6'da özet olarak sunulmuştur.

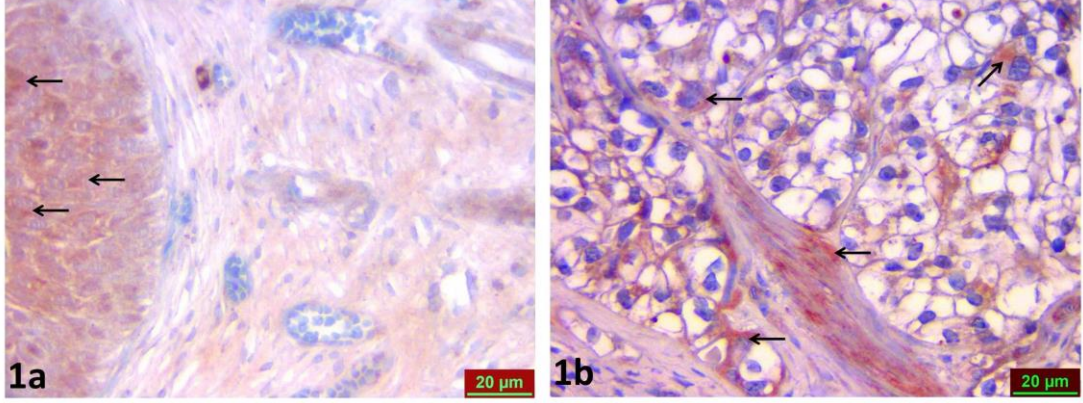
Tablo 6: Hastaların ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin demografik verileri

	N (sayı)	Ortalama yaş	Standart sapma	Standart hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
					Alt sınır	Üst sınır		
					Yüzeyel tümör	30		
İnvaziv tümör	10	66,70	7,056	2,231	61,65	71,75	57	77
Kontrol grubu	7	64,57	4,117	1,556	60,76	68,38	59	70
Toplam	47	66,94	5,870	,856	65,21	68,66	56	78

5.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

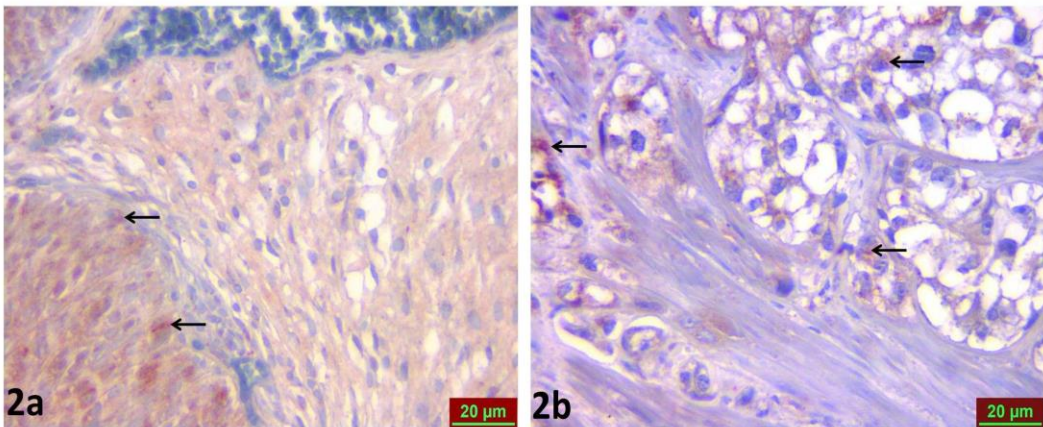
Çalışılan 5 farklı antikor için immunreaktivite sonuçları aşağıdadır. Her antikor için 4 kontrol ve 4 transisyonel hücreli mesane kanseri örneği çalışılmıştır. Çalışma ve kontrol grubu dokularının immunohistokimyasal olarak boyanmaları sonucunda TRPM2 immunreaktivitesi tüm dokularda (kanserli mesane dokusu, epitel hücreleri, mesane kas hücreleri, kas tabakasını invaze eden malign hücreler, damarların media tabakaları) izlendi. TRPM5 immunreaktivitesi hemen hiçbir dokuda gözlenmezken, TRPM4, TRPM7 ve TRPM8 immunreaktiviteleri sadece epitel hücrelerinde gözlendi (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5).

5.1.1. TRPM2 İmmünreaktivitesi



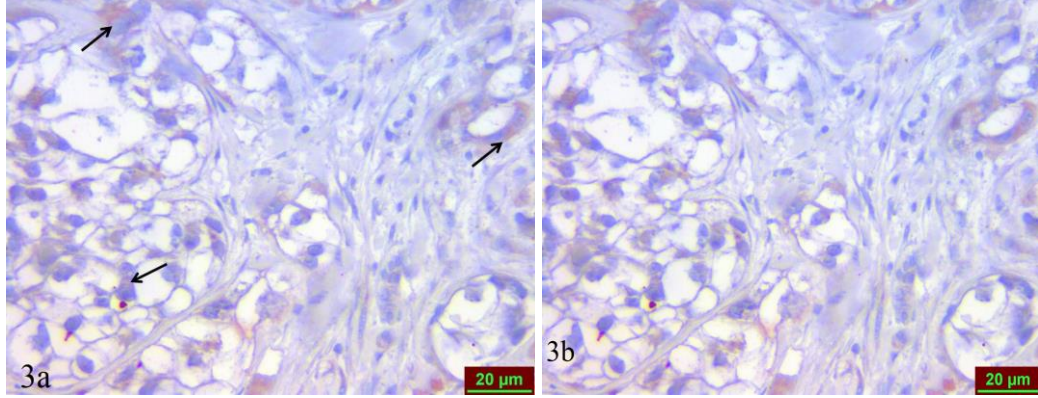
Şekil 1: TRPM2 İmmünreaktivitesi (Şekil 1a: Kontrol mesane dokusu epitel hücrelerinde TRPM2 immunreaktivitesi, Şekil 1b: Kanserli mesane dokusunda; epitel hücrelerinde, mesane kas hücrelerinde ve kas tabakasını invaze eden malign hücrelerde TRPM2 immunreaktivitesi).

5.1.2. TRPM4 İmmünreaktivitesi



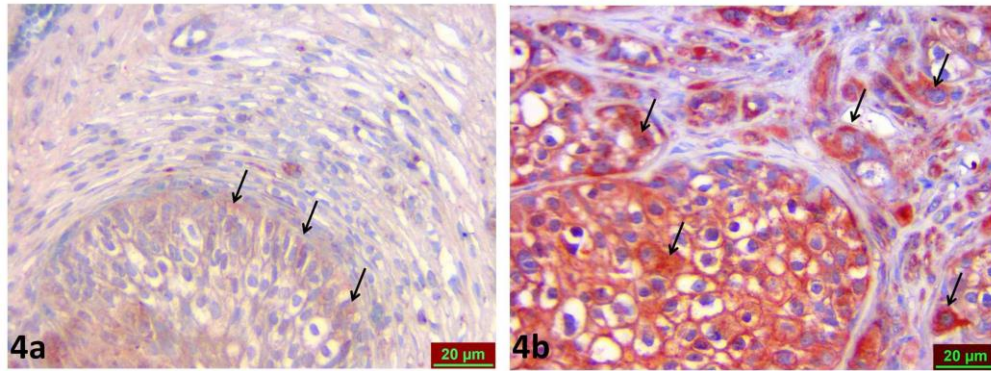
Şekil 2: TRPM4 İmmünreaktivitesi (Şekil 2a: Kontrol dokusu epitel hücrelerinde TRPM4 immunreaktivitesi, Şekil 2b: Kanserli mesane dokusunda; epitel hücrelerinde TRPM2 immunreaktivitesi)

5.1.3. TRPM 5 İmmünreaktivitesi



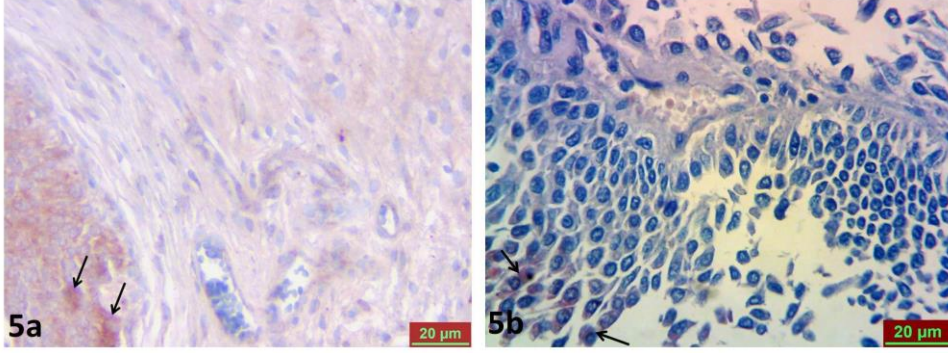
Şekil 3: Kontrol dokusu ve kanserli mesane dokusunda TRPM5 immünreaktivitesine rastlanmadı (Şekil 3a ve 3b).

5.1.4. TRPM 7 İmmünreaktivitesi



Şekil 4: TRPM7 İmmünreaktivitesi (Şekil 4a: Kontrol dokusu epitel hücrelerinde TRPM7 immünreaktivitesi, Şekil 4b: Kanserli mesane dokusunda; epitel hücrelerinde TRPM7 immünreaktivitesi)

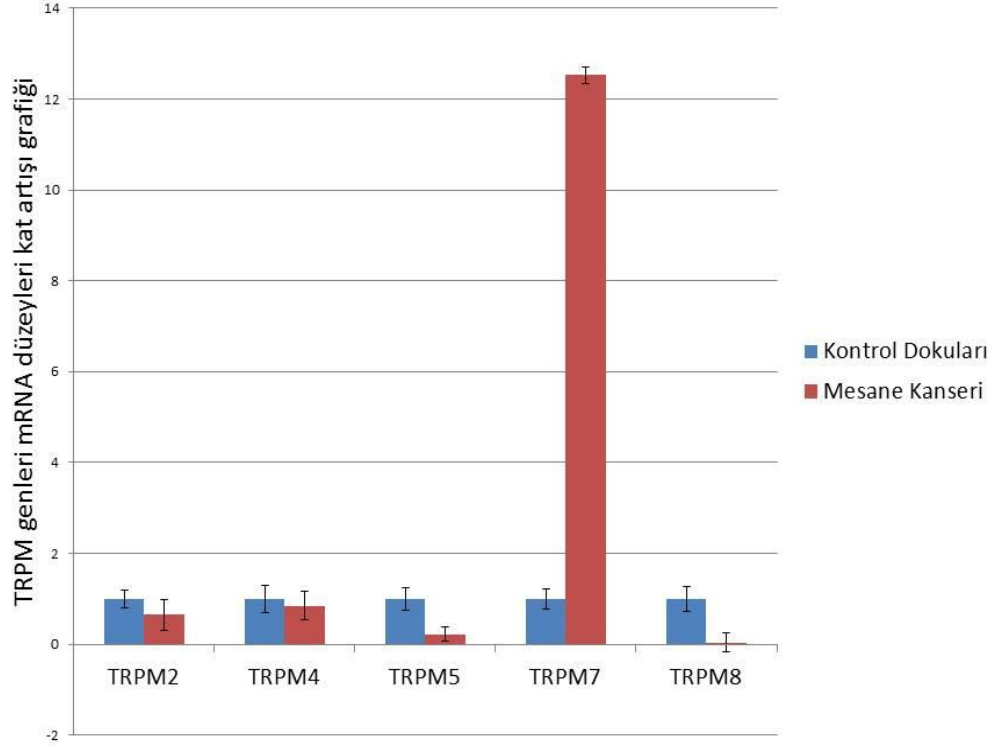
5.1.5. TRPM8 İmmünreaktivitesi 8



Şekil 5: TRPM8 İmmünreaktivitesi (Şekil 5a: Kontrol dokusu epitel hücresinde TRPM8 immunreaktivitesi, Şekil 5b: Kanserli mesane dokusunda; epitel hücrelerinde TRPM8 immunreaktivitesi)

5.2. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi Bulguları

Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi sonuçlarına göre, çalışma ve kontrol grupları TRPM2 ve TRPM4 mRNA ekspresyonları açısından karşılaştırıldığında gen ekspresyonlarındaki değişimin istatistiki olarak anlamlı düzeyde olmadığı [TRPM2 ($p>0,05$); TRPM4 ($p>0,05$)] belirlendi. Tümör dokusunda, sağlıklı dokuya göre TRPM5 ($p<0,05$) ve TRPM8 ($p<0,05$) genleri mRNA ekspresyonlarında istatistiki olarak anlamlı bir azalma ve TRPM7 ($p<0,05$) geni mRNA ekspresyonunda ise istatistiki olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 7).



Şekil 6. Kontrol ve kanser dokularındaki TRPM2,TRPM4, TRPM5, TRPM7 ve TRPM8 iyon kanallarının mRNA kat artışı grafiği. Real time PZR sonuçları gruplar arasında TRPM2 ve TRPM4 açısından anlamlı farklılık olmadığını, TRPM5 ve TRPM8 genlerinde anlamlı azalma ve TRPM7 geninde ise anlamlı artış olduğunu gösterdi. Her bir RT-PZR 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Genlerin ekspresyon düzeyleri GAPDH'ye göre normalize edildi. Sonuçlar her bir grup için ortalama± SD olarak ifade edildi.

6. TARTIŞMA

Katyon kanalları olan TRP ailesi, pek çok hücre tipinde ısı, kimyasal ve mekanik cevapları da içeren birçok fizyolojik olayda kritik görevler almaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ısı, kimyasal maruziyet, pH ve mekanik stres gibi pek çok çevresel faktörün spesifik TRP kanalları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu spesifik TRP kanallarının proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve onkogenез süreçlerinde önemli olduğu bildirilmektedir (32,72,73,74).

TRP ailesinin kalsiyum ve sodyum geçirgen kanallarının bazı üyelerinin, kanser hücrelerinde farklı düzeyde ekspresyonları olmasına rağmen şu ana kadar bu bilgi çok ilgi çekmemiştir. Bunun nedenlerinden birisi TRP proteinlerini de içeren değişikliklerin içinde TRP genlerindeki mutasyonların olmaması, bunun yerine kanser evresine göre normal TRP proteinlerinin artmış ya da azalmış ekspresyon seviyelerinin bulunması olabilir (75). TRP ekspresyonundaki bu değişikliklerin, kanser progresyonundaki temel basamaklardan birisi mi olduğu yoksa diğer değişikliklerle beraber sekonder olarak mı ortaya çıktığı henüz aydınlatılmamış bir konudur (75). Bu sorunun bir cevabı olarak, mesane ve prostat kanserlerinde diğer bazı markırların kanseri öngörüyor olması, bazı TRP proteinlerinin de ürolojik kanserlerin gidişatını öngörmede değerli markırlar olabildiğini düşündürmektedir (76). Bu parametreler, farmakolojik tedavi için de potansiyel hedefler olarak değerlendirilmektedir (77,78,79).

Üriner mesane kanserleri tüm kanser vakalarının %6'sından, kanser ilişkili ölümlerin ise %3'ünden sorumludur, fakat mesane kanserinde iyon kanallarının varlığı ve malign fenotipe potansiyel etkileri çok fazla araştırılmamıştır (80). Biz bu çalışmada mesane kanseri ve bazı TRPM kanalları arasındaki ilişkiyi ortaya

koymaya çalıştık. Çalışmamızda sadece TRPM7 mRNA'sı ekspresyonu artarken diğer TRPM kanallarından olan TRPM2 ve TRPM4'de değişme gözlenmedi. TRPM5 ve TRPM8 kanal ekspresyonlarında ise anlamlı düzeyde azalma olduğu belirlendi. Çalışmamızda ortaya çıkardığımız bu bulgu, literatürde yapılan bir çalışma ile benzerlik göstermektedir. Mizuno ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmaya göre, normal ürotelyal hücrelere kıyasla, insan mesane kanseri hücrelerinde TRPM7 mRNA ekspresyonu artmıştır (81). Yapılan bazı çalışmalar, TRPM7'nin meme kanseri ve mide kanseri gibi çeşitli kanserlerde rol oynadığını göstermektedir (82,83).

TRPM7 kanalları her dokuda bulunmaktadır, pek çok dokuda düşük oranda eksprese olmaktadır. Fakat özellikle meme ve pankreas kanseri başta olmak üzere diğer kanserlerde de aşırı ekspresyonu bulunmaktadır (82,84,85). TRPM7 ve kanser arasındaki ilişkiyi ilk tanımlayan çalışmalardan birisi epidemiyolojik bir çalışma olup bu çalışmada TRPM7 genindeki bir polimorfizmin kolorektal neoplazi için artmış risk ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (86). Daha sonraları yapılan bir çalışmada ise serum kalsiyum/magnezyum oranındaki artışın, TRPM7 kanallarını aktive ederek, prostat kanseri proliferasyonunu desteklediği saptanmıştır. Aynı çalışma, TRPM7'nin prostat kanserinde önemli bir rolü olduğu ve kalsiyum/magnezyum oranının tümör başlangıç ve progresyonunda esas teşkil ettiğini vurgulamıştır (87). TRPM7 kanalı aktivitesinin blokajı, insan gastrik adenokansinom hücrelerinin büyümesini ve canlılığını inhibe eder (88). Bu bilgi TRPM7'nin kanser hücreleri proliferasyonunu ve tümör büyümesini etkilediğini göstermektedir. TRPM7 ayrıca, kanser tedavisinde de kullanılan bir hedeftir. Bu

kanalların aşırı ekspresyonu, karsinojenik hücreler ve tümörler için yeni markırlar olarak kullanılabilir (40). Çalışmamızda da mesane kanserinde TRPM7 artmış ekspresyonun tespiti bu bulguyu desteklemektedir.

TRPM8 kanalları, kalsiyuma geçirgen kanallardır ve oldukça yaygın oranda eksprese olurlar. Özellikle prostat kanserinde potansiyel bir prognostik ve tanısal bir biomarkırdır (89). TRPM8 mRNA'sı (diğer bir kalsiyuma geçirgen kanal), kolorektal adenokarsinomda da eksprese olurken, sağlıklı kolonda eksprese olmaz. TRPM8, diğerlerine göre daha geç bulunan bir TRP aile üyesidir (90). TRPM8'in soğuk sensörü olarak fizyolojik bir görev yerine getirdiği bilinmesine rağmen, tümör hücrelerindeki potansiyel aktivasyon mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır (80). Mesane kanserinde hastalarından elde ettiğimiz TRPM8 mRNA ekspresyonlarında anlamlı düzeyde azalma olduğu saptanmıştır.

TRPM5 kanalları akciğer, testis, dil, sindirim sistemi ve beyinde sentezlenmektedir. TRPM5 kanalları özellikle tat reseptör hücrelerinde eksprese olurlar (32). TRPM4 ve TRPM5 ekspresyonlarının bazı kanserlerde arttığı bilinmektedir (54). TRPM5'in değişmiş ekspresyon seviyelerinin de tümörögenesis ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Özellikle Wilms tümörlerinin birçoğunda ve rabdomyosarkomda artmış TRPM5 mRNA ekspresyonu saptanmıştır (91). Ancak çalışmamızda TRPM5 immünreaktivitesinin hem kanser hem de normal dokularda oldukça düşük düzeyde olduğu bulunmuştur.

TRPM4 kanalları hemen her dokuda eksprese olmakla beraber özellikle pankreas, kalp ve plasentada sentezlenmektedir. TRPM4 kanalının ürotelyumdaki fizyolojik önemi halen belirsiz olmakla birlikte, özellikle üriner mesane detrusor

düz kasında (DSM) tanımlanmıştır ve DSM eksitabilitesi ve kontraktilitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (92). Yapılan bir çalışmada TRPM4 kanalı mRNA seviyelerinin DSM vasküler düz kasında daha yüksek olduğunu ve TRPM4 kanal inhibisyonunun DSM eksitabilitesini azalttığını ortaya konmuştur. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, TRPM4 kanallarının mesane detrusor düz kası eksitasyon-kontraksiyonunun temel düzenleyicilerinden biri olduğunu göstermektedir. Dolayısı ile aşırı aktif mesane tedavisinde ilginç bir tedavi hedefi olarak görev yapabilirler (92,93). Fakat bu durumun mesane kanseri ile ilgisi olup olmadığı konusunda henüz bir çalışma yapılmamıştır. Bu açıdan bizim çalışmamızda olduğu gibi mesane kanserinde TRPM4 mRNA ekspresyon düzeyinin değişmemesi normal görülebilir (54). TRPM4 mRNA ekspresyonunun lenfomalarda artması, TRPM4 iyon kanalı ekspresyonunun tanısal bir markır olarak kullanabileceğini göstermektedir (94). Ayrıca TRPM4 inhibisyonu kanserde uygun bir terapötik yaklaşım olabileceği ifade edilmektedir (40). Bu konuda özellikle mesane kanseri ile ilgili ileri araştırmalara ihtiyaç olacaktır.

TRPM2 mRNA seviyesi, CpG adacık metilasyonu ile artmış aktiviteye sahip olan melanomlarda yükselmektedir. TRPM2'nin sessizleştirilmesinin, sağlıklı hücreleri etkilemeden prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunu ortadan kaldırdığı rapor edilmektedir (95). Bu bulgu, melanom hücrelerinde TRPM2 aktivitesinin artışının düzenlenmesinin kanser progresyonuna karşı mantıklı bir tedavi stratejisi olacağını göstermektedir (40). Çalışmamızda mesane kanseri olgularında TRPM2 kanalı mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişim saptanmamıştır.

TRP kanalları ekspresyon paterni, kanserde tanısıl ve/veya prognostik olarak görev alabilir. Örneğin TRPV6 ve TRPM8 prostat kanserinde bir tümör progresyon markırı olarak görev görmekte iken (54,96), TRPV6 ve TRPM7 metastatik meme kanserinde zayıf prognoz markırı olarak değerlendirilebilir (97).

Normal mesane ve kanserli mesane dokularında TRPM kanal ailesinin immün boyanması yada ekspresyonlarıyla ilgili çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda özellikle TRPM2'nin mesane dokusunda kas, epitel, ve mukozal hücrelerde ekspresyonunun yoğun olduğu gözlenmiştir. TRPM7'nin ekspresyonunun epitel hücrelerle sınırlı olduğu belirlenmiş diğer hücre tiplerinde ekspresyonları gözlenmemiştir. TRPM5 ekspresyonu açısından immünreaktivite gözlenmemesine karşın RT-PZR çalışmasında çok düşük düzeyde mRNA'sı olduğu gözlenmiştir. TRPM4 ve TRPM8 immünreaktivitesinin çok düşük düzeyde olduğu ve epitel hücreleri ile sınırlı kaldığı bulunmuştur.

Gelecekte kanser tedavisinin, her bir bireye ait tümör bilgisini kullanmak suretiyle gerçekleşeceği düşünülmektedir. Burada da, standart terapötik strateji yerine hasta ilişkili verileri kullanmak yerinde olacaktır. İyon kanalları bu konuda her iki kanser terapi şeklini yani hem yüksek oranda kişiselleştirilmiş tanıyı hem de hasta spesifik ve hedeflenmiş kanser tedavisini güçlendirmektedir (80). Son zamanlardaki bulgular, TRP kanallarının kanser tedavisinde önemli hedefler olduğunu göstermektedir. Zira, bu kanalların ekspresyonu ve aktivitesi kanser gelişimi ve progresyonunda spesifik evreleri düzenlemektedir (32). Bu çalışmada amacımız, ülkemizde ve dünyada oldukça sık olarak görülen mesane kanserinin TRPM iyon kanalları ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak ve terapötik bir

hedef olarak belirlemektir. Bunun sonucunda kanser tedavisinde önemli bir süreç başlatılacaktır.

Sonuç olarak; özellikle TRPM7 kanalının mesane kanseri gelişimindeki rolünün tam olarak belirlenmesi için hücre hatlarında TRPM7'nin artmış ekspresyonunun ve inhibisyonunun invazyon, anjiogenez ve metastaz gibi süreçlere katkılarının belirlenmesi gerekmektedir. Yaptığımız çalışmada TRPM5 ve TRPM8'in ekspresyonunda azalma belirlenmesine rağmen daha fazla vaka kontrol örneklerinde yapılacak çalışmalara gereksinim vardır. Bu kanalların ekspresyon yolları, karsinogeneze katkıları ve kanser tedavisinde TRP agonistlerinin uygulamaya konmasıyla ilgili araştırmalara da ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- 1- Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64:9-29. 1.
- 2- Bukowski RM. Genitourinary oncology:current status and future challenges. *Front Oncol* 2011; 1:32.
- 3- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 2012; 62:10-29.
- 4- American Cancer Society. What are the key statistics about bladder cancer? <http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/bladder-cancer-key-statistics>. March 11, 2014.
- 5-<http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-7179/eski2yeni.html>.
- 6- Erişim: <http://www.ism.gov.tr/kidem/Tdoc3.htm>
- 7- Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2014;34:e192-5.doi:10.14694/EdBook_AM.2014.34.e192. The Geriatrics and Genetics behind Bladder Cancer. Milowsky MI, Kim WY.
- 8- Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicology Letters.* 2010;193:131-137.
- 9- Thompson RA Jr, Campbell EW Jr, Kramer HC, Jacobs SC, Naslund MJ: Late invasive recurrence despite long-term surveillance for superficial bladder cancer. *J Urol* 1993; 149(5): 1010-1.
- 10- Raitanen MP, Nieminen P, Tammela TL: Impact of tumour grade, stage, number and size, and smoking and sex, on survival in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1995; 76(4): 470-4.

- 11- Rosai J: Transitional Cell Carcinoma, Ackerman's Surgical Pathology. 8 Th Edition. Volume 1. 1995; P:1195-1204.
- 12- Patel VA, Hill DJ, Sheppard MC, Wang F, Logan A, Eggo MC: Apoptosis during goitre involution - the role of Bcl-2. *J Endocrinol* 2000; 164(3): 323-30.
- 13- Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010: How far we come? *CA Cancer J Clin* 2010;60:244-272.
- 14- Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakiopoulou H, Dimopoulos MA: The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol* 1998; 29(2): 146-54.
- 15- Messing EM, Catalona W: Urothelial tumors of the urinary tract; Walsh P.C, Retik A.B, Vaughan E.D, Wein A.J: Campbell Urology, 10th edn. Philadelphia WB Saunders, 2011, S:1012.
- 16- Loening S, Narayana A, Yoder L, Slymen D, Penick G, Culp D: Analysis of bladder tumor recurrence in 178 patients. *Urology* 1980; 16(2): 137-41.
- 17- Svatek RS, Hollenbeck BK, Holmang S, et al. The Economics of Bladder Cancer: Costs and Considerations of Caring for This Disease. *Eur Urol*. Epub 21 Jan 2014.
- 18- Stephenson WT, Holmes FF, Noble MJ, Gerald KB: Analysis of bladder carcinoma by subsite. Cystoscopic location may have prognostic value. *Cancer* 1990; 66(7): 1630-5.
- 19- Mulders PF, Meyden AP, Doesburg WH, Oosterhof GO, Debruyne FM: Prognostic factors in pTa-pT1 superficial bladder tumours treated with

intravesical instillations. The Dutch South-Eastern Urological Collaborative Group. *Br J Urol* 1994; 73(4): 403-8.

20- Bellmunt J, Orsola A, Leow JJ, Wiegel T, De Santis M, Horwich A; ESMO Guidelines Working Group. Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014 Sep;25 Suppl 3:iii40-8. doi: 10.1093/annonc/mdu223. Epub 2014 Aug 5.

21- Van Rhijn BW, Musquera M, Liu L, Vis AN, Zuiverloon TC, van Leenders GJ, Kirkels WJ, Zwarthoff EC, Boevé ER, Jöbsis AC, Bapat B, Jewett MA, Zlotta AR, van der Kwast TH. Molecular and clinical support for a four-tiered grading system for bladder cancer based on the WHO 1973 and 2004 classifications. *Mod Pathol*. 2014 Nov 28. doi: 10.1038/modpathol.2014.154. [Epub ahead of print]

22- Sobin DH, Witteking CH: *Classification of Malignant Tumours*, 6th ed. Wiley-Liss: New York, 2002.

23- Heney NM, Nocks BN, Daly JJ, Prout GR Jr, Newall JB, Griffin PP, Perrone TL, Szyfelbein WA: Ta and T1 bladder cancer: location, recurrence and progression. *Br J Urol* 1982; 54(2): 152-7.

24- Ozen HA, Akdaş A, Alkibay T, Altuğ U, Remzi D: Prognostic factors in superficial bladder cancer. *Int Urol Nephrol* 1986; 18(4): 417-20.

25- Kiemeny LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek AL, Debruyne FM: Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. *J Urol* 1993; 150(1): 60-4.

26- Heney NM: Natural history of superficial bladder cancer. Prognostic features and long-term disease course. *Urol Clin North Am* 1992; 19(3): 429-33.

- 27- Holmang S, Hedelin H, Anderstrom C, Johansson SL: The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of the bladder followed for at least 20 years. *J Urol* 1995; 153(6): 1823-6; discussion 1826-7.
- 28- Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodriguez J: Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol* 2000; 163(1): 73-8.
- 29- Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK: The Bladder Consensus Conference Committee. The World Health Organization/International Society of Urologic Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 1435.
- 30- Schapers RF, Pauwels RP, Wijnen JT, Arends JW, Thunnissen FB, Coebergh JW, Smeets AW, Bosman FT: A simplified grading method of transitional cell carcinoma of the urinary bladder: reproducibility, clinical significance and comparison with other prognostic parameters. *Br J Urol* 1994; 73(6): 625-31.
- 31- Prevarskaya N, Skryma R, Bidaux G, Flourakis M, Shuba Y. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* 2007;14:1295-304.
- 32- Gautier M, Dhennin-Duthille I, Ay AS, Rybarczyk P, Korichneva I, Ouadid-Ahidouch H. New insights into pharmacological tools to TR(i)P cancer up. *Br J Pharmacol.* 2014 May;171(10):2582-92. doi: 10.1111/bph.12561. Review.
- 33- Guinamard R, Sallé L, Simard C. The non-selective monovalent cationic channels TRPM4 and TRPM5. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:147-71.

- 34- Kraft R, Harteneck C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch* 2005;451:204–211.
- 35- Everaerts W, Gevaert T, Nilius B, De Ridder D. On the origin of bladder sensing: Tr(i)ps in urology. *Neurourol Urodyn*. 2008;27(4):264-73. Review.
- 36- Xie YF, Macdonald JF, Jackson MF. TRPM2, calcium and neurodegenerative diseases. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2010;15:95-103.
- 37- Everaerts W, Vriens J, Owsianik G, Appendino G, Voets T, De Ridder D, Nilius B. Functional characterization of transient receptor potential channels in mouse urothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Mar;298(3):F692-701. doi: 10.1152/ajprenal.00599.2009. Epub 2009 Dec 16.
- 38- Farooqi AA, Javeed MK, Javed Z, Riaz AM, Mukhtar S, Minhaj S, Abbas S, Bhatti S. TRPM channels: same ballpark, different players, and different rules in immunogenetics. *Immunogenetics* 2011;63:773–787.
- 39- Zholos A. Pharmacology of transient receptor potential melastatin channels in the vasculature. *British Journal of Pharmacology* 2010;159:1559–1571.
- 40-Simon F, Varela D, Cabello-Verrugio C. Oxidative stress-modulated TRPM ion channels in cell dysfunction and pathological conditions in humans. *Cell Signal*. 2013;25:1614-24. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.03.023. Epub 2013 Apr 16.
- 41- Perraud AL, Schmitz C, Scharenberg AM. TRPM2 Ca²⁺ permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium* 2003;33:519–531.
- 42- Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N. Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* 1998;54:124–131.

- 43- Inamura K, Sano Y, Mochizuki S, Yokoi H, Miyake A, Nozawa K, Kitada C, Matsushime H, Furuichi K. Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line. *J Membr Biol* 2003;191:201–217.
- 44- Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Pharmacol Rev* 2010; 62:381–404.
- 45- Zeng X, Sikka SC, Huang L, Sun C, Xu C, Jia D, Abdel-Mageed AB, Pottle JE, Taylor JT, Li M. Novel role for the transient receptor potential channel TRPM2 in prostate cancer cell proliferation. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2010;13:195-201.
- 46- Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol.* 2003;13:1153-1158.
- 47- Van Haute C, De Ridder D, Nilius B. TRP channels in human prostate. *Scientific World Journal.* 2010;1:1597-1611.
- 48- Launay P, Fleig A, Perraud AL, Scharenberg AM, Penner R, Kinet JP. TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 2002; 109:397–407.
- 49- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):165-217.

- 50-Thompson JA, Salcedo E, Restrepo D, Finger TE. Second-order input to the medial amygdala from olfactory sensory neurons expressing the transduction channel TRPM5. *J Comp Neurol.* 2012;520(8):1819-30. doi: 10.1002/cne.23015.
- 51- Liman ER. The Ca₂₊-Activated TRP Channels: TRPM4 and TRPM5. In: Liedtke WB, Heller S, editors. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades.* Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 15.
- 52-Lehen'kyi V, Prevarskaya N. Oncogenic TRP channels. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:929-45.
- 53- Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurotaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A. LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 2001; 411:590–595.
- 54- Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:937-946.
- 55-Fantozzi I, Zhang S, Platoshyn O, Remillard CV, Cowling RT, Yuan JX. Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2003;285:1233–1245.
- 56- Wuensch T, Thilo F, Krueger K, Scholze A, Ristow M, Tepel M. High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential channel expression in human monocytes. *Diabetes* 2010;59:844–849.
- 57- Nunez-Villena F, Becerra A, Echeverria C, Briceno N, Porrás O, Armisen R, Varela D, Montorfano I, Sarmiento D, Simon F. Increased expression of the

transient receptor potential melastatin 7 channel is critically involved in lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species-mediated neuronal death. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011;15:2425–2438.

58- Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, MacDonald JF, Tymianski M. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* 2003;115:863–877.

59- Coombes E, Jiang J, Chu XP, Inoue K, Seeds J, Branigan D, Simon RP, Xiong ZG. Pathophysiologically relevant levels of hydrogen peroxide induce glutamate-independent neurodegeneration that involves activation of transient receptor potential melastatin 7 channels. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011;14:1815–1827.

60- Abed E, Labelle D, Martineau C, Loghin A, Moreau R. Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Molecular and Membrane Biology* 2009;26:146–158.

61- Martineau C, Abed E, Medina G, Jomphe LA, Mantha M, Jumarie C, Moreau R. Involvement of transient receptor potential melastatin-related 7 (TRPM7) channels in cadmium uptake and cytotoxicity in MC3T3-E1 osteoblasts. *Toxicology Letters* 2010; 199:357–363.

62- Cheng H, Feng JM, Figueiredo ML, Zhang H, Nelson PL, Marigo V, Beck A. Transient receptor potential melastatin type 7 channel is critical for the survival of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 2010; 19:1393–1403.

- 63- He Y, Yao G, Savoia C, Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II. *Circulation Research* 2005; 96:207–215.
- 64- Sahni J, Nelson B, Scharenberg AM. SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg²⁺ transporter. *Biochem J.* 2007;401:505-13.
- 65- Inoue K, Branigan D, Xiong ZG. Zinc-induced neurotoxicity mediated by transient receptor potential melastatin 7 channels. *J Biol Chem.* 2010;285:7430-9. doi: 10.1074/jbc.M109.040485. Epub 2010 Jan 4.
- 66- Wolf FI, Trapani V. TRPM7 and magnesium, metabolism, mitosis: An old path with new pebbles. *Cell Cycle.* 2010;9:3399. doi: 10.4161/cc.9.17.13072.
- 67-Bates-Withers C, Sah R, Clapham DE. TRPM7, the Mg(2+) inhibited channel and kinase. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:173-83.
- 68- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, Patel AS, Nelson JB, Futrell WJ, Yoshimura N, Chancellor MB, De Miguel F, Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract *J.Urol.* 2004;172:1175–1178.
- 69- Mukerji G, Yiangou Y, Corcoran SL, Selmer IS, Smith GD, Benham CD, Bountra C, Agarwal SK, Anand P. Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations. *BMC Urol.* 2006; 6:6.
- 70- Hayashi T, Kondo T, Ishimatsu M, Yamada S, Nakamura K, Matsuoka K, Akasu T. Expression of the TRPM8-immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons innervating the rat urinary bladder. *Neurosci Res.* 2009;65:245-51.

- 71- Zhang Y, Zhang D, Li W, Chen J, Peng Y, Cao W. A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:e123.
- 72- Takaishi M, Uchida K, Fujita F, Tominaga M. Inhibitory effects of monoterpenes on human TRPA1 and the structural basis of their activity. *J Physiol Sci* 2014;64:47-57.
- 73- Santoni G, Farfariello V, Amantini C. TRPV channels in tumor growth and progression. *Adv Exp Med Biol* 2011;704:947–967.
- 74- Shapovalov G, Lehen'kyi V, Skryma R, Prevarskaya N. TRP channels in cell survival and cell death in normal and transformed cells. *Cell Calcium* 2011;50:295–302.
- 75- Lazzeri M, Costantini E, Porena M. TRP family proteins in the lower urinary tract: translating basic science into new clinical prospective. *Ther Adv Urol.* 2009;1:33-42. doi: 10.1177/1756287209103922.
- 76- Myers-Irvin, JM, Van Le TS, Getzenberg RH. Mechanistic Analysis of the Role of BLCA-4 in Bladder Cancer Pathobiology. *Cancer Research* 2005;65:7145–7150.
- 77- Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumour progression. *Oncogene* 2003;22: 7858–61.

- 78- Fuessel S, Sickert D, Meye A, Klenk U, Schmidt U, Schmitz M, et al. Multiple tumour marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR. *Int J Oncol* 2003;23:221–228.
- 79- Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 2001;61:3760–3769.
- 80-Schönherr R. Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *J Membr Biol*. 2005;205:175-84.
- 81-Mizuno H, Suzuki Y, Watanabe M, Sokabe T, Yamamoto T, Hattori R, Gotoh M, Tominaga M. Potential role of transient receptor potential (TRP) channels in bladder cancer cells. *J Physiol Sci*. 2014;64(4):305-14. doi: 10.1007/s12576-014-0319-6. Epub 2014 May 22.
- 82- Guilbert A, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Haren N, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H. Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297:493–C502
- 83- Kim BJ, Park EJ, Lee JH, Jeon JH, Kim SJ, So I. Suppression of transient receptor potential melastatin 7 channel induces cell death in gastric cancer. *Cancer Sci* 2008;99:2502–2509.
- 84- Guilbert A, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Rybarczyk P, Sahni J, Sevestre H et al. Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain. *Eur J Cancer* 2013;49:3694–3707.

- 85- Middelbeek J, Kuipers AJ, Henneman L, Visser D, Eidhof I, van Horssen R et al. TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res* 2012;72: 4250–4261.
- 86-Trapani V, Arduini D, Cittadini A, Wolf FI. From magnesium to magnesium transporters in cancer: TRPM7, a novel signature in tumour development. *Magnes Res.* 2013;26(4):149-55. doi: 10.1684/mrh.2014.0354.
- 87-Baldoli E, Maier JA. Silencing TRPM7 mimics the effects of magnesium deficiency in human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis* 2012; 15: 47-57.
- 88- Kim BJ, Nah SY, Jeon JH, So I, Kim SJ. Transient receptor potential melastatin 7 channels are involved in ginsenoside Rg3-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2011;109:233–239.
- 89- Zhang L, Barritt GJ. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocr Relat Cancer* 2006;13: 27–38.
- 90- Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julis D. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.* 2003;55:591–596.
- 91- Prawitt D, Enklaar T, Klemm G, Gartner B, Spangenberg C, Winterpacht A, Higgins M, Pelletier J, Zabel B. Identification and characterization of mTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the TRP gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression, *Hum. Mol. Genet.* 2000;9:203–216.

- 92- Parajuli SP, Hristov KL, Sullivan MN, Xin W, Smith AC, Earley S, Malysz J, Petkov GV. Control of urinary bladder smooth muscle excitability by the TRPM4 channel modulator 9-phenanthrol. *Channels (Austin)*. 2013;7:537-40. doi: 10.4161/chan.26289. Epub 2013 Sep 13.
- 93- Smith AC, Parajuli SP, Hristov KL, Cheng Q, Soder RP, Afeli SA, Earley S, Xin W, Malysz J, Petkov GV. TRPM4 channel: a new player in urinary bladder smooth muscle function in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;304:918-929. doi: 10.1152/ajprenal.00417.2012. Epub 2013 Jan 2.
- 94- Suguro M, Tagawa H, Kagami Y, Okamoto M, Ohshima K, Shiku H, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Expression profiling analysis of the CD5+ diffuse large B-cell lymphoma subgroup: development of a CD5 signature. *Cancer Science* 2006;97:868–874.
- 95- Orfanelli U, Wenke AK, Doglioni C, Russo V, Bosserhoff AK, Lavorgna G. Identification of novel sense and antisense transcription at the TRPM2 locus in cancer. *Cell Research* 2008;18:1128–1140.
- 96- Gkika D, Prevarskaya N. TRP channels in prostate cancer: the good, the bad and the ugly? *Asian J Androl* 2011;13:673–676.
- 97- Ouadid-Ahidouch H, Dhennin-Duthille I, Gautier M, Sevestre H, Ahidouch A. TRP channels: diagnostic markers and therapeutic targets for breast cancer? *Trends Mol Med* 2013; 19:117–124.

Özgeçmiş

İlköğretimimi İstanbul, orta ve lise eğitimimi ise Elazığ Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1989 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girmeye hak kazandım. 1995 yılında aynı bölümden mezun oldum. Elazığ SSK hastanesi Acil servisinde pratisyen hekim olarak çalıştım. 1999 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümünde doktora eğitimine (PhD) başladım. Bu dönemde ders aşamasını tamamladım ve doktora yeterlik aşamasını başarı ile geçtim. Eylül 2002'de Tıpta Uzmanlık Sınavı'nda yine Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ihtisasını kazandım ve PhD programıma ara verdim. Eylül 2007'de ihtisasımı tamamlayarak Tıbbi Genetik uzmanı oldum. Aralık 2007'de Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde tıbbi genetik uzmanı olarak çalışmaya başladım. 2008'de Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi Mesul Müdürü olarak görevime devam ettim. Temmuz 2012'den itibaren de Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bölümü'nde yardımcı doçent ve anabilim dalı başkanı olarak görev yapmaktayım. Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi Mesul Müdürü görevim de devam etmektedir. Laboratuvarımızda moleküler genetik (DNA Dizi Analizi, Real Time PCR ve Pyrosequencing) alanında hizmet verilmektedir. Ocak 2012 tarihinden itibaren Yüksek Öğretim Kurumları'nın tanıdığı hakla, doktora eğitimime tez aşamasıyla devam ediyorum. Evliyim ve 2 çocuk annesiyim. İyi derecede İngilizce (ÜDS=82.5, KPDS=80), daha az olarak Almanca bilmekteyim.