T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE KANSERLİ HASTALARDA KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN AKAN HÜCRE ÖLÇER CİHAZI İLE TESPİTİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif ERCAN

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2016

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE KANSERLİ HASTALARDA KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN AKAN HÜCRE ÖLÇER CİHAZI İLE TESPİTİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif ERCAN

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Bu araştırma; Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştıma Projeleri Birimi tarafından 2593 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ankara, 2016

Canım kızıma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim için büyük özveri gösteren, ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, öneri ve eleştirileri ile beni daima yönlendiren, bilgi birikimlerini tüm içtenliği ile paylaşan tez danışmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN'a, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince her zaman değerli fikir ve önerilerinden faydalandığım, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Anabilim Dalı'mız öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e, tez konumun bulunması, planlanması ve çalışmanın yürütülmesi süresince her aşamada bilgi ve tecrübelerini bizimle paylaşan, çalışma alanımla ilgili deneyim kazanmamı sağlayan, her zaman ilgi, anlayış ve desteğini gördüğüm değerli hocam Anabilim Dalı'mız öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda ve deneysel sonuçları yorumlamamda değerli görüş ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmamda kullandığım yöntemin standardizasyonun aşamasında bilgi ve katkıları ile yardımını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Uz. Dr. Ferda ALPARSLAN PINARLI'ya; çalışma protokolünün oluşturulmasındaki katkılarından dolayı Uz. Bio. Meral TİRYAKİ'ye; akan hücre ölçer verilerini değerlendirmek için önemli katkılarından dolayı Bio. Emrullah ÇALIŞIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği'ndeki çalışanlara ve bana klinik desteği sağlayan hocalarım Sayın Prof. Dr. Ali Fuat ATMACA'ya, Doç. Dr. Abdullah Erdem CANDA'ya ve Doç. Dr. Ömer Faruk Karataş'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans kariyerim boyunca paylaştığımız her güzel ve birikim dolu gün için, destek, hoşgörü ve yönlendirmeleriyle her zaman yanımda olan Kanser Biyolojisi Yüksek Lisans ve Doktora Programı'nda yer alan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman benim için en iyiyi ve en güzeli isteyen ve beni her daim destekleyen, yanımda olan sevgili anneme, babama, kayınpederime, kayınvalideme ve kardeşlerime; bu mücadeleler ile dolu yüksek lisans eğitim süreci boyunca hep yanımda olan sabır gösteren ve sevgisinden güç aldığım eşime; benimle geçireceği vaktinden ödün verip, sürekli çalışmama müsade eden, kendisi minik kalbi kocaman, anlayışlı yavruma sonsuz teşekkürlerimi sunarım, iyi ki varsınız.

Çalışmama en büyük desteği sağlayan, kan veren tüm gönüllülere ve hastalara teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Kanser 3

2.1.1. Karsinogenez 4

2.1.2. Kanserli Hücrelerin Karakteristik Özellikleri 5

2.1.3. Hücre Farklılaşması 8

2.1.4. Hücrelerin Ölümsüzlük Kazanması 10

2.2. İnvazyon ve Metastaz 13

2.3. Mesane ve Mesane Kanseri 16

2.3.1. Mesane 16

2.3.2. Mesane Kanseri 19

2.3.2.1. Epidemiyolojisi 19

2.3.2.2. Risk Faktörleri 19

2.3.2.3. Patolojisi ve Tümör Yayılımı 21

2.3.2.4. Tanı ve Evreleme 22

2.3.2.5. Kullanılan Belirteçler 25

2.3.2.6. Tedavi 30

2.3.2.7. Prognoz 31

2.4. Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (CTC'ler) 32

2.4.1. CTC Saptama Yöntemleri 33

2.4.1.1. CTC Zenginleştirme Teknikleri 33

2.4.1.2. CTC Karakterizasyon Teknikleri 35
2.5. Sitokeratinler 36
2.6. Akan Hücre Ölçer Cihazı 37
3. MATERYAL VE YÖNTEM 39
3.1. Materyal 40
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler 40
3.1.2. Çalışmada Hazırlanan Solüsyonlar 42
3.1.3. Bir Çalışma İçin Kullanılan Kimyasalların Miktarları 42
3.2. Yöntem 43
3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması 43
3.2.2. Zenginleştirme Basamağı 43
3.2.2.1. Fikol Ayrımı 43
3.2.2.2. CD45 Deplesyonu 45
3.2.3. Saptama Basamağı 47
3.2.3.1. Antikorlar ile boyama 47
3.2.4. Örneklerin Akan Hücre Ölçer Cihazında Analiz Edilmesi 48
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme 51
4. BULGULAR 52
5. TARTIŞMA 65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 71
7. KAYNAKLAR 73
8. EKLER 85
EK-1.Etik Kurul Onay Belgesi 85
EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu 86
EK-3. Uluslararası Bilimsel Toplantıda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özeti Basılan Bildiri 91
EK-4. Tez çalışmasında kullanılan Yöntem Makalesi 92

EK-5. Özgeçmiş 93

ÖZET

Mesane Kanserli Hastalarda Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Akan Hücre Ölçer Cihazı ile Tespiti

Mesane kanseri ürotelyumdan kaynaklı kanserler içinde en sık görülen malignitedir. Dünya genelinde yaşa bağlı görülme oranı; erkeklerde 100 000'de 10.1, kadınlarda ise 100 000'de 2.5'tir.

İnvaziv olmayan mesane kanseri, tümör derinliğine bağlı olarak, çoğunlukla transüretral rezeksiyon (TUR) ile tedavi edilir. Yüksek dereceli, invaziv olmayan ve tekrarlayan mesane kanserleri radikal sistektomi (RC) ile tedavi edilir. İnvaziv olan mesane kanserlerinde de radikal sistektomi altın standart tedavi şeklidir.

Metastaz; periferik kan dolaşımındaki tümör hücrelerinin varlığı ile doğrudan ilişkilidir ve kanserden ölümlerin başlıca sebebi; dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC'ler) primer tümörden ayrılarak diğer organlara yayılarak metastaza sebep olmasıdır. CTC'lerin varlığı ve sayısı ile metastaz görülme durumu ilişkilidir. Radikal sistektomi sonrası CTC varlığı kötü sağkalımı göstermektedir. Son derece heterojen bir doğaya sahip CTC'ler oldukça nadir bulunduklarından dolayı kantitatif analizleri daha avantajlıdır.

Çalışmamızda, TUR veya RC ile tedavi edilen mesane kanserli hastaların 7.5 ml kan örneklerinde CTC saptanması hedeflenmiştir. 10 mesane kanserli hastada; akan hücre ölçer cihazında belirteçler EpCAM, CK 14, 15, 16, 19 ve CK 7, 8 ile pozitif seçilim, CD45 negatif seçilim ile CTC tespit edilmiştir. 10 hastanın 5'inde (%50) CTC sayıları opere öncesi ve opere sonrası olarak değerlendirilmiştir. Opere sonrası CTC sayılarında anlamlı düşüş gözlenmiştir ($Z=2.032$; $p=0.042$). Çalışmamıza dahil edilen 10 kontrol bireyinde CTC'ye rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimler: Akan Hücre Ölçer Cihazı, Dolaşımdaki Tümör Hücreleri, Mesane Kanseri

ABSTRACT

Determination of Circulating Tumor Cells by Flow Cytometry in the Bladder Cancer Patients

Bladder cancer is one of the most common malignancies of the urinary system and causes to 15,500 deaths every year. The worldwide age standardized rate (ASR) is 10.1 per 100 000 for men and 2.5 per 100 000 for women.

Non-muscle invasive disease is usually treated with transurethral resection of bladder tumor (TUR-BT), depending on the depth of invasion and tumor grade. Radical cystectomy (RC) with or without perioperative chemotherapy is the gold standard treatment in muscle invasive and recurrent high-grade non-muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder (UCB).

The deaths in most cancer are dependent on metastasis to distant organs due to disease dissemination by Circulating Tumor Cells (CTCs) spread out from the primary tumor. Metastasis is related to the presence and number of CTCs in the vasculature. The presence of CTCs preoperatively was an independent adverse prognostic factor for cancer-free survival in patients undergoing cystectomy. Highly sensitive, real-time monitoring of CTCs can be carried out with flow cytometry using diverse detection systems without the need of extracting blood samples.

The current study aimed to detect of CTCs in 7.5 mL blood sample in bladder cancer patients treated with TUR or RC. CTCs were detected in peripheral blood of 10 bladder cancer patients with flow cytometry using biomarkers EpCAM, CK 14, 15, 16, 19 and CK 7, 8 for positive selection and CD45 for negative selection. The blood samples obtained before and after operation were studied in 5 out of 10 patients. The number of CTCs decreased significantly on patients ($Z=2.032$; $p=0.042$) after the operation. No CTCs were detected in control group.

Keywords: Bladder Cancer, Circulating Tumor Cells, Flow Cytometry

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santrigrat Derece
g	: Relatif Santrifüj Kuvveti (RCF)
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
Na	: Sodyum
pH	: Potansiyel Hidrojen
µL	: Mikrolitre
ALT	: Alternative Lengthening of Telomeres
APC-H7	: Allophycocyanin-Hilite-7
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
BLCA-4	: Bladder Cancer Antigen-4 (Mesane Kanseri Antijeni-4)
BSA	: Sığır Serum Albümini
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
BVD	: Blood Vessel Density (Kan Damar Yoğunluğu)
BTA	: Bladder Tumor Antigen (Mesane Tümörü Antijeni)
CD	: Cluster of Differentiation
cfDNA	: Serbest Dolaşan DNA
CIS	: Carcinoma *in situ* (Karsinoma *in situ*)
CK	: Sitokeratin
CTC	: Circulating Tumor Cell
CTCs	: Circulating Tumor Cells
CYFRA 21-1	: Sitokeratin-19 Fragmentleri
DAPI	: 4,2-Diamidino-2-Fenilindol Dihidroklorür
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm
EpCAM	: Epitelyal Hücre Adezyon Molekülü

FACS : Floresan Aktive Hücre Ayırma
FBS : Fetal Sığır Serumu
FC : Flow Cytometry (Akan Hücre Ölçer)
FDA : Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FISH : Floresans *in situ* Hibridizasyon
FITC : Fluorescein Isothiocyanate
FSC : Forward Scatter Channel (İleri Saçılım Grafiği)
H-RAS : Harvey Virüsü Ras
HA-HAase : Hyaluronik Asit-Hyaluronidaz
HER-2 : Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü-2
IHC : İmmün-histokimya
Ig : İmmünglobulin
İVP : İntravenöz Pyelografi
LOH : Loss of Heterozygosity (Heterozigotluk Kaybı)
MACs : Manyetik Aktif Hücre Sıralama
mAb : Monoklonal Antikor
MDR : Çoklu İlaç Direnç Proteini
miRNA : Mikro RNA
MMP : Matriks Metalloproteinaz
mRNA : Mesajcı Ribonükleik Asit
MUC-1 : Müsin-1
NMP-22 : Nükleer Matriks Proteini-22
p53 : Tümör Protein 53
PBMC : Mononükleer Hücreler
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE : Phycoerythrin
RB : Retinoblastoma
RC : Radikal Sistektomi
RNA : Ribonükleik Asit
RT-PCR : Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR : Ters Transkriptaz Kantitatif PCR
SSC : Side Scatter Channel (Yana Saçılım Grafiği)
TCC : Transitional Cell Carcinoma (Değişici Epitel Hücreli Karsinom)

TNM	: Primer Tümör Durumu, Bölgesel Lenf Bezlerine Tutulum, Uzak Metastaz Varlığı
TRAP	: Telomerase Repeat Amplification Protocol
TUR	: Transüretral Rezeksiyon
TURBT	: Transurethral Resection of Bladder Tumors
UBC	: Urinary Bladder Cancer (Üriner Mesane Kanseri)
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanserin ayırıcı özellikleri 4

Şekil 2.2. Karsinogenez süreci 5

Şekil 2.3. Benign ve malign tümörler 7

Şekil 2.4. Mikroçevre elemaları 9

Şekil 2.5. Mikroçevrenin değişimi 10

Şekil 2.6. Tümör oluşumu sürecinde hücre bölünmesinin artışı ve apoptozdan kaçış 11

Şekil 2.7. Metastaz basamakları 16

Şekil 2.8. Mesane Anatomisi. (A) Superolateral görünüm. (B) Litenaud üçgeni: Kesilmiş mesanenin önden görünümü 18

Şekil 2.9. Transüretral rezeksiyon (TUR) 30

Şekil 2.10. Radikal sistektomi (RC) 31

Şekil 2.11. Sıvı biyopsi şeması 32

Şekil 2.12. Akan hücre ölçer çalışma prensibi 38

Şekil 3.1. Fikol ile gradiyente dayalı zenginleştirme işlemi 44

Şekil 3.2. Çalışmamızda gerçekleştirilen Fikol ile yoğunluk ayrımı. A. 7.5 mL kan örneği. B. PBS ile sulandırılmış kan örneği. C. Fikol üzerine eklenen kan örneği. D. Santrifüj sonrası kan örneğinin Fikol gradiyent ayrımı 45

Şekil 3.3. MACs sistemi ile manyetik ayrım 46

Şekil 3.4. Lökosit popülasyonlarının FSC/SSC histogramında gösterimi 49

Şekil 3.5. BD FACSAria™ III Cell Sorter cihazı 50

Şekil 4.1. Akan hücre ölçer verilerindeki ifadeler 53

Şekil 4.2. İzotip tüpü akan hücre ölçer verisi 54

Şekil 4.3. Hasta 1'in opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi 55

Şekil 4.4. Hasta 1'in opere sonrası deney tüpü akan hücre ölçer verisi 55

Şekil 4.5. Hasta 2'nin opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....56

Şekil 4.6. Hasta 3'ün opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....56

Şekil 4.7. Hasta 4'ün opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....56

Şekil 4.8. Hasta 4'ün opere sonrası deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....57

Şekil 4.9. Hasta 5'in opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi 57

Şekil 4.10. Hasta 6'nın opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....57

Şekil 4.11. Hasta 6' nın opere sonrası deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....58

Şekil 4.12. Hasta 7'nin opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....58

Şekil 4.13. Hasta 8'in opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....58

Şekil 4.14. Hasta 8' in opere sonrası deney tüpü akan hücre ölçer verisi 59

Şekil 4.15. Hasta 9'un opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....59

Şekil 4.16. Hasta 10'un opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....59

Şekil 4.17. Hasta 10' un opere sonrası deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....60

Şekil 4.18. Kontrol 1'in deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....60

Şekil 4.19. Kontrol 2'nin deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....61

Şekil 4.20. Kontrol 3'ün deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....61

Şekil 4.21. Kontrol 4'ün deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....61

Şekil 4.22. Kontrol 5'in deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....61

Şekil 4.23. Kontrol 6'nın deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....62

Şekil 4.24. Kontrol 7'nin deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....62

Şekil 4.25. Kontrol 8'in deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....62

Şekil 4.26. Kontrol 9'un deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....62

Şekil 4.27. Kontrol 10'un deney tüpü akan hücre ölçer verisi.....63

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Mesane kanserinin TNM evrelemesi 23

Tablo 2.2. Mesane kanserinin anatomik evreleri 24

Tablo 2.3. Mesane kanserinde yaygın olarak kullanılan tanısal belirteçler ve özellikleri 26

Tablo 2.4. Sitokeratinler 37

Tablo 3.1. Hastaların TNM evreleri ve invazivlik durumları 39

Tablo 3.2. Çalışmamızda kullanılan cam ve plastik sarf malzemelerin listesi 40

Tablo 3.3. Çalışmamızda kullanılan cihazların ve aletlerin listesi 40

Tablo 3.4. Çalışmamızda kullanılan kimyasalların listesi 41

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan antikorların listesi 41

Tablo 3.6. Bir çalışma için kullanılan kimyasalların miktarları 42

Tablo 4.1. Demografik özellikler 52

Tablo 4.2. Hastaların CTC sayıları 53

Tablo 4.3. CTC sayılarının hasta ve kontrol grubunda dağılımı 63

Tablo 4.4. İnvazivlik durumuna göre CTC sayısı dağılımı 64

1. GİRİŞ

Vücudun herhangi bir bölgesinde hücreler kontrol dışı çoğalmaya başlar ise kanser gelişir. Kanser hücresi çoğunlukla ölümsüzleşir, sınırsız büyüme ve bölünme yeteneği kazanır. Normal büyüme kısıtlamalarını algılayamaz hale gelir. Tümör, büyümesi için gerekli olan kanı, anjiyogenez (yeni kan damarı oluşumu) sayesinde temin eder (1).

Metastaz sırasında kanser hücreleri, oluştukları yerden çıkıp, vücudun başka bölgelerine göç eder ve burada çoğalıp normal dokunun yerini alır. Hücrelerin yayılabilmesi için hücre-hücre bağlantılarını kaybetmeleri ve hareketli olmaları gerekmektedir. Hücreler bu süreçte kan dolaşımına, lenf damarlarına veya diğer dokulara girme kabiliyeti kazanırlar. Metastaz, bu hastalığın yaşamı en çok tehdit eden yönüdür (1).

Mesane kanseri dünyadaki en yaygın malignitelerden biridir. Dünya genelindeki kanser vakalarında görülme sıklığı akciğer, meme, kolon, prostat, mide, karaciğer, serviks ve özofagus kanserlerinden sonra 9. sırada yer alır (2). Mesane kanserinin en yaygın türü ise mesanenin ürotelyal karsinomudur (3). Ürotelyal kanser, en sık görülen ikinci ürolojik malignitedir ve mesane kanseri tedavisindeki gelişmelere rağmen, genel prognozda belirgin bir iyileşme henüz yoktur (4). Mesane kanseri tanısı sistoskopi ve biyopsi ile yapılabilmektedir. Ancak sistoskopi oldukça pahalı bir yöntem olup ayrıca invazivdir. Bu nedenle farklı tümör belirteci bulmaya yönelik çalışmalar artmıştır (5).

Metastazın periferik kan dolaşımındaki kanser hücrelerinin varlığı ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir ve bu hücreler dolaşımdaki tümör hücreleri (CTCs) olarak adlandırılmıştır (6). Periferik kanda CTC'nin ortaya çıkışından, dolaşıma katılan primer tümör hücreleri veya metastatik hücreler sorumludur (7). CTC'nin tespit oranında gün boyunca bir değişikliğin olmaması ile CTC'nin tümör aktivitesinde güvenilir bir parametre olduğu varsayılmaktadır (7). Bugüne kadar

yapılan CTC çalışmalarında sayıya odaklanılmıştır. 10^5- 10^8 beyaz kan hücresi başına yaklaşık olarak 1 CTC bulunuşu, bu hücrelerin tespitini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle sayım öncesi zenginleştirme ve tespit etme adımları uygulanmaktadır. CTC'nin tespiti için nükleik asit bazlı teknikler (RT-PCR, RT-qPCR, mikroarray, sekanslama) ve/veya protein bazlı teknikler (immunofloresan, akan hücre ölçer cihazı-antikor bağımlı saptama) en sık kullanılanlardır (6). Bunların yanı sıra boyut bazlı teknikler (mikropor filtrasyon) ve görüntüleme bazlı teknikler (taramalı mikroskop, floresan aktif hücre ayrımı) de mevcuttur (8).

Çalışmamızda, akan hücre ölçer cihazıyla evrelendirilmiş vakalarda CTC sayısının belirlenmesi, hastalığın metastaza gidip gitmeyeceği hakkında öngörü elde edilmesi amaçlanmaktadır. Hasta tanı ve tedavisinde proaktif yaklaşım gerçekleştirmek hedeflerimizden birisidir. Bu yöntemin en önemli tercih sebebi ise ekonomik olarak diğer yöntemlere göre daha ucuz ve noninvaziv olmasıdır.

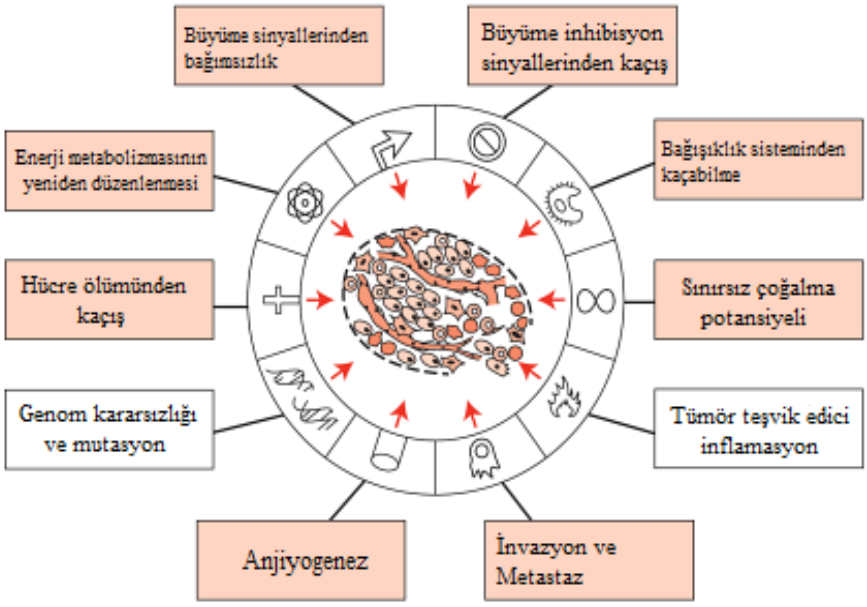
Mesane kanserli hastalarda opere öncesi ve sonrası CTC sayısının saptanması ile hem hastalığın prognozu hakkında, hem de modifiye etmiş olduğumuz bu yöntem kullanılarak ilerleyen zamanlarda hastalığın nüks edip etmeyeceği hakkında ön bilgiye sahibi olunması planlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, düzensiz hücre bölünmesiyle karakterize bir grup hastalığın ve asıl başlangıç yerlerinden ayrılıp vücudun diğer bölgelerini istila eden hücrelerin genel adıdır. Kanserin 100'den fazla tipi tanımlanmıştır. Kanseri karakterize eden ise köken aldığı dokudur. Aşağı yukarı tüm kanserlerin %85'i epitelyal kökenli olup "karsinoma" olarak adlandırılır. Kemik, kas gibi mezoderm kökenli kanserlere "sarkoma", meme gibi beze kökenli kanserlere ise "adenokarsinoma" adı verilir (9).

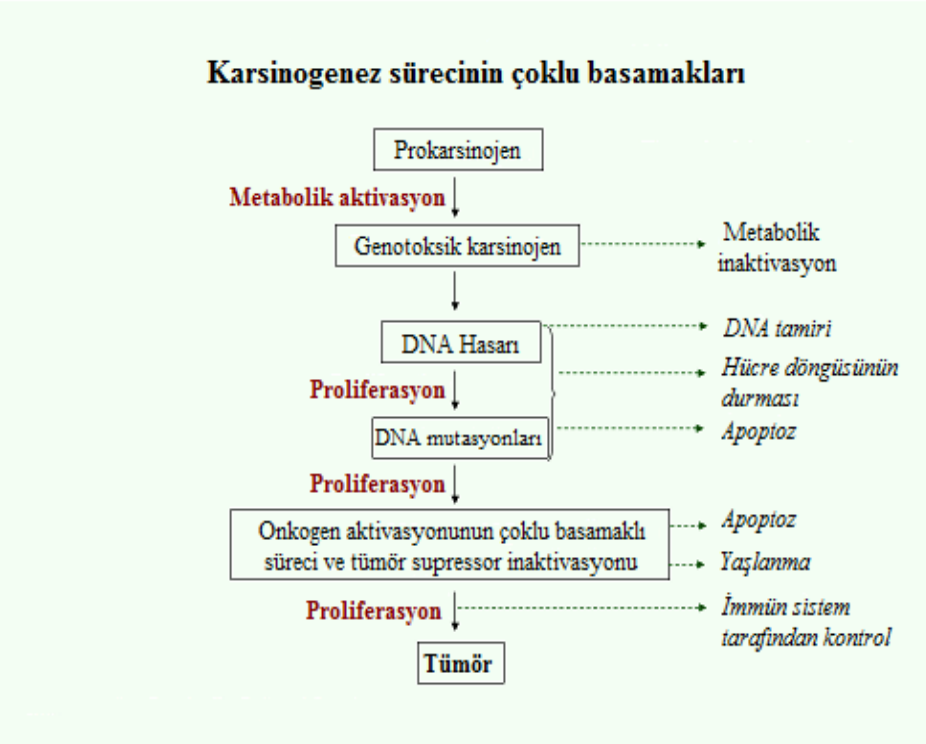
Kanser hücreleri hızlı bölünme kapasiteleri, canlı kalma süreleri, istila ve metastaz yetenekleri ile kanserleşmeye sebep olurlar. Kanserin karakteristik özellikleri arasında büyüme sinyallerinden bağımsızlık (örn. epidermal büyüme faktörü reseptörü-EGFR ile büyüme), büyümeyi inhibe eden sinyallerden kaçabilme (örn. Siklin bağımlı kinaz ile), bağışıklık sisteminden kaçabilme , replikatif hücre ölümünden kaçabilme (örn. Telomeraz aktivitesi ile kromozom uçlarına sürekli telomer eklenmesi ile), tümör oluşumuna teşvik etme, invazyon ve metastaz yapabilme, anjiyogenezi uyarma (örn. vasküler endotelyal büyüme faktörü-VEGF ile), genomik kararsızlık ve mutasyonlar barındırma, hücre ölümünden kaçabilme, enerji metabolizmasını yeniden programlayabilme (Warburg etkisi), kontrolsüz çoğalma, bölünme için dış sinyallerden bağımsızlık, çoğalmayı baskılayan sinyallere karşı duyarsızlık vardır (Şekil 2.1) (10, 11). Ayrıca, inflamasyon, genetik çeşitliliğin sebep olduğu genom kararsızlığı ve mutasyonlar da tümör teşvik edici role sahip olduklarından dolayı, kanserin karakteristik özellikleri arasında sayılabilir (11).



Şekil 2.1. Kanserin ayırıcı özellikleri (9, 11).

2.1.1. Karsinogenez

Karsinogenez; proto-onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin değiştirilmesini gerektiren, prokarsinojenlerin metabolik aktivasyonundan başlayıp, birçok onkogenin aktivasyonuna ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna kadar uzanan çok aşamalı bir süreçtir (Şekil 2.2). Normal proto-onkogenler; büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, sinyal dönüştürücüleri ve hücre döngüsü proteinleri gibi kodlanmış proteinlerin aracılığı ile hücrenin normal olarak büyümesini ve gelişmesini düzenleyen onkogenlerin bir parçasıdır. Şayet bu proto-onkogenler; virüsler, kimyasallar ve/veya radyasyon gibi spontan veya eksojen mutajenik faktörler tarafından aktive edilirse, onkogenlere dönüşürler. Bu onkogenler ise; aynı fonksiyonu gösteren ama iç düzenleme kontrolü bulunmayan protein ürünlerini kodlayan onkoproteinlerini üretir. Bu onkoproteinler; çeşitli sinyal yolaklarına etki ederek, hücrenin normal hücre döngüsüne girmesine engel olur ve böylece otonom disregüle hücre bölünmeleri ile malign transformasyon içeren hücreler meydana gelir (12).



Şekil 2.2. Karsinogenez süreci (13).

2.1.2. Kanserli Hücrelerin Karakteristik Özellikleri

Kanser, somatik hücrelerdeki genetik değişiklikler sonucu elde edilen özellikler ile karakterizedir: dış büyüme sinyallerinden bağımsızlık, dış anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçma yeteneği, devamlı çoğalma yeteneği, anjiyogenez ve vaskülariteyi tetiklemek için hücre yığını oluşturma yeteneği, ikincil tümörleri oluşturabilme ve diğer dokuları istila edebilme yeteneği. Her kanser hücresi kendine özgüdür ve bu özelliklerden birine ya da birkaçına sahiptir (14).

Büyüme Sinyal Otonomisi: Normal hücreler bölünebilmek için eksternal uyarılara (büyüme faktörleri gibi) ihtiyaç duyarken, kanser hücreleri genellikle normal büyüme faktörü sinyal mekanizmasından bağımsızdırlar. Büyüme faktörü yolaklarındaki mutasyonlar, kontrolsüz büyümeye sebebiyet verir (9, 15). Örneğin; insan melanomlarının yaklaşık %40'ında B-Raf proteininin yapısını etkileyen mutasyonlar mevcuttur (11, 16).

Büyümeyi İnhibe Eden Sinyallerden Kaçma: Vücutta hücre bölünmesi homeostazinin sağlanabilmesi adına inhibitör sinyallere cevap verir niteliktedir, lakin birçok hücre aktif olarak bölünememektedir. Kazanılmış mutasyonlar ve gen susturulması sonucu inhibitör yolaklar düzenli çalışamaz, kanser hücreleri de inhibitör sinyallere yanıt veremez (9, 15). Örneğin; BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germline mutasyonlar meme ve over kanseri için risk teşkil eder. Bu genlerdeki ikincil bir kazanılmış mutasyon sonucu BRCA1 ve BRCA2 genleri tümör süpresör genlere dönüşür ve genomik istikrarsızlığa ve karsinojeneze sebep olur (9).

Sınırsız Replikasyon Potansiyeli: Normal hücrelerde bölünme sayısı belli bir seviyeye ulaştığı anda yaşlanma süreci başlar. Bölünmenin sayılması ise kromozom uçlarında bulunan ve telomer olarak adlandırılan bölgelerin kısalması ile gerçekleşir. Özel bir DNA polimeraz olan telomeraz enzimi, DNA uçlarına telomer tekrar dizileri ekleyerek, telomerlerin kısalmasına engel olur. Kanserleşen hücrelerin yaklaşık %90'ında telomerazın aşırı sentezlenmesinden dolayı telomer uzunlukları değişmez (11). Bu sorun dolayısıyla kanserli hücreler sınırsız replikasyon potansiyeline sahip hale gelirler (9, 15).

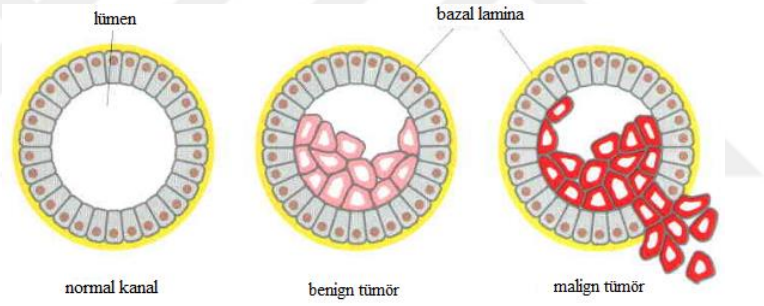
Apoptotik Hücre Ölümünden Kaçma: Normal hücreler apoptoz ile yok olurlar, lakin kanserleşmiş hücreler apoptotik sinyallerden kaçma potansiyeline sahiptir. Tümör gelişimi sırasında birçok sinyal molekül veya olay apoptozu uyarır. Apoptozu uyaran sinyaller arasında; DNA hasarı (hücre döngüsü kontrol noktaları hasarı veya ekzojen toksinler tarafından geliştirilen), telomer malfonksiyonu, hatalı proliferatif sinyallerin onkojenik mutasyonlar tarafından üretilmesi sayılabilir (15).

Tümör gelişiminde apoptozun engellenmesi metastaza yol açar. Tümör hücresinin metastaz yapabilmesi için, kan dolaşımında yaşayabilmesi ve diğer dokulara girebilmesi gerekmektedir (15).

Tümörlerin İsimlendirilmesi: Tümörler köken aldıkları parankimal dokunun histogenetik orijini (tümörün geliştiği doku veya hücre tipi) ve biyolojik davranışı (tümörün farklılaşma derecesi ve büyüme paterni) ile isimlendirilmektedir (15).

Neoplastik hücreler invaziv hale gelmedikleri sürece benign (iyi huylu) tümörler olarak adlandırılır ve çoğunlukla tedavi ile ortadan kaldırılırlar. Bir tümörün kanser olarak adlandırılması için işgal yeteneği kazanması sonucu malign (kötü huylu) olarak adlandırılan tümörlere dönüşmesi gerekir (Şekil 2.3). İnvaziflik kanser hücrelerinin önemli bir özelliğidir. Bu özellik ile hücreler kan veya lenf damarları yoluyla vücudun diğer bölgelerinde ikincil tümörleri oluştururlar. Bu süreç metastaz olarak adlandırılır (17).

Bir kanser metastaz yapmış olsa bile genellikle ortaya çıkışı spesifik bir organda tek bir primer tümöre dayanır. Primer tümörün başlangıçta tek bir hücrenin bölünmesinden köken aldığı ve bir takım kalıtsal değişikliklere bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Daha sonra birçok ilave değişiklikler ile komşu hücrelere nazaran daha hızlı büyüme, daha hızlı bölünme ve daha uzun yaşama kabiliyetleri kazanırlar (17).



Şekil 2.3. Benign ve malign tümörler (17).

Benign tümörler adlandırılırken, hücre orijininin sonuna –oma eki getirilir (örneğin; adenoma, osteoma gibi). Malign tümörler adlandırılırken de –karsinoma ya da –sarkoma eki getirilir (örneğin; adenokarsinoma, osteosarkoma gibi). İstisnai olarak glioma, melanoma, seminoma, hepatoma malign tümörlerdir. Bazı malign tümörler de hastalığı simgeleyen isimlerle anılmaktadır: Ewing sarkomu, Brenner tümörü, Hodgkin lenfoma gibi (18).

Adenoma ve papilloma, epitelyal tümörlerin benign formlarıdır, malign formları ise köken aldıkları epitele göre adenokarsinoma veya skuamöz hücreli karsinoma olarak adlandırılır. Fibroma veya leiyomiyoma ise mezenkimal tümörlerin benign formları olup, malign formları fibrosarkoma veya leiyomiyosarkoma olarak

adlandırılır. Lenfoid dokudan köken alanlar her zaman lenfoma olarak adlandırılır. Melanositlerin benign formları nevüs, malign formları melanoma olarak isimlendirilir (18).

Benign ve Malign Tümörlerin Genel Özellikleri: Benign tümörler genellikle köken aldıkları dokunun yapısına benzer özellikte olup, iyi diferansiye görünümlü, anaplazi içermeyen ya da az oranda içeren morfolojiye sahiptir. Malign tümörler ise genellikle farklılaşma hasarına, yapısal atipiye ve anaplaziye sahiptir. Benign tümörler yavaş büyürler ve mitotik figürleri nadir bulundururlar. Malign tümörler ise yavaş ya da hızlı büyüyebilir ve çok sayıda mitotik figür içerir. Benign tümörler genellikle bir kapsül ile kaplı olup, koheziv ve ekspansil büyüme paterni gösterir, invazyon yapmazlar. Malign tümörler ise kapsül içermez, infiltratif büyür ve diğer dokulara invazyon yaparlar. Benign tümörler metastaz yapmazken malign tümörler metastaz ile karakterizedir. Tümör yayılımı doğrudan invazyon, vücut boşlukları, kan damarları ve lenfatikler aracılığıyla gerçekleşmektedir (18).

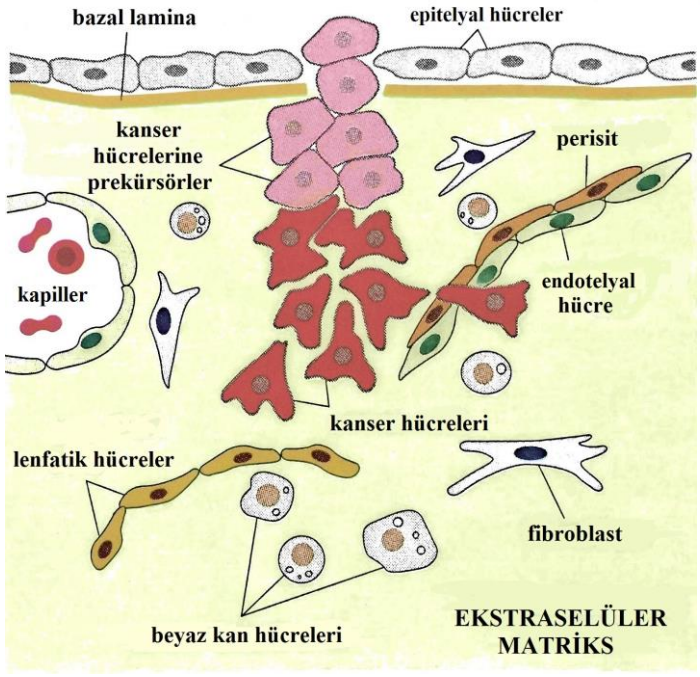
2.1.3. Hücre Farklılaşması

Kanser hücrelerinin büyümesi genellikle hücre ölümündeki ve hücre farklılaşmasındaki hatalı kontrollere dayanmaktadır. Mutasyonlardan ve epigenetik değişikliklerden ortaya çıkan kalıtsal değişimler kanser gelişimine sebep olur. Böylece, kanser gelişimindeki her evrede, değişmiş hücrelerin sayısının artışı, tümörün ilerlemesine sebebiyet verir (17).

Kanser hücrelerinin büyümesine katkıda bulunan birçok özellik vardır. Bu özelliklerin farklı kombinasyonları ile de farklı türde kanserler ortaya çıkmaktadır. Bunun yanı sıra tüm kanserlerde ortak olan özellikler de bulunmaktadır: olması gereken kontrolleri engeller ve normal hücrelerin gitmeyeceği kısımlarda çoğalır ve yayılırlar. Lokalize oldukları bölgelerde aerobik glikoliz ile büyüyemedikleri takdirde oksidatif fosforilasyon ile metabolize olurlar, gerektiğinde hücre bölünme döngüsünden de geçerler. İnvazif tümörler köken aldıkları dokudan uzaklaşır, metastaz yaparak diğer bölgelerde prolifere olur ve hayatta kalırlar. Anormal stres koşulları altında normal hücreler apoptoza giderken, tümör hücreleri hayatta kalmaya

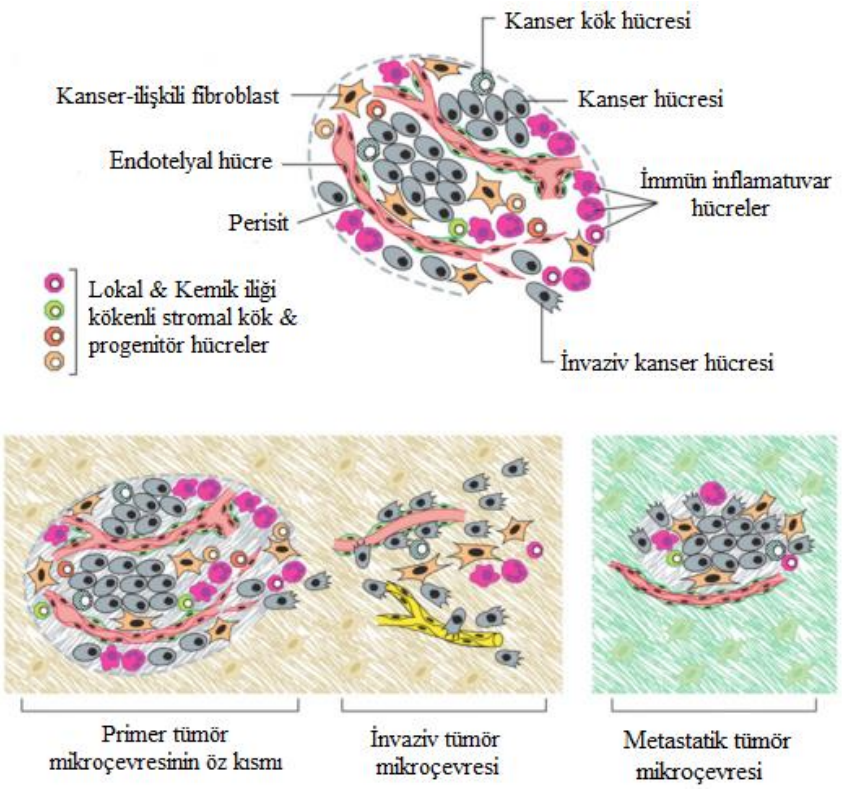
devam eder. Telomeraz üreterek ve telomerlerini stabilize ederek, replikatif ölümsüzlük kazanırlar (17).

Kanser Gelişiminde Tümör Mikroçevresinin Etkisi: Tümördeki kanserli hücreler tehlikeli mutasyonların taşıyıcısı olabilmektedir. Normal gelişimde görülen epitel hücreleri ile mezenkimal hücreler arasındaki iletişimin bir benzeri, tümör gelişiminde tümör hücreleri ile tümör stroması arasında mevcuttur. Tümör stroması fibroblastları içeren normal bağ dokusu hücrelerinden ve inflamatuar akyuvarlardan oluşmuş olup, tümör için çerçeve görevi görmektedir. Tümörler, kanser hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tipinden meydana gelirler. Bunlar endotelyal hücreler, perisitler (vasküler düz kas hücreleri), fibroblastlar ve inflamatuar akyuvarlardır. Bu hücreler ile diğer hücre tipleri arasındaki iletişim, tümör gelişiminde önemli rol oynar (Şekil 2.4). Kanserleşme sürecinde, salgılanan sinyal proteinler sayesinde oluşan stromadaki değişiklikler ve ekstaselüler matriksi düzenleyen proteolitik enzimler görevlidir. Tümör ve stroması birlikte gelişerek, tıpkı yabani otların ekosistemi işgal edişi gibi, kendine özgü stromal hücreler ile birlikte gelişir, başka çevrelere yerleşerek orada prolifere olurlar (19).



Şekil 2.4. Mikroçevre elemaları (19).

En solid tümörler farklı hücrelerin bir araya gelmesiyle oluşur. Tümör parenkiması ve stroması, tümörün büyümesi ve ilerlemesi için gerekli olan farklı hücre tiplerinden oluşur. Özellikle immün inflamatuvar hücreler hem tümör gelişimde hem de tümörün yok edilmesinde görev alan alt tipler içermektedir (Şekil 2.5). Stroma hücre tiplerinin çokluğu, histolojik organizasyonu, fenotipik özellikleri, invaziv hale gelirken ve metastatik sürece girerken zamanla değişir (Şekil 2.5) (11).

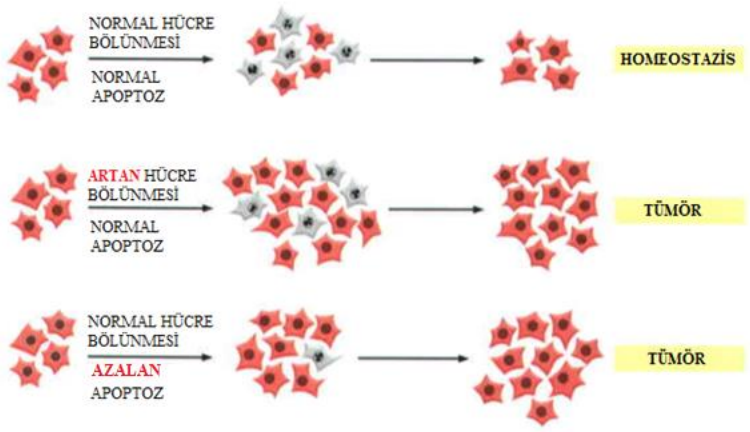


Şekil 2.5. Mikroçevrenin değişimi (11).

2.1.4. Hücrelerin Ölümsüzlük Kazanması

Kanserli hücrelerin, hücresel stresten ve DNA hasarından kaçabilme yetenekleri mevcuttur. Gelişmiş organizmalar hasarlı hücrelere karşı güçlü güvenlik mekanizmaları barındırır ve hücreyi apoptoza sürüklerler. Kanser hücreleri bu mekanizmalardan kurtulmak ve hayatta kalabilmek için mutasyon geliştirirler. Kanser hücrelerinin metabolik süreçleri dengesiz hale geldiğinde ve temel hücre bileşenleri uyumsuzluk gösterdiğinde anormal durum ilan edilir ve mutasyonlar

meydana gelir. Hücrenin homeostazisinin yetersiz olduğu bu durumlar, zayıf (gevşek) hücre stres durumları olarak adlandırılır. Bu duruma örnek olarak; kanserde gelişen kromozom kırılmaları ve DNA hasarı verilebilir (19). Örneğin; kömürün yanmasıyla ortaya çıkan Benzo(a)piren, mutajenik ve oldukça etkili bir karsinojen olup kromozom kırılmalarına neden olmaktadır (20). Böyle durumlarda prospektif kanser hücresi hayatta kalabilmek ve sınırsız bölünebilmek için mutasyon geliştirerek normal güvenlik mekanizmalarını devre dışı bırakır. Kanser hücresinin en önemli özelliği olan apoptozdan kaçabilme yetisi bu şekilde kazanılır. Normal dokularda homeostazı koruyabilmek adına, hücre bölünmesi apoptoz sayesinde dengeli bir şekilde gerçekleşir. Tümör oluşumu sırasında ise apoptoz inhibisyonu ile birlikte hücre bölünmesi kontrolsüz bir artışa gider. Şekil 2.6'daki gri hücreler apoptoza giden hücreleri temsil etmektedir. Hem hücre bölünmesindeki kontrolsüz artık hem de apoptozdaki azalma, tümör büyümesine katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.6) (19).



Şekil 2.6. Tümör oluşumu sürecinde hücre bölünmesinin artışı ve apoptozdan kaçış (19).

Daha önce yapılan çalışmalarda görülmüştür ki, normal insan hücreleri kültürde çoğaltıldığında belirli bir limitle sınırlanmaktadır. Hücre bölünmesini sayan bu mekanizma "replikatif hücre yaşlanması" olarak adlandırılır ve kromozom uçlarında bulunan telomerlerin kısalmasına bağlıdır. Normal hücre döngüsünün S fazında, telomeraz enzimi sayesinde telomer DNA'sı replike olur ve kromozom uçları korunur. Çoğalmakta olan insan hücrelerinde telomerazda herhangi bir bozukluk olması durumunda, telomerler her hücre bölünmesinde kısalır ve DNA hasar sinyali oluşur (19).

İnsan kanser hücreleri şu iki yoldan biriyle replikatif hücre yaşlanmasını önleyebilmektedir: bölünme esnasında telomeraz aktivitesini koruyarak telomer kısalmasını önlerler ya da kromozom uçlarını uzatmak için "Alternatif Uzatılan Telomerler" (alternative lengthening of telomeres-ALT) olarak adlandırılan homolog rekombinasyona dayalı bir mekanizma geliştirirler. Bu nedenle, tümör hücrelerinin hücre döngü süresi de normal hücrelere oranla çok daha uzun sürebilmektedir (19, 21).

Kanser hücrelerinde ölüm çoğunlukla programlanmış hücre ölüm tiplerinden olan apoptoz, otofaji ve programlanmış nekroz ile gerçekleşmektedir (22). Apoptozdan kaçan kanser hücresi, daha çok besine ve oksijene gereksinim duyacağı için yaşam koşulları güçleşir. Bu nedenle apoptozdan ziyade nekroz ile ölüme gitmelerine rağmen, hücre doğum oranı hücre ölüm oranından fazla olduğu için yine de büyümeye devam ederler (19).

Anjiyogenez: Tıpkı normal hücrelerde olduğu gibi kanser hücreleri de oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılamak için kan damarına ihtiyaç duyarlar. Apoptozdan kaçan ve sınırsız bölünme yetisine sahip olan kanser hücresi, büyüyebilmek ve yaşamını sürdürebilmek için, kan damarı oluşumunu yani anjiyogenezi uyarır (15, 23).

Tümörler anjiyogenez gerçekleştiremediği durumlarda 1-2 mm çaptan fazla büyüyemez. Bu çap, difüzyonla oksijen ve besin alabilmek için gerekli olan maksimal uzaklıktır. Hipoksi durumunda, apoptoz uyarılır ve damarlanma olmadıkça tümör büyüyemez (15).

Anjiyogenez var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşması ile gerçekleşir (24). Anjiyogenez esnasında hücre dışı matrikste değişiklikler olduğu gibi, hücrelerin çoğalması, göç etmesi ve tüp oluşumu da gerçekleşir. Anjiyogenez için bir belirteç olan kan damarı yoğunluğu (blood vessel density-BVD), hastaların malign potansiyeli ve kötü prognozu ile ilişkilidir. Kanser hücrelerinin yayılmasını ve yeni damar oluşumunu hedef alan ilk anti-anjiyojenik tedavi 1971 yılında uygulanmıştır (25). O zamandan bu yana çok sayıda araştırmacı, anjiyogenezin moleküler mekanizması üzerine odaklanmıştır. Anjiyogenezin düzenlenmesi karmaşık bir mekanizma olup, anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki

dengeye bağlıdır (26, 27). Tümör hücrelerinde, makrofajlarda yapılan ve kapiller oluşumu sağlayan çok sayıda anjiyojenik faktör bulunur. En iyi bilinen anjiyojenik faktörler; VEGF ve bazik fibroblast büyüme faktörüdür. Çoğu insan tümöründe büyümenin erken dönemlerinde anjiyogenez uyarılamaz, tümör vasküler sessizlikte senelerce *in situ* kalır (15).

Anjiyogenez uyarıcı faktörler arasında; hipoksi, glikoz ve demir eksikliği, reaktif oksijen veya asidoz oluşumu, onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin deaktivasyonu sayılabilir (27).

2.2. İnvazyon ve Metastaz

Normal hücreler vücutta bulundukları lokasyonu korurken, kanser hücrelerinin başka yerlere göç edişi kanserden ölümlerin majör nedenidir (15, 28). Malign tümörlerin diğer bölgelere giderek, orada ikincil tümör oluşturmaları metastaz olarak adlandırılır (28).

Tümör hücresinin metastaz yapabilmesi için birçok engeli aşması gerekmektedir. Hem hücre içerisinde (intrensek) hem hücre dışarısında (ekstrensek) birçok koruyucu sistemi geçmek zorundadır. İntrensek koruma mekanizmaları; apoptoz sinyal yolağı, telomerlerin kısalması ve büyüme önleyici faktörlerin ekpresyonudur. Tümörün ilerlemesini önleyebilecek ekstrensek faktörler ise; ektraselüler matriks elemanları, bazal membran, reaktif oksijen, immün sistem koruması, besin ve oksijen yetersizliğidir. Tüm bu engeller, DNA mutasyonları, kromozom düzenlemeleri, epigenetik değişiklikler ile genomik kararsızlığın (instabilitenin) gelişmesiyle aşılır. Metastaz ve genetik instabilite arasında doğru orantı vardır. Cifone ve arkadaşlarının hücre hatlarında yapmış olduğu bir çalışmada görülmüştür ki; metastaz yapmayan hatlara göre yüksek metastaz oranı bulunan hatlarda genetik kararsızlık da daha yüksektir (23, 29).

İnvazyonda görevli enzimlerin, hücre-hücre ya da hücre-ekstraselüler matriks adhezyonunda görevli moleküllerin aktivitesinin veya düzeylerinin değişikliğe uğramasındaki sebep genomdaki değişikliklerdir. Tümörlerin metastaz yapması çeşitli sıralı basamaklardan oluşan kompleks bir olaydır (15).

Metastatik süreç iki evrede ele alınabilir: Birincisi ekstraselüler matriksin (ECM) invazyonudur. İnsan dokuları bazal membran ve interstisyel bağ dokusu bölümleri ile organizedir. ECM bileşenlerinin herbiri kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler içerir. İkincisi ise tümör hücrelerinin vasküler yayılımı ile gittikleri bölgeye yerleşmeleridir (15).

Metastatik Süreçte İnvazyon ve Vasküler Yayılım Basamakları:

Tümör hücrelerinin birbirlerinden ayrılması şu şekildedir; E-kaderin hücreler arasındaki yapışmayı sağlar ve sitoplazmik parçası β-katenin'e tutulu haldedir. Epitelyal kanserlerde genellikle E-kaderin genleri inaktive olur ve β-katenin genlerinin aktivasyonu ile E-kaderin fonksiyonu kaybolur (15, 30).

Tümör hücrelerinin ECM proteinlerinden laminin ve fibronektine tutunması: Normal epitel hücreleri bazal membran yüzeylerinde bazal membranın laminini için reseptörler bulundurur. Kanser hücreleri ise, tüm yüzeylerde çok sayıda laminin reseptörüne sahiptir (15, 20).

Tümör hücreleri proteolitik enzim salgılar veya fibroblast gibi konak hücrelerinden proteaz salgılanmasını uyarır. Matriksin parçalanmasını sağlayan ve metalloproteinazlardan olan jelatinaz, kollajenaz ve stromelizin enzimleri de bu sırada salınırlar (15).

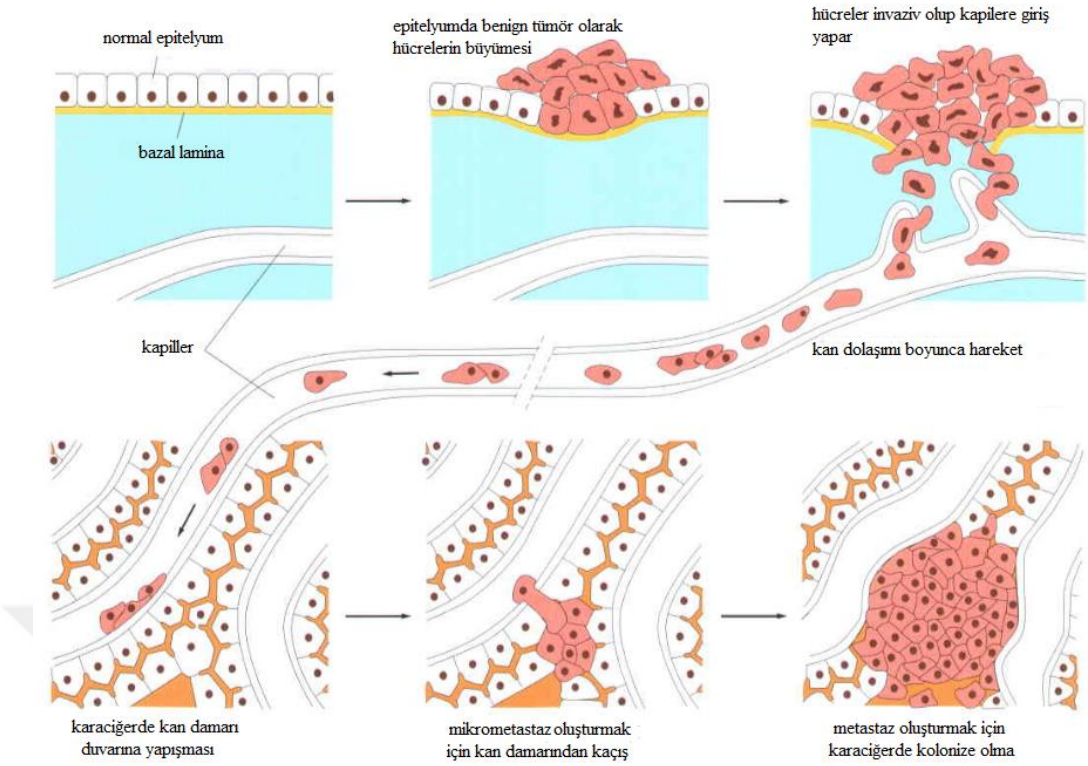
Tümör hücrelerinin parçalanan bazal membran ve matriks proteoliz bölgelerinden ayrılmaları, salgıladıkları "otokrin motilite faktörü" olan sitokeratinlerce sağlanır (15, 31).

Tümör hücrelerinin vasküler yayılımı ve lokalizasyonu: Tümör hücreleri dolaşıma katıldıklarında immün hücreleri tarafından yok edilebilir, ya da lökosit ve plateletlere yapışarak, küme halinde "tümör embolisi" oluşturur ve bu sayede naturel killer hücrelerinden kaçabilirler. Tümör hücreleri çoğunlukla tek dolaşır ve damar dışına çıkabilmek için vasküler endotele yapışıp bazal membranı geçerler (15, 32).

Damar dışına çıkan tümör hücresi başka bir bölgeye gidebilmek için hareketlilik kazanmalıdır. Bu aşamada tek bir hücre olarak ya da hücre grubu olarak

hareket edebilirler. Tek bir hücrenin temel hareket mekanizması mezenkimal invazyon ve ameboid invazyondur. Epitelyal hücreler mezenkimal invazyon sonucu, epitelyal-mezenkimal dönüşüm (epithelial-mesenchymal transition EMT) adı verilen sürece girerler. Bu aşamada hücreler, bir veya daha fazla psödopod sahibi olur ve aktince zengin bu psödopodlar sayesinde hareketlilik kazanırlar. Ameboid invazyonda ise hücreler küresel şekilli olup, daralma ve genişleme hareketi yaparak ilerlerler (31).

Primer tümörden ayrılan, kan damarı ya da lenfatik yollarla başka bölgeye taşınan tümör hücreleri gittikleri bölgeye nüfuz edebilmek için, oradaki bazal membranı da kırmalı ve stromaya varmalıdır. Ekstraselüler matriks proteazların aktivitesini proteoliz ile kırıp vakit bazal membrana ulaşır ve oradan içeri girerler. 1889 yılında Stephen Paget'in öne sürdüğü "tohum ve toprak" teorisine göre, yerleşen tümör hücreleri (tohum) yalnızca onlar için en elverişli organlara (toprak) lokalize olurlar (28). Örneğin Şekil 2.7.'de mesane tümörünün karaciğere metastaz süreci gösterilmiştir (19).



Şekil 2.7. Metastaz basamakları (19).

2.3. Mesane ve Mesane Kanseri

2.3.1. Mesane

İdrarın depolanmasında ve boşaltılmasında görevli olan, pelvik yerleşimli, içi boş muskuler bir organdır. Boşken erişkinlerde simfiz pubisin arkasında yer alırken, yeni doğanlarda ve çocuklarda dessensus tamamlanmadığından daha yukarıdadır (33). Pubis ile arasındaki boşluğa spatium retropubicum (Retzius aralığı) denilmektedir. Retzius aralığında Santorini plexus'u denilen zengin ven pleksus'u yer almaktadır. Mesane, dolu olduğu durumda karın ön duvarının extraperitoneal dokusu içinde yukarıya yükselir. Kadınlarda mesane, erkelerdeki gibi yerleşimlidir ama prostat olmadığı için daha aşağıda bir konumdadır. Çocuklarda ise 5-6 yaşına kadar daha yukarıda yerleşmiş durumdadır. Mesane kapasitesi yetişkinlerde ortalama 220 mL'dir, maksimum kapasitesi ise 400-500 mL kadardır (34).

Mesanenin Bölümleri:

Apex vesicae: Mesanenin tepe kısmı olup tamamen periton ile örtülüdür. İnce bağırsak, colon sigmoideum ile komşudur. Ayrıca, kadınlarda uterus'un fundus'u ile komşudur. Apex vesicae'dan başlayan lig.umbilicale mediana, göbeğe kadar uzanmaktadır ve içerisinde urachus'un kalıntısı bulunur (34).

Fundus vesicae: Mesanenin arkaya ve aşağıya bakan konveks kısmıdır. Erkeklerde prostata komşu olup, sıkıca bağlıdır. Prostatın üst kısmında yer alan ve mesanenin yan kısımlarında bulunan erkek iç genital organı bezine vesicula seminalis denilmektedir. Arka kısımda rektum ile komşuluk yapar. Kadınlarda ise, cervix uteri, vajinanın ön yüzü ve her iki üreterin son parçaları ile komşudur (34).

Corpus vesicae: Apex ile fundus arasında yer alan büyük bölümdür (34).

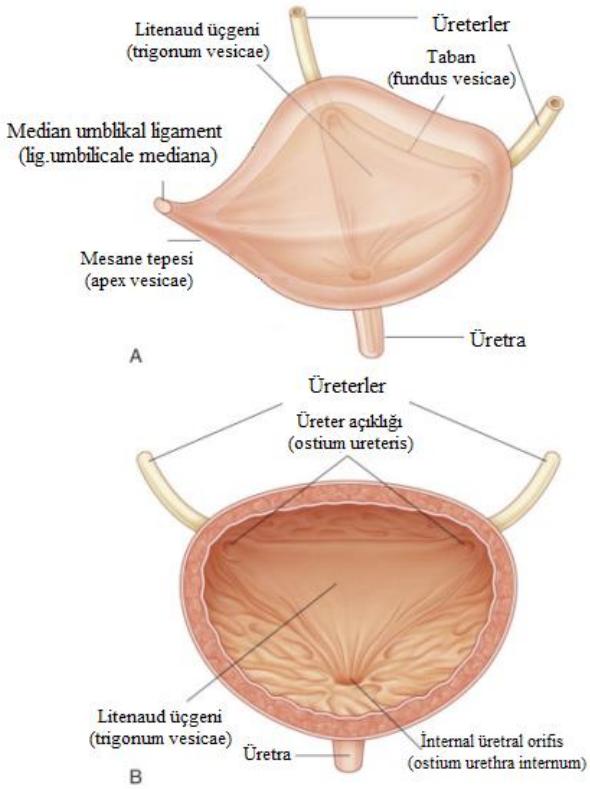
Cervix vesicae: Altta kalan dar kısım olup hareketsizdir. Erkeklerde glandula prostatica üzerine yerleşmiştir. Kadınlarda ise fascia pelvis ile kaplanmıştır (34).

Mesanenin Yapısı: Mesanenin iç yüzeyinde en içte tunica mucosa'nın kıvrıntıları olan plikalar mevcuttur. Bu plikalar mesane doldukça gerilerek kaybolur. Mesanenin tabanına doğru üçgen bir alan vardır ve bu kısım trigonum vesicae (Liteuaud üçgeni) olarak adlandırılır. Trigonum vesica'da tela submucosa bulunmaz ve bu kısım düzdür. Trigonum vesicae'nın arka lateral köşelerinde üreterlerin açıldığı delikler (ostium ureteris) görünür. Üçgenin ön alt köşesinde de mesanenin üretraya açıldığı ostium urethra internum bulunmaktadır (34).

Mesanenin boş olduğu durumda iki üreter açıklığı arasında yaklaşık 2.5 cm mesafe vardır. Trigonum'un iki ostium ureteris arasındaki kenarı plika interureterica olarak adlandırılır ve klinik olarak sistoskopi esnasında ostium uteris'lerin bulunmasında önem taşır. Bu plakanın arkasında bulunan fossa retroureterica'da özellikle yaşlılarda rezidüel idrar kalmaktadır. Erkeklerde ostium urethra internum'un arkasında prostat tarafından oluşturulan bir kabartı (uvula vesica) bulunur. Bu kabartı urethraya doğru daha aşağılarda crista urethralis adını alır ve devam eder (34).

Mesane düz kas yapısındadır. Kas tabakaları sırasıyla; en dışta longitudinal, ortada sirküler, en içte de tekrar longitudinal şeklindedir. Mesanenin kasları m. detrusor vesicae olarak adlandırılmaktadır ve bu kaslar mesane boynunda sirküler tabaka m. sphincter vesica'yı oluşturmak üzere kalınlaşır (34).

Mesane retroperitoneal bir organ olup, üst yüzeyi tamamen peritonla kaplıdır. Arka yüzün ise sadece yukarı kısmı peritonla örtülü şekildedir. Diğer yüzeyler komşu organlara bağ dokusu ile tutunmaktadır. Karın ön duvarından göbeğe doğru uzanan 3 plika vardır: plica umbilicalis mediana, plika umbilicalis medialis ve plica umbilicalis lateralis. Bu plakalar arasında, karın ön duvarının iç yüzünde ve pubis kemiklerinin üzerinde fossae supravesicalis adı verilen iki adet çukur bulunmaktadır (34).



Şekil 2.8. Mesane Anatomisi. (A) Superolateral görünüm. (B) Litenaud üçgeni: Kesilmiş mesanenin önden görünümü (35).

2.3.2. Mesane Kanseri

2.3.2.1. Epidemiyolojisi

Mesane kanseri dünyadaki en yaygın malignitelerden biridir. Dünya genelindeki kanser vakalarında görülme sıklığı akciğer, meme, kolon, prostat, mide, karaciğer, serviks ve özofagus kanserlerinden sonra 9. sırada yer alır (2). Mesane kanserinin en yaygın türü ise mesanenin ürotelyal karsinomudur (3). Ürotelyal kanser, en sık görülen ikinci ürolojik malignitedir ve mesane kanseri tedavisindeki gelişmelere rağmen, genel prognozda belirgin bir iyileşme henüz yoktur. 5 yıllık sağkalım oranı ise %39-53 arasında değişmektedir (4). Dünyada kanser kaynaklı ölümler içerisinde, mesane kanserinden ölüm erkeklerde 10., kadınlarda 14. sırada yer almaktadır (36). 2013 yılı için tahmini kanserden ölümlerde prostat, meme, akciğer, kolon ve melanomadan sonra gelerek 6. sırada yer almaktadır. Mesane kanseri yaygın olarak 75-84 yaşları arasında görülmektedir (37). Hastalık, erkeklerde kadınlardan 2,5 kat daha sık görülür. En sık görüldüğü yaş dönemi 60-70'li yıllardır ve yaşla birlikte sıklığı da artar (38).

Türkiye' de yapılan kanser istatistiklerine göre mesane kanseri; akciğer, prostat ve kolorektal kanserinden sonra erkeklerde en sık görülen 4. kanser türüdür (39). 2009-2013 yılları için erkeklerde yaşa göre standardize edilmiş hızı 100.000 kişide 21.4, kadınlarda ise 2.9'dur (40).

2.3.2.2. Risk Faktörleri

Mesane kanserlerinin ortaya çıkışından, genetik faktörlerin dışında, mesleki karsinojenler, sigara, kronik enfeksiyonlar, mesanede taş veya yabancı cisimler, pelvik radyasyon, sitotoksik kemoterapi, bazı analjezikler ve gıdalar da etkilidir (41).

Sigara, kullanım miktarı ve süresine bağlı olarak mesane kanseri riskini artıran en önemli etkendir. Mesane kanserinden ölen hastaların yaklaşık %90'ının sigara kullandığı bilinmektedir (38). Sigara kullananlarda mesane tümörü gelişme

riski ortalama 4 kat daha fazladır ve latent period ise 20-30 yılı bulabilmektedir. Tütünde bulunan karsinojenler nitrozaminler ve 2-naphtylamine'dir. Sigara aynı zamanda mesane epitelinin proliferatif cevabını arttırır ve böylelikle karsinojenlerin etkisini arttırır (41).

Mesleki kimyasallara maruziyet en sık görülen ikinci faktördür. Bütün mesane kanserlerinin %20'si bu kimyasallardan kaynaklanmaktadır (41). Anilin boya kullanılan mesleklerde çalışmak mesane kanseri riskini 30 kat artırmaktadır. En sık karşılaşılan mesane karsinojeni kimyasallar aromatik aminlerdir ve bu kimyasallar deri, boya, lastik endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır (38). Bu endüstriyel karsinojenlerin etki süresi 40-50 yıl kadardır, ancak yoğun etki altında bu süre kısalabilmektedir (41).

Rekürren üriner sistem enfeksiyonları, taş gibi yabancı maddelerin mesanede bulunuşu da kanser gelişiminde etyolojik rol oynamaktadır. Nitrit ve nitrozaminlerin üretimine bağlı olarak, bakteriyel flora ve/veya enflamasyon etkisi görülmektedir. Bu maddeler hücre proliferasyonunu arttırmakla birlikte spontan genetik bozukluklara da yol açabilir. Bu tür maligniteler daha çok skuamoz karsinom oluştururlar. Kuzey Afrika ülkelerinde sıklıkla görülen Schistosoma haematobium isimli parazit tarafından oluşan schistosomiasis, parazit kurtlarından kaynaklanan bir enfestasyon olup mesane kanserine sebebiyet vermektedir (38, 41).

Pelvik radyasyon alanlarda da mesane kanseri görülme oranı 4 kat daha fazladır (38, 41). Radyoterapinin, kemoterapi ile birlikte verilmesi mesane kanseri riskini daha da arttırmaktadır (41). Meme kanseri tedavisinde kullanılan alkilleyici bir ajan olan siklofosfamid de mesane kanseri için risk faktörüdür ve mesane tümörü riskini 9 kat arttırır (38, 41). Siklofosfamid'in yıkım ürünü akrolein, akut mesane toksisitesinden sorumludur ve kanserin gelişmesindeki en önemli etkendir. Bu etkinin latent periodu 6 ile 13 yıldır (41).

Tüm bu karsinojenlerin mesane ile kontakt süresinin uzunluğu oldukça önemlidir. Tüm bunlardan kaynaklı idrar stazı mesane tümörü insidansını artırmaktadır ve mesanenin idrarla en çok temas ettiği orifis çevreleri ile trigon bölgesinde tümörler daha sık gelişir (41).

2.3.2.3. Patolojisi ve Tümör Yayılımı

Mesane kanseri, eş zamanlı olarak üriner sistemin diğer bölümlerinde de premalign olarak saptanabilmektedir. Hastaların maruz kaldığı karsinojenlerin tümü üriner sistem içerisinde bir "alan karsinojenezine" sebep olurlar (38).

Mesane kanserinin histolojisine bakıldığında, %90 değişici epitel hücreli (transitional cell carcinoma; TCC) ve %8 skuamöz hücreli karsinom olduğu görülür. Oldukça nadir görülen histolojik alt tipleri adenokarsinom, sarkomlar, karsinoid tümörler ve lenfomadır (38).

Karsinoma *in situ* (CIS); multifokal olan üroepitelyumu etkileyen yüksek dereceli bir malignitedir. Tedavi edilmediği durumda, %80'i 10 yıl içerisinde invaziv kansere dönüşür (38).

Yüzeyel karsinomların prognozu CIS'tan daha iyidir. Rekürrens oranı %80'dir. Düşük dereceli olanlar metastaz yapmazlar, ancak %10 kadarı yüksek dereceli hale dönüşüp metastaz yeteneği kazanırlar (38).

Mesane tümörlerinde yayılım en çok direkt invazyon yoluyla gerçekleşir. Genellikle kanser hücreleri primer mukozal lezyonun hemen altına blok olarak infiltre olmaktadır. Submukozaya ve müskülarise, lamina propria yoluyla geçer, buradan da lenf nodlarına ve uzak alanlara yayılım gösterirler. Kas invazyonu ve uzak metastaz arasında bağlantı vardır. Lokal olarak prostat, veziküla-seminalis, uterus, vajina, rektum ve bağırsaklara da kanser infiltre olabilmektedir. Prostatın stroması tutulduğu takdirde %80 uzak metastaz ortaya çıkmaktadır (41).

Bazı durumlarda lenfatik invazyon, hematojen yayılımdan önce ve ondan bağımsız olarak ortaya çıkar, en çok yayıldığı yer pelvik lenf nodları olmaktadır. Burada da en sıklıkla obturatora, sonrasında ise eksternal ilyak lenf nodlarına yerleşirler. Hematojen metastazlar mesane tümörlerinde daha nadir görülmektedir. Sıklıkla karaciğere, akciğere, kemiğe ve sürrenale metastaz yapmaktadırlar (41). Çoğunlukla tümörün lokal olarak büyümesi, idrar yollarına baskı yapması, üremi, kansere bağlı tükenmişlik veya karaciğer yetmezliği nedeniyle hastalar hayatını kaybeder (38).

2.3.2.4. Tanı ve Evreleme

Hastaların %90'ı hematüri, %20-30 kadarı mesane irritasyonu şikayetiyle başvurur. Lokal ileri hastalığın işareti pelvis ağrısıdır. Alt ekstremite veya genital bölgede ödem, venöz ve lenfatik obstrüksiyon olduğunda gözlenebilir (38).

İlk yapılması gereken tetkikler idrar analizi, kan sayımı, akciğer grafisi, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarıdır. Sistoskopi, tanı için en önemli inceleme olup, anormal görülen bölgelerden biyopsiler alınmaktadır. Sistoskopi sonrası bimanuel muayene de oldukça önemlidir. Çoğunlukla sistoskopi endikasyonları şu durumlardır; açıklanamayan veya kronik alt üriner sistem yakınmaları görülmesi, kanser şüphesi taşıyanlarda idrar sitolojisi olması, üst üriner sistem incelemeleri normal olup gros veya makroskopik hematüri görülmesi ve mesane kanseri hikayesi olması (38).

Hematürinin sebebi bilinmiyorsa, üst üriner sistemin araştırılması gerekmektedir, bunun için intravenöz pyelografi (İVP) kullanılmaktadır. İVP, üreter ve renal pelvis kaynaklı tümörlerin saptanabilmesine olanak sağlar ve sistoskopiden önce yapılması önerilmektedir. Gerekli durumlarda sistoskopi esnasında retrograd pyelografi ile üst üriner sistem tekrar incelenebilir. Tanısal olarak İVP'den daha üstün olan abdomino-pelvik bilgisayarlı tomografi (BT ürografi) yönteminde, toplayıcı sisteme kontrast madde verilerek, dolum defektine neden olan anormallikler tespit edilir; ayrıca anormal büyümüş lenf nodları, prevezikal yağlı doku invazyonu ve viseral metastazlar da saptanabilir. Bu yöntem son zamanlarda en sık tercih edilen üst üriner sistem görüntüleme modalitesidir (38).

Sistoskopi ile tanı konulan mesane tümörlerinin 2/3'ü idrar sitolojisi ile saptanabilmektedir. İdrar sitolojisi; mesane kanseri hikayesi olan hastaların takibinde, çevresel karsinojenlere maruz kalan ama semptomu olmayan hastaların taranmasında, kronik mesane irritasyonuna sahip hastalarda sistoskopi öncesinde faydalı olmaktadır (38).

Mesane kanserinde evreleme TNM (T=tümör, N=nod, M=metastaz) sınıflandırılmasına (Tablo 2.1) göre kas tabakasına invaze olmayan (erken evre-yüzeyel) ve kasa invaze olan (ilerlemiş) şeklinde yapılmaktadır. Hastalık evresi,

histolojik derece, CIS varlığı önemli prognostik faktörlerdendir. TNM evrelendirmesine göre, yalnızca 1 lenf nodu metastazı bile olsa hastalık evre 4 olarak kabul edilmektedir. Yüzeyel tümörlerde histolojik derece sağkalımı belirler. Yüzeyel ve yüksek dereceli tümörler tedavi edilmediklerinde invaziv tümörlere dönüşürler (38). Prognostik gruplara göre mesane kanserinin anatomik evresi belirlenmektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.1. Mesane kanserinin TNM evrelemesi (38, 42).

T Evresi		**N Evresi**	
T0	Primer tümör kanıtı yok	N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
Ta	İnvaziv olmayan papiller karsinom	N1	Gerçek pelviste tek lenf nodu metastazı
Tis	Karsinoma *in situ* (CIS)	N2	Gerçek pelviste multipl bölgesel lenf nodu metastazı
T1	Tümör subepitelyal bağ dokuyu invaze etmiştir	N3	Kommon iliak lenf nodlarına metastaz
T2	Tümör muskularis propriayı invaze etmiştir T2a: Yüzeyel muskularis propria invazyonu T2b: Derin Muskularis propria invazyonu	**M evresi**	
T3	Tümör perivezikal dokuları invaze etmiştir T3a: Mikroskopik invazyon T3b: Makroskopik invazyon (ekstravesikal kitle)	M0	Uzak metastaz yok
T4	Tümör, prostatik stroma, seminal veziküller, uterus, vajen, pelvik duvar veya karın duvarını invaze etmiştir. T4a: prostatik stroma, uterus, vagina invazyonu T4b: Pelvik duvar ve karın duvarı invazyonu	M1	Uzak metastaz var

Tablo 2.2. Mesane kanserinin anatomik evreleri (38).

Anatomik Evre / Prognostik gruplar	
0a	Ta N0 M0
0is	Tis N0 M0
I	T1 N0 M0
II	T2a N0 M0
	T2b N0 M0
III	T3a N0 M0
	T3b N0 M0
	T4a N0 M0
IV	T4b N0 M0
	Herhangi bir T N1-3 M0
	Herhangi bir T, herhangi bir N, M1

Erken Evre Hastalık: Bu evre sadece üroloji uzmanları tarafından sitoloji veya sistoskopi ile tespit edilebilir düzeydedir. Sesil ya da yüksek dereceli şüpheli olgularda, üst üriner sistem görüntülemesi gerekmektedir (38).

Kasa invaze olmayan tümörler, T0 evre invaziv olmayan papillomalar (veya karsinomlar), T1 evre lamina propriayı invaze eden tümörler ve Tis evre karsinoma *in situ* (CIS) şeklinde gruplandırılmaktadırlar. Bazı hastalarda bu durumlardan birkaçı birlikte görülebilir (38).

İleri Evre Hastalık: Kas invazyonu ve çoğunlukla metastaz görülen durumdur (38). İnvazyon, tümör hücrelerinin bazal membrana bağlanması ile gerçekleşir. Hücre yüzey proteini laminin, bazal membranın glikoprotein yapısındaki laminin reseptörüne yapışır. Bu laminin reseptörleri, invaziv tümör hücrelerinde daha fazladır. Tümör hücreleri bazal membrana bağlandığında, proteazlar aracılığıyla membran yıkımı gerçekleşir, hücrelerden salınan sitokinler hücre motilitesini artırır ve invazyon gerçekleşir (41).

2.3.2.5. Kullanılan Belirteçler

Klinikte erken tanı oldukça önemlidir. İdeal bir belirteç, basitçe ölçülebilmeli, güvenilir, ucuz, tekrar edilebilir olmalı, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmalıdır. Klinik açıdan belirtecin faydalı olabilmesi için; yüksek pozitif prediktif değere sahip olmalı, böylece yanlış pozitif sonuçların yol açacağı gereksiz tetkikler önlenebilmeli, aynı zamanda yüksek bir negatif prediktif değeri de olmalı, böylelikle tümörün saptanamamasına bağlı olarak oluşacak kanser progresyonu engellenebilmelidir. Pratikte bu şartları tam olarak sağlayan bir belirteç bulunmamaktadır (43, 44).

Mesane Kanserinde Kullanılan Biyolojik Belirteçler: Biyolojik tümör belirteçleri, kanser hücresinin oluşması ile birlikte ölçülebilen, genellikle düzeyi artan, protein, glikoprotein, enzim, karbonhidrat, DNA, RNA, gangliozid ve immünglobulin gibi moleküllerdir. Bu belirteçler kanda, idrarda ve diğer vücut sıvılarında saptanabilmektedir (43).

Potansiyel mesane tümörü belirteçleri rekürrensin saptanabilmesi için, idrar sitolojisine tamamlayıcı bir test olarak, idrar sitoloji testine göre daha ucuz ve daha objektif bir alternatif bulmak amacıyla ve hastayı sistoskopik değerlendirmeye yönlendirmek için kullanılmaktadır (44).

Tanısal belirleyicilere idrarda bakılırken, prognoz öngörüsü için kullanılanlara doku örneğinden bakılmaktadır (41).

Kullanılan Tanısal belirteçler: Yüzeyel mesane tümörlerinin tedavisinden sonra, hastalara belli aralıklar ile sistoskopi, sitoloji ve üst üriner sistem incelemesi ile takip yapılmaktadır. Sistoskopi oldukça invaziv ve takipte kümülatif olarak risk ve maliyeti artıran bir yöntemdir. Sitoloji ise bir laboratuvar testi değildir ve patoloğun deneyimine bağlı olarak değişmektedir, bu da örnekleme ile ilgili problemleri beraberinde getirir. Bu nedenle, invaziv olmayan yöntemlerden olan idrardaki üroteliyal hücreler, proteinler ve metabolitlere bakılarak tanı koyabilme ve izlem yapabilme bugün yaygın olarak kullanılmaktadır. Mesane kanseri belirteçlerinin genel bir listesi Tablo 2.3'te verilmiştir (41, 43).

Tablo 2.3. Mesane kanserinde yaygın olarak kullanılan tanısal belirteçler ve özellikleri (41).

Test	Saptanan Belirleyici	Örnek	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
BTA-Stat	Kompleman faktör H-bağımlı protein	İdrar	38-89	50-70
BTA-TRAK	Kompleman faktör H-bağımlı protein	İdrar	57-83	50-90
NMP-22	Nükleer mitotik aparat proteini	İdrar	47-100	55-80
BLCA-4	Nükleer matriks protein	İdrar	96	81-100
UBC	Sitokeratin 8 ve 18	İdrar	36-79	88-92
CYFRA 21-1	Sitokeratin 19	İdrar	75-97	67-71
HA-HAase	Hyaluronik asit ve hyalurinidaz	İdrar	88-94	84
Mikrosatellit DNA Testi	Kromozomlardaki mikrosatellit belirteçler	Eksfoliye hücreler	72-97	>95
Telomeraz aktivitesi	Enzim aktivitesi	Eksfoliye hücreler	70-90	60-70
Immuno Cyt	CEA, tümör hücrelerine bağlı müsinler	Eksfoliye hücreler	38-90	73-80
UroVysion	3, 7, 17 kromozomlardaki alterasyonlar	Eksfoliye hücreler	68-87	>90

Bu alanda kullanılan en eski yöntemler; BTA stat ve BTA-TRAK testeleridir ve idrarda H-bağımlı bir kompleman faktörünü monoklonal antikorlar sayesinde

saptayarak sonuç verir. BTA stat testi bir immünoassay testi olup, idrar 5 dakika boyunca reaksiyona tabi tutulur. BTA-TRAK testi ise bir ELISA testi olup, kompleman faktörleri kantitatif olarak ölçer. Bu iki testin de duyarlılığı çoğunlukla düşük dereceli tümörlerde azdır. Hastada aynı zamanda üriner enfeksiyon, taş, sistit ve hematüri gibi durumlar olması halinde, düşük özgüllük gösterirler (41, 44, 45, 46). Duyarlılıklarının yalnızca yüksek dereceli tümörlerde fazla olması erken evre tespiti için bir dezavantajdır.

Nükleer matriks proteinleri hücre çekirdeğinde bulunup nonkromatin yapıdadır. Bu proteinler DNA'yı organize ederek DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve gen ekspresyonunda görev alır. NMP-22 en yaygın kullanılan tarama testlerinden biri olup, mesane kanserli hastalarda düzeyleri 25 kata kadar yükselir ama sağlıklı bireylerde düzeyleri düşüktür. NMP'nin duyarlılığı tümörün çapına ve evresine bağlı olarak yükselmektedir. Her hücrede yer alan bir protein olduğu için artmış apoptoz durumunda da düzeyleri yüksek olmaktadır (41, 44, 45, 46, 47).

HA-Haase testi ise idrardaki hyaluronik asit (HA) ve hyalurinidaz düzeylerinin ölçülmesiyle gerçekleştirilir. HA bir glikoz aminoglikan olup tümör metastazını promote eder ve çeşitli tümörlerde düzeyi artar. Mesane tümörlerindeki büyüme ve invazyon bu test ile belirlenmektedir ve yüksek evrelerde duyarlılığı daha yüksektir (41, 44).

Hücre bazlı bir belirleyici olan mikrosatellit analizi mesane tümörlerinin tanı ve takibinde son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok kanserde 2 tür mikrosatellit instabilitesi bulunmaktadır. Bunlar; heterozigotluk kaybı (Loss of heterozygosity-LOH) ve mikrosatellit tekrarlama uzunluğundaki somatik alterasyondur (41, 48, 49). Mikrosatellit instabilitenin mesane kanseri ile ilişkisini ortaya koyan çalışmalardan birinde; mesane kanseri tanısı koyulan 20 hastanın 19'unda idrar sedimentlerinde bu kararsızlık tanımlanmıştır (50, 51). Mesane kanserinde sıklıkla karşılaşılan 9. Kromozomdaki LOH'dir, daha nadir olarak da 4p, 8p, 9p, 11p ve 17p'de de LOH görülmektedir. Bu testteki duyarlılık da tümör evresi yükseldikçe artmaktadır (41, 48, 49). Bu test duyarlılık ve özgüllük açısından güvenilir olsa da, pahalı bir yöntem olması ve deneyimli personel tarafından değerlendirilmesi gerekmesi açısından çok sık kullanılamamaktadır (41).

Telomerler kromozom uçlarında bulunan tekrarlı dizilerdir ve normal hücrelerde her hücre bölünmesinde kısalarak hücreyi zamanla ölüme götürür. Tümör hücrelerinde ise telomeraz eksprese edilir ve kromozom uçlarına yeni telomerler eklenerek hücre ölümsüzlüğü kazanılır. Mesane tümörlerinde de telomeraz aktivitesinin ölçülmesi hücre bazlı bir belirleyici olup tanıda yaygın olarak kullanılmaktadır (41, 44, 52). Aktivite Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bazlı çoğaltmaya dayanan TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) yöntemi ile saptanmaktadır. Bu test oldukça duyarlı olmasına rağmen sadece nitel analize olanak sağlamaktadır (53).

Prognostik Belirteçler: Bu belirleyiciler rekürrens, progresyon, metastaz gelişimi, tedaviye cevap, hasta sağkalımı gibi prognozu tayin etmeye yöneliktir. Bunlar; mikrosatellit odaklı belirleyiciler, proto-onkogenler/onkogenler, tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü düzenleyicileri, anjiyogeneze bağlı faktörler ve ekstraselüler matriks adezyon moleküllerdir (41).

Mesane kanserindeki potansiyel tümör baskılayıcı gen kayıpları; LOH analizi, floresans *in situ* hibridizasyon (FISH) analizi ve komperatif genomik hibridizasyon incelemeleri ile tespit edilmektedir. Yüksek dereceli ve ileri evre mesane kanserlerinde 17p, 3p, 13q, 18q veya 19q gibi kromozom kayıpları görülebilmektedir (41, 52).

Yapılan çalışmalar bir onkogen olan EGFR'nin ekspresyonu ile mesane kanseri arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir. Proto-onkogenlerden olan HER-2, H-RAS ve bcl-2 ile yapılan çalışmalar henüz çelişkili sonuçlar içermektedir. Bazı çalışmalarda prognostik bir ilgi yakalanırken bazılarında daha iyi ya da daha kötü prognoza ulaşılmaktadır (41, 48, 49).

Bir tümör baskılayıcı gen olan p53, hücre döngüsü ve apoptozisi düzenlemede rol oynar. p53 gen mutasyonu insan kanserlerinde görülen en yaygın genetik defekt olup, p53 birikimi mutasyona uğrayan p53 geninin göstergesidir. Yapılan çalışmalar immün-histokimya (IHC) ile gösterilen p53 pozitifliğinin, rekürrens ve sağkalım için bağımsız bir öngörü değeri taşıdığını ispatlamıştır. Çalışmalar göstermiştir ki; invaziv kanserlerde p53 pozitifliği olan tümörlerin, kemoterapiye cevabı düşük olmaktadır. Ancak aynı sonuçlar radroterapiye cevap

açısından gösterilememiştir. Rb geni diğer bir baskılayıcı gen olup, invaziv mesane kanserlerinde sağkalımın Rb normal olan hastalarda, negatif veya zayıf olanlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür (41, 44, 48, 54).

p21, p27 ve Ki-67 başlıca hücre siklusu düzenleyicileridir. p21-negatif tümörlerin daha kötü prognoza sahip oldukları, p27 düzeylerinin düşük dereceli, yüzeyel ve papiller tümörlerde daha yüksek olduğu, Ki-67'nin mesane kanseri progresyon ve rekürrensinde bağımsız bir prognostik belirteç olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (41, 55, 56).

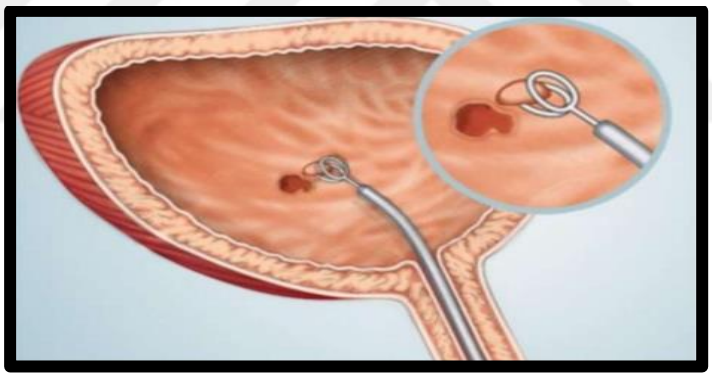
Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF), anjiyogenez bağımlı bir faktördür ve mesane kanserli hastaların idrarında daha yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Mesane kanserli hastaların idrardaki VEGF düzeyleri, Ta ve T1 evrelerinde tümör rekürrens hızı ile doğru orantılı olduğuna dair çalışmalar henüz yeterli düzeyde olmadığından bu belirtecin prognostik önemi tam olarak belirlenememiştir (26, 41, 52).

Matriks metalloproteinaz (MMP), E-Kaderin, CD44 ve çoklu ilaç direnç proteini (multidrug rezistance related-MDR), ekstraselüler matriks ve adezyon molekülleri kapsamındaki belirteçlerdir. NMP düzeylerinin artmış rekürrens ve azalmış sağkalım ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Azalmış E-Kaderin düzeyleri ise artmış kas infiltrasyonu ve uzak metastazla, ayrıca yüksek derece ve evre ile ilişkilidir. Mesane kanseri tanı ve taramasında önemli olduğu düşünülen ve hala konuya ilişkin çalışmalar devam eden bir hücre yüzey adezyon molekülü de CD44'tür (41, 46, 52, 57). CD44 varyant protein kaybının olduğu tümörlerde, kısa rekürrens süresi görülür (58).

2.3.2.6. Tedavi

Ta, Tis ve T1 tümörler transüretral rezeksiyon (TUR) (Transurethral Resection of Bladder Tumors-TURBT) (Şekil 2.9) ile tedavi edilebilirler. Kas invazyonu açısından bilgi edinebilmek için bu işlem sırasında yeterli kalitede doku alınmalıdır. Tümörün evresi ve invazyon derinliğine göre yineleme riski değerlendirilir, hastaya kontrol sistoskopi sıklığı ve gerekli görüldüğü durumda intravezikal tedavi önerilerinde bulunulur (38, 41).

İntravezikal tedavi, tam endoskopik rezeksiyon veya nadiren de olsa rezidü hastalığı eradike etmek adına, profilaktik ya da adjuvan amaçlı uygulanır. Bu tedavi ile hastalık nüksü engellenir, daha ileri evre tümör progresyonu geciktirilir. İntravezikal uygulamada tiyotepa, mitomisin C, valrubisin, dokso/epirubisin ve Bacillus Calmette-Guerin (BCG) gibi kemoterapi veya immünoterapi ajanları kullanılmaktadır (38, 54).



Şekil 2. 9. Transüretral rezeksiyon (TUR) (59).

İleri evre hastaların tedavi yönetiminde, hastanın yaşı, komorbid hastalıkları, daha önce aldığı tedaviler, tedavi tercihi, tümörün lokal yayılımı, lenf nodu tutulumu, uzak metastazı olup olmadığı gibi faktörler etkilidir (38).

T2-T4a ve lenf nodu negatif hastalara neoadjuvan sisplatin bazlı kemoterapi, ardından radikal sistektomi (RC) uygulanır (Şekil 2.10). pT3-4 ve nod pozitif hastalarda radikal sistektomi sonrası, neoadjuvan tedavi verilmemiş ise, adjuvan sistemik kemoterapi önerilir. Komorbid hastalıkları mevcut olan ve performansı kötü olan hastalara yalnızca TUR veya kemoterapi uygulanır. T4b ve lenf nodu negatif

hastalara ise 2-3 siklus kemoterapi veya kemoradyoterapi uygulandıktan sonra, sistoskopi, TUR ve görüntüleme ile kontroller gerçekleştirilir, rezidü tümör durumu ve tedaviye bağlı gelişen toksisitelere göre tedavinin devamına karar verilir. Evre 4 lenf nodu pozitif olan hastalarda, primer tedavi kemoterapi ve kemoradyoterapidir. Kemoterapi sonrası hastalık progrese olduğu takdirde, hastanın genel durumu, almış olduğu tedavilerin etkileri ve yan etkileri göz önünde bulundurularak gemsitabin, sisplatin, karboplatin, paklitaksel, dosetaksel, vinflunin gibi ajanlar/rejimler tek veya kombine halde uygulanmaktadır (38, 54, 60, 61).



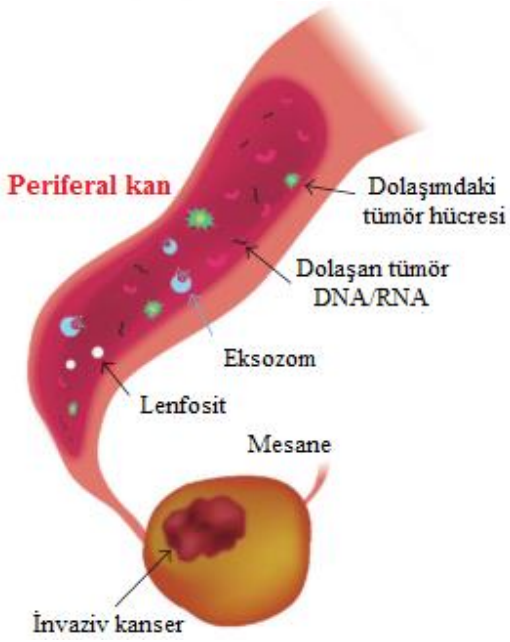
Şekil 2.10. Radikal sistektomi (RC) (62).

2.3.2.7. Prognoz

Hastalık evresi, histolojik derece ve CIS varlığı prognozu etkileyen en önemli faktörlerdir. Kasta, lenfatiklerde ve perivezikal yağlı dokuda invazyon olması kötü prognoza işarettir. CIS, 10 yıl içerisinde hastaların %80'inde invaziv karsinoma dönüşmektedir. Yüzeysel tümörler tedavi edilmedikleri taktirde invaziv hale dönüşürler ve tümörün histolojik derecesi sağkalımı belirler (38). 5 yıllık sağkalım oranı ise %39-53 arasında değişmektedir (4).

2.4. Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (CTC'ler)

Klinik uygulamarda ve çalışmalarda, özellikle birden fazla metastazı olan hastaların doku biyopsilerini, her bir metastatik lezyonun moleküler tanısını incelemek hem invaziv hem de pahalı olmaktadır. Bu nedenle, tekrarlanabilir ve minumum düzeyde invaziv olan yaklaşımlar geliştirilmektedir. "Sıvı biyopsi" olarak adlandırılan, kandaki biyobelirteçlerin değerlendirilmesine dayanan bu işlem çok daha az invazivtir. Bu biyobelirteçler; mikro RNA'lar (miRNA) ve proteinlere ek olarak eksozomlar, serbest dolaşan DNA (circulating cell-free DNA-cfDNA) ve dolaşımdaki tümör hücreleridir (Circulating Tumor Cells-CTCs) (Şekil 2.11) (63).



Şekil 2.11. Sıvı biyopsi şeması (56).

Metastazın periferik kan dolaşımındaki kanser hücrelerinin varlığı ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir ve bu hücreler dolaşımdaki tümör hücreleri olarak adlandırılmıştır (6). CTC`ler ilk olarak 1869 yılında Avustralyalı fizikçi Ashworth tarafından bahsedilmiş ve bu tarihten sonra CTC araştırmaları hız kazanmıştır (7, 64). CTC'lerin kanda sayılarının çok az olmasına rağmen, yüzey özelliklerine göre tespit edilmesi modern tekniklerle birlikte mümkün hale gelmiştir (19). Bu günlerde çalışmalar CTC sayımı ve karakterizasyonu üzerine yoğunlaşmış

olup, CTC prognostik ve farmakodinamik bir belirteç olarak kullanılmaya başlamıştır (65).

CTC analizi, tedavinin bireyselleştirilmesinde ve takibinde, invaziv olmayan "sıvı biyopsi" olarak kullanılmaktadır (66). Periferik kanda CTC'nin ortaya çıkışından, dolaşıma katılan primer tümör hücreleri veya metastatik hücreler sorumludur. Kanser hücrelerinde epitelyal-mezenkimal dönüşümün (Epithelial-Mesenchymal Transition-EMT) indüksiyonunun, CTC'nin üretiminin en kritik mekanizmalarından biri olduğu düşünülmektedir (63). Yapılan bir çalışmada CTC'nin 24 saatlik bir ömrü olduğu ve gün boyunca tespit oranında bir değişiklik olmadığı belirtilmiş, bu nedenle CTC'nin tümör aktivitesinde güvenilir bir parametre olduğu varsayılmıştır (7). Şu ana kadar yapılan diğer çalışmalarda CTC ömrü ile ilgili bilgi verilmemiştir.

10^5-10^8 beyaz kan hücresi başına yaklaşık olarak 1 CTC bulunuşu, bu hücrelerin tespitini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle sayım öncesi zenginleştirme ve tespit etme adımları uygulanmaktadır (6).

2.4.1. CTC Saptama Yöntemleri

Dolaşımdaki tümör hücreleri 10 mL kanda (100 milyon lökosit ve 50 milyar eritrosit) oldukça nadir bulunan hücrelerdir ve yüksek hassasiyette zenginleştirme yapıldıktan sonra karakterize edilmeleri mümkündür (65).

2.4.1.1. CTC Zenginleştirme Teknikleri

CTC'lerin zenginleştirme işlemi antikor tabanlı, boyuta dayalı ve yoğunluk gradiyentine dayalı olarak yapılabilmektedir (65).

Antikor Tabanlı Zenginleştirme: Bu teknikte, örneği zenginleştirmek için tümör hücresine spesifik olan antikorlar kullanılır. Birçok CTC saptama tekniğinde kullanılan, epitelyal hücrelere özgü "epitelyal hücre adezyon molekülü (EpCAM)"

bir transmembran glikoproteindir (67). EpCAM; sinyal iletiminde, hücre göçünde, farklılaşmada, proliferasyonda ve adezyonda görevlidir. Tümörlerin çoğunda EpCAM aşırı eksprese olur (68). Örneğin; yeni teknolojilerin altın standardı olarak kabul edilen Amerika İlaç ve Gıda Dairesi - FDA (U.S. Food and Drug Administration) onayına sahip bir sistem olan CellSearch® (Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, NJ, United States) sisteminde; EpCAM bağlı immünomanyetik boncuklar yardımıyla örnek zenginleştirilir, boyanır ve CTC sayımı gerçekleştirilir (67). Bir diğer sistem olan AdnaTest (AdnaGen, Langenhagen, Germany) hem EpCAM'e karşı hem de epitelyal hücre yüzey glikoproteini müsin-1 (MUC-1)'e karşı antikor kullanarak CTC saptar (65).

CTC zenginleştirilmesinde immünomanyetik olarak negatif ayrım da kullanılmaktadır ve yaygın olarak bir lökosit belirteci olan, lenfositlerdeki ortak antijen CD45 (cluster of differentiation 45) kullanılır (69). CD45 eksprese eden lökositlerden ayrım "negatif ayrım" (deplesyon) olarak adlandırılır. CD45; olgun eritrositler ve trombositler hariç tüm hematopoetik hücrelerde bulunan bir yüzey reseptörüdür ve "lökosit ortak antijeni" olarak adlandırılır (70). Örneğin; CTC-iChip sisteminde lökositlerlerin kandan immünomanyetik olarak, lökosit belirteci olan CD45 ve granülosit belirteci olan CD15 kullanılarak deplesyonu gerçekleştirilir (69).

Boyuta Dayalı Zenginleştirme: Epitelyal tümör hücrelerinin boyutlarına göre izolasyonu (ISET, Rarecells™); kanın 8 mm porlardan geçirilerek CTC'nin zenginleştirilmesi temeline dayanır (71). Kan örneğindeki hücreler mikroskobik kanallardan geçerken, akış hızlarına göre alt popülasyonlarına ayrılmaktadır. Normal hücrelere oranla CTC'lerin boyutları daha büyüktür ve kendine özgü membran özellikleri sayesinde daha az sıkıştırılabilir durumdadır. Bu mikroakışkan cihazlardan biri olan sarmal biyoçip (Parsortix); kandaki hücrelerin akışını kontrol altında tutarak, tüm kandan kanser hücrelerinin yüzdesini elde edebilmektedir (72). Bu sistemin en büyük dezavantajı, kan pıhtılaşması ve hava kabarcıkları olması durumunda sistemin istenilen duyarlılıkta çalışmamasıdır (73).

Yoğunluk Gradiyentine Dayalı Zenginleştirme: CTC'leri içeren mononükleer hücrelerin, kandaki diğer hücrelerden yoğunluk farkına göre ayrılması temeline dayanır. Bu işlem için 3 yöntem mevcuttur. Bunlar; Fikol ile ayrım, OncoQuick

(Greiner BioOne, Frickenhausen, Almanya) sistemi ile ayrım ve Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norveç) ile ayrımdır (53, 74). OncoQuick sistemi ile ayrım henüz yeni bir sitem olup, 15-35 mL kan örneği ile çalışılması sistemin en büyük dezavantajıdır (74, 74). Lymphoprep çok daha az tercih edilen bir yöntemdir (76). En sık kullanılan teknik, Fikol ile yoğunluk ayrımı yapılmasıdır. Buradaki zenginleştirme, CTC'lerin yüzeye çıkma gücünün, periferik kan mononükleer hücrelere kıyasla daha az olmasına dayanır. Bu teknikte CTC'nin oldukça hızlı tespit edilebilmesine rağmen, tek dezavantajı az da olsa lökosit kontaminasyonunun görülebilmesidir. Mononükleer tabakanın da çok hassas ayrılması ve dikkatli toplanması gerekmektedir (65).

2.4.1.2. CTC Karakterizasyon Teknikleri

CTC tespiti ve karakterizasyonu hücresel düzeyde mikroskop veya akan hücre ölçer (flow sitometri-FC) ile, moleküler düzeyde ise ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) ile yapılmaktadır. Çoğu analizde CTC'ler sitokeratin pozitif, CD45'ler ise negatif hücreler olarak tanımlanmaktadır. Örneğin; zenginleştirme işleminin sonrasında, CellSearch® tekniğinde; immünofloresan olarak epitelyal belirteçler olan sitokeratin 8, 18 ve 19 ile, negatif belirteç olarak da CD45 ile CTC sayımı gerçekleştirilir (67).

RT-PCR kullanılarak da kandan CTC sayısının saptanması ve karakterizasyonu, CTC'ye özgü mRNA'ların ters transkripsiyonu ile mümkündür. Ancak, aynı zamanda normal hücrelerde de CTC'nin mRNA belirteçleri az da olsa exprese olduğundan, bu yöntem ile kesin olarak CTC sayısını ve ekspresyonunu belirlemek zordur. Bu nedenle normal hücreler ile CTC'leri ayırt edebilmek adına birden fazla mRNA belirteci (örn. CK 8 mRNA, CK18 mRNA gibi) kullanılmalıdır, bu da maliyeti artırmaktadır (77). RT-PCR'ın en önemli avantajı; mRNA'sı degrade olan apoptotik CTC'ler ile canlılığı devam eden CTC'leri saptayabilmesidir (65).

Akan hücre ölçer cihazı ile CTC karakterizasyonu, CTC eksprese eden çeşitli belirteçlere karşı antikorlar kullanılması ile gerçekleştirilir. Floresan *in situ*

hibridizasyon (FISH) tekniği ile CTC belirlemek için, spesifik DNA dizileri floresan problar ile tanımlanır ve çoklu boyama yapılır (65). Son derece heterojen bir doğaya sahip CTC'ler kanda oldukça nadir bulunduklarından dolayı kantitatif analizlerinin daha avantajlı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle akan hücre ölçer cihazı protein bazlı karakterizasyon için iyi bir alternatiftir (6).

Ancak tüm yöntemlerde CTC'nin saptanması, her mililitre kanda binlerce lökosite ve milyonlarca eritrosite karşılık birkaç tane CTC olması nedeniyle, oldukça sınırlıdır (65).

2.5. Sitokeratinler

Hücre iskeletinde yer alan proteinlerdir (43). Epitel hücre iskeletlerinin hemen hemen hepsi sitokeratin filamentlerinden oluşur. Sitokeratinler (CK) ara filamentlerden bir grup olup, hücreye şekil veren hücre iskeletinin mikrotübülleri ve mikrofilamentleri ile birlikte bulunur. Bu nedenle hücre içine lokalize olmuşlardır. Şimdiye kadar tanımlanmış 20 adet sitokeratin vardır (78).

Tümör tipine göre sıklıkla eksprese edilen sitokeratin türü de değişmektedir. Malign tümörlü hastalarda hücre döngüsü kontrolünün sağlanamaması ve döngünün sürekli gerçekleşmesinden dolayı, sitokeratinlerin yoğunluğunun da arttığı bilinmektedir (78).

CK1-CK8 arası sitokeratinler nötr ya da bazik Tip B ya da Tip II alt ailesini, CK9-CK20 arası sitokeratinler ile asidik Tip A ya da Tip 1 alt ailesini oluşturmaktadır (Tablo 2.4) (78).

Tablo 2.4. Sitokeratinler (78).

Nötr/Bazik	Asidik	Lokasyon
CK 1, 2	CK 9, 10	Çok katlı-keratinli Epitel (Epidermis)
CK 3	CK 12	Kornea
CK 4	CK 13	Çok katlı-keratinsiz Epitel
CK 5	CK 14, 15	Miyoepitel hücreler
CK 6	CK 16, 17	Çok katlı- keratinsiz skuamöz epitel
CK 7	CK 19	Tek katlı epitel, luminal salgı hücreleri
CK 8	CK 18, 20	Tek katlı epitel, luminal salgı hücreleri

Mesane kanseri için sitokeratin 8, 18, 19 ve 20 daha önce tümör belirteci olarak araştırılmıştır (43, 79). Hücre içi proteinler olduklarından dolayı idrarda saptanmaları hücre ölümünden sonra mümkün olmaktadır (43).

Sitokeratin testlerinin duyarlılıklarının özellikle düşük derece ve evredeki tümörlerde düşük olması, bu nedenle yüksek yalancı pozitiflik oranlarının olması en büyük dezavantajıdır (43).

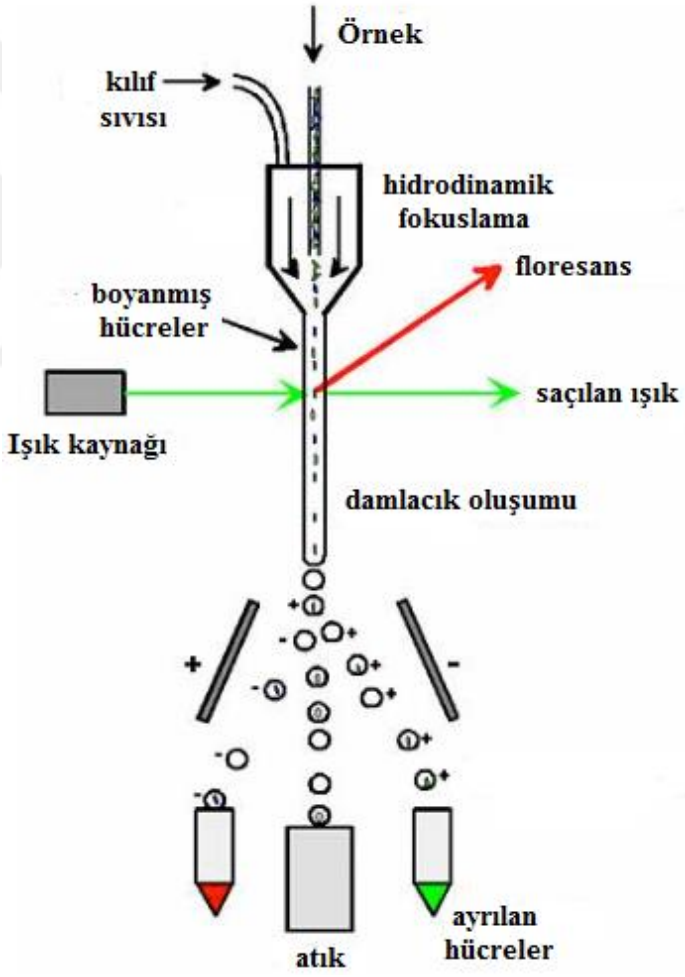
2.6. Akan Hücre Ölçer Cihazı

Deneysel ve klinik araştırmalarda genellikle saflaştırılmış hücre popülasyonu kullanılmaktadır. Akan hücre ölçer cihazı ile fenotipi bilinen hücre popülasyonlarının saflaştırılması tercih edilen bir yöntemdir (80). Klinikte akan hücre ölçer cihazının son derece güçlü bir teknoloji olduğu kanıtlanmıştır. Hematoloji ve onkoloji başta olmak üzere birçok disiplin akan hücre ölçer cihazını kullanmaktadır (6).

Günümüzde akan hücre ölçer sistemlerinin genel ismi "Floresan Aktive Hücre Ayırma (FACS)" tır (81). Hücre içi boyama veya protein ekspresyonuna bağlı olarak FACS teknolojisi ile hücrelerin izole edilmeleri mümkündür. Bu teknoloji; hücrelerin büyüklüklerine, granülaritelerine ve floresan yoğunluklarına göre ayrıştırılmalarına olanak sağlar. İstenilen hücreleri tespit etmek için ilk olarak, o hücre popülasyonuna spesifik yüzey belirteçlerini tanıyan, floresan işaretli (Floresan

izosiyanat-FITC, Fikoeritrin-PE, Rhodamine vs) monoklonal antikorlar (mAb) kullanılır. Boyanmayan hücrelerin negatif ayrımı da mümkündür (80). Sistem, floresan yoğunluğunun ölçülmesi temeline dayandığı için, işaretli hücrelerden floresanı açığa çıkarmak için lazer kullanılır (82).

Hücreleri tek tek elde etmek için gerekli olan, hücre ayrım kapasitesi ve uygun yazılımı olan bir FACS cihazıdır. Süspansiyon halindeki hücreler, tek bir hücre içeren damlalar halinde lazerden geçirilir. Floresan algılama sistemi tarafından bu hücreler, daha önceden belirlenmiş floresan parametrelerine göre algılanırlar (Şekil 2.12) (80).



Şekil 2.12. Akan hücre ölçer çalışma prensibi (83).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Mesane kanserli hastalarda kanda dolaşan tümör hücrelerinin akan hücre ölçer cihazı ile tespiti için Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sosyal ve Beşeri Bilimler Etik Kurulu'ndan 28.08.2015 karar tarihli 96 no'lu karar ile izin alınmıştır (EK-1). Çalışmaya 23.10.2015-31.03.2016 tarihleri arasında Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği'nde mesane kanseri tanısı konmuş ve mesanelerine transüretral rezeksiyon (TUR) veya radikal sistektomi (RC) uygulanan 10 hasta dahil edilmiştir. Kontrol olarak da; hiçbir kanser tanısı almayan 10 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Gönüllü deney ve kontrol grubu bireylerine çalışma ile ilgili bilgi verilerek onayları alınmıştır (EK-2).

TUR işlemi uygulanan hastalardan opere öncesi bir tüp, opereden 3-4 hafta sonrasında tekrar bir tüp kan alınmıştır. RC işlemi uygulanan hastalardan ise opere öncesi bir tüp, opereden 8-10 gün sonra tekrar bir tüp kan alınmıştır. Kontrol bireylerden yalnızca bir tüp kan alınmıştır.

Hastaların TNM evreleri ve invazivlik durumları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Hastaların TNM evreleri ve invazivlik durumları.

Hasta No	**Yaşı**	**Cinsiyeti**	**TNM evresi**	**İnvazivlik durumu**	**Operasyon Türü**
1	48	Erkek	Ta N0 M0	Invaziv değil	TUR
2	43	Kadın	Ta N0 M0	Invaziv değil	TUR
3	28	Erkek	Ta N0 M0	Invaziv değil	TUR
4	68	Erkek	Ta N0 M0	Invaziv değil	TUR
5	64	Erkek	T1 N0 M0	İnvaziv	TUR
6	80	Erkek	Ta N0 M0	Invaziv değil	TUR
7	71	Erkek	Ta N0 M0	Invaziv değil	TUR
8	74	Erkek	T1 N0 M0	İnvaziv	RC
9	78	Erkek	T2 N0 M0	İnvaziv	TUR
10	53	Erkek	Tis N2 M0	İnvaziv	RC

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan cam ve plastik sarflar Tablo 3.2'de, cihazlar Tablo 3.3'te, kimyasallar Tablo 3.4'te, antikorlar Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmamızda kullanılan cam ve plastik sarf malzemelerin listesi.

Adı	**Üretici Firma**
Falkon tüpleri (15 mL, 50 mL)	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Serolojik Cam Pipetler (10 mL, 25 mL)	Corning, NewYork, ABD
Pastör Pipet (3 mL)	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Otomatik pipet uçları	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Lamel	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Tartım Kapları	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Spatüller	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Akan hücre ölçer tüpü	BD Biosciences, San Jose, ABD
EDTA'lı kan tüpü	LP ITALIANA SPA, Milano, İtalya

Tablo 3.3. Çalışmamızda kullanılan cihazların ve aletlerin listesi.

Adı	**Markası ve Modeli**
Soğutmalı Santrifüj	Hettich/Universal 320 R
Otomatik pipetler (10-100-200-1000 µL'lik)	Eppendorf, ABT
Şarjlı otomatik pipet pompası	Eppendorf/Easypet 3
Işık Mikroskobu	Nikon/Eclipse E100
Hassas terazi	MRC/ASB-220-C2
Vorteks	MRC/ SI-100
MACs başlangıç kiti (LD kolon, mıknatıs ve standı)	Miltenyi Biotec
+4 °C Buzdolabı	Klimasan/ S 900 SC DD
Akan Hücre Ölçer Cihazı	BD FACSAria™ III Cell Sorter
Kronometre	ISOLAB
Distile Su Cihazı	ELGA/LA621
Thoma Lamı	ISOLAB

Tablo 3.4. Çalışmamızda kullanılan kimyasalların listesi.

Adı	**Üretici Firma**
PBS (Phosphate buffered saline)	Gibco, Life Tech, ABD
Fikol (Biocoll Ayırma Solusyonu)	Merck Millipore, Darmstadt, Almanya
EDTA (Etilendiamin Tetraasetik Asit)	Genaxxon, Ulm, Almanya
BSA (Sığır Serum Albumini)	Biowest, Nuaillé, Fransa
CellWASH solüsyonu	BD Biosciences, San Jose, ABD
Cytofix Fiksasyon Tamponu	BD Biosciences, San Jose, ABD
Akan Hücre Ölçer Boyama Tamponu (fetal sığır serumu (FBS) içeren)	BD Biosciences, San Jose, ABD
Perm/Wash Tampon Çözeltisi	BD Biosciences, San Jose, ABD
Phosflow Perm III Tampon Çözeltisi	BD Biosciences, San Jose, ABD

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan antikorların listesi.

Adı	**Konjuge Florokromu**	**İzotipi**	**Üretici Firma**
Mouse Anti-Human CD45 (Monoklonal Antikor)	APC-H7 (Allophycocyanin-Hilite-7)	APC-H7 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
Anti-EpCAM (Monoklonal Antikor)	PE (Phycoerythrin)	PE Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
Mouse Anti-Human Cytokeratin 14, 15, 16 and 19 (Poliklonal Antikor)	Alexa Fluor 647	Alexa Fluor 647 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
Anti-Cytokeratin (CK 7, 8) (Poliklonal Antikor)	FITC (Fluorescein Isothiocyanate)	FITC Mouse IgG2a Kappa Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, ABD
CD45 Mikro-boncuklar			Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Almanya

3.1.2. Çalışmada Hazırlanan Solüsyonlar

Çalışmamızda kullanılan MACs tampon çözeltisi şunları içerir; PBS (pH 7.2), % 0.5'lik BSA ve 2 mM Na_2EDTA. Miktarları hücre sayısına göre hesaplanarak hazırlanmıştır (Tablo 3.6). Tampon çözelti çalışmanın yapılacağı gün hazırlanır ve 2-8 °C'de muhafaza edilmiştir.

Konsantre olarak bulunan Perm/Wash tampon çözeltisi 1X olacak şekilde dilüe edilmiştir.

3.1.3. Bir Çalışma İçin Kullanılan Kimyasalların Miktarları

Bir çalışma için kullanılan kimyasalların miktarları tablo 3.6' da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Bir çalışma için kullanılan kimyasalların miktarları.

Adı	**Miktarı**
PBS	(Hücre sayısı [10^7] x 2080 µL) + 4500 µL
Fikol	22.5 mL
EDTA	(PBS miktarı x 0.015)/20 g
BSA	(PBS miktarı x 0.1)/20 g
CellWASH solüsyonu	10^6 hücreye karşılık 100 µL
Cytofix Fiksasyon Tamponu	1 mL
Akan Hücre Ölçer Boyama Tamponu	3.1 mL
Perm/Wash Tampon Çözeltisi (1X)	8 mL
Phosflow Perm III Tampon Çözeltisi	100 µL
CD45 Mikro-boncuklar	10^7 hücreye karşılık 20 µL
Mouse Anti-Human CD45	10^6 hücreye karşılık 5 µL
APC-H7 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	10^6 hücreye karşılık 5 µL
Anti-EpCAM	10^6 hücreye karşılık 20 µL
PE Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	10^6 hücreye karşılık 20 µL
Mouse Anti-Human Cytokeratin 14, 15, 16 and19	10^6 hücreye karşılık 5 µL
Alexa Fluor 647 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	10^6 hücreye karşılık 5 µL
Anti-Cytokeratin (CK 7, 8)	10^6 hücreye karşılık 20 µL
FITC Mouse IgG2a Kappa Isotype Control	10^6 hücreye karşılık 20 µL

3.2. Yöntem

Dolaşımdaki tümör hücrelerinin tespiti için, epitelyal kökenli hücreler ile hematopoetik hücrelerin arasındaki fenotip farklılıklarından yararlanılır. Bunlardan biri olan antijen ekspresyonlarının farklı olması, çalışmamızda kullanılmıştır. Dolaşımdaki tümör hücreleri epitelyal antijenleri eksprese ederler. En sık kullanılanlar; epitelyal adezyon molekülü (EpCAM) ve sitokeratin (CK) 7, 8, 18, 19 ve 20'dir.

Dolaşımdaki tümör hücreleri kanda çok nadir bulundukları için öncesinde zenginleştirme işlemi yapılması gerekir. Çalışmamızda zenginleştirme işlemi immünomanyetik olarak negatif ayrım (deplesyon) yapılmış, tespit edilen hücreler özel antikorlar ile boyanıp, BD FACSAria™ III Cell Sorter hücre akan ölçer cihazında okunmuştur.

3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Mesane kanserli hastalardan ve kontrol bireylerden alınan 7.5 mL kanlar EDTA içeren tüplere alınıp çalışılmıştır.

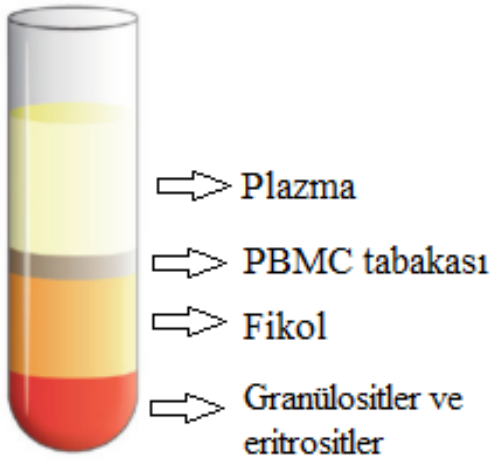
3.2.2. Zenginleştirme Basamağı

Çalışmamızda zenginleştirme basamağı olarak Fikol ile gradiyente bağlı ayrım ve immünomanyetik olarak CD45 deplesyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Fikol Ayrımı

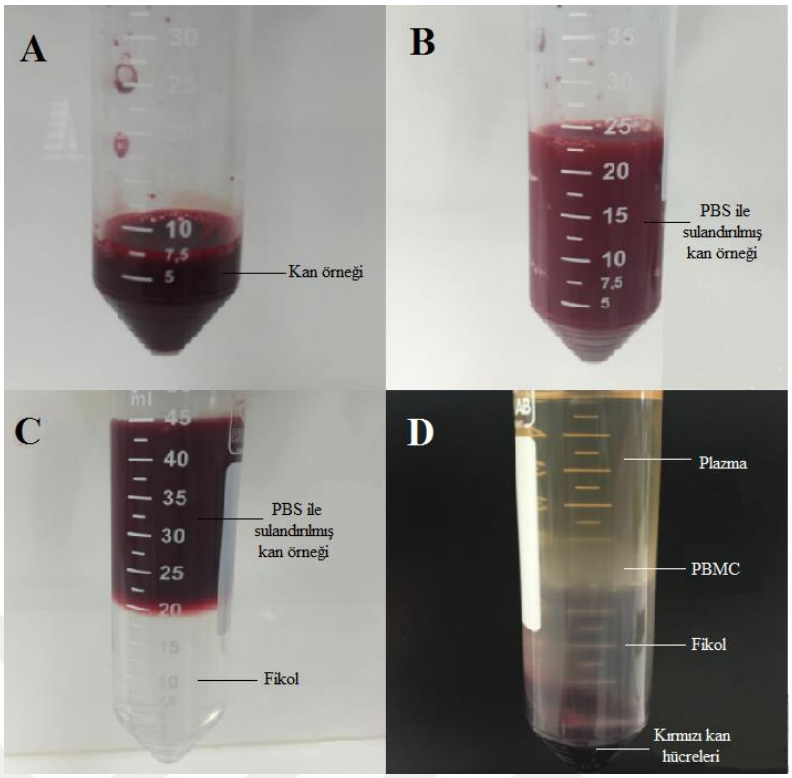
Çalışmamızdaki ilk basamak olan yoğunluk gradiyentine dayalı zenginleştirme işlemi; mononükleer hücrelerin Fikol gradiyent santrifüj ile izole edilmesiyle gerçekleştirilir. 50 mL falkona alınan periferik kan örneğine (7.5 mL), 1:1 oranında PBS eklenmiştir. Başka bir 50 mL falkona eklenen 1:1 oranında Fikol

üzerine, PBS içeren süspansiyon yavaş yavaş eklenmiştir. 300 g'de 20°C'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süspansiyon tabakalara ayrılır (Şekil 3.1) (84).



Şekil 3.1. Fikol ile gradiyente dayalı zenginleştirme işlemi (74).

Lenfositler, monositler ve trombositlerden oluşan PBMC tabakası, CTC'leri de içerdiği için, pastör pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde toplanmıştır ve yeni bir falkona alınmıştır (Şekil 3.2) (84).



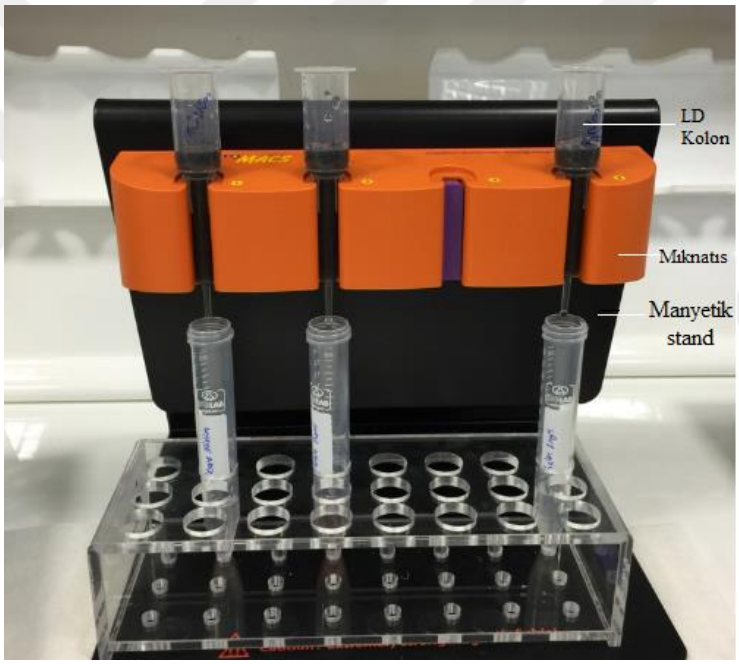
Şekil 3.2. Çalışmamızda gerçekleştirilen Fikol ile yoğunluk ayrımı. A. 7.5 mL kan örneği. B. PBS ile sulandırılmış kan örneği. C. Fikol üzerine eklenen kan örneği. D. Santrifüj sonrası kan örneğinin Fikol gradiyent ayrımı (84).

Toplanan hücrelerin üzerine 10 mL PBS eklenerek, 300 g'de 20°C'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. 10 mL PBS eklenerek, süspansiyon içerisinden 10 µL çekilerek Thoma lamına yüklenmiştir ve hücreler mikroskopta sayılmıştır (84). Thoma lamında sayılan hücreler şu formül ile hesaplanır: toplam hücre sayısı = 16 büyük karedeki hücre sayısı x 10 000 x dilüsyon faktörü x toplam hacim (85).

3.2.2.2. CD45 Deplesyonu

Bu basamakta manyetik ayrım yapan MACs sistemi yardımıyla CD45 deplesyonu gerçekleştirilmiştir. Hücreler sayıldıktan sonra süspansiyon 300 g 'de 20°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine, 10^7 hücreye karşılık aynı gün hazırlanmış olan 80 µL MACs tampon çözeltisi ve 20 µL CD45 mikro-boncuk eklenerek, örnek 4-8°C'de 15 dakika boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası hücreleri yıkamak için, 10^7 hücreye karşılık 1 mL olacak şekilde MACs tampon çözeltisi eklenmiştir. 300 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine $1.25x10^8$ hücreye karşılık 500 µL MACs tampon çözeltisi eklenmiştir. Mıknatıs standa yerleştirilmiştir. Deplesyon işlemi için kullanılan LD kolonlar manyetik standa yerleştirilmiştir. LD kolon 2 mL MACs tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Yeni bir falkon tüpü, LD kolon altına yerleştirilerek örnek akıtılmıştır. Kolonda tutunmayan hücreler tamamen aktığında, LD kolon 1 mL MACs tampon çözeltisi ile 2 kez yıkanmıştır. Elde edilen bu süspansiyon CTC'leri içeren mononükleer hücrelerden oluşur, çünkü LD kolonda tutunanlar CD45 mikro-boncuklara bağlanan lökositlerdir (Şekil 3.3). Süspansiyondan 10 µL alınarak Thoma lamında hücre sayma işlemi gerçekleştirilmiştir (84).



Şekil 3.3. MACs sistemi ile manyetik ayrım.

3.2.3. Saptama Basamağı

3.2.3.1. Antikorlar ile Boyama

Elde edilen süspansiyon, akan hücre ölçer cihazında kapılama işleminin doğru bir şekilde yapılabilmesi için 'kontrol tüpü', 'izotip kontrol tüpü' ve 'deney tüpü' olarak akan hücre ölçer tüplerine alınmıştır (84).

Kontrol Tüpü Örneğinin Hazırlanması: Kontrol tüpüne ilk olarak CellWASH solüsyonu eklenmiştir. 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine Cellfix eklenerek, tüp 4°C'de gece boyu (16 saat) karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine akan hücre ölçer boyama tamponu eklenerek vortekslenmiştir. Tüp, akan hücre ölçer cihazında okunana kadar 4°C'de inkübasyona bırakılmıştır (84).

Deney Tüpü Örneğinin Hazırlanması: Deney tüpü 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine CellWASH solüsyonu eklenmiştir. Hücre yüzey antijenlerinden EpCAM'i saptayabilmek için, fluorokrom kaplı antikoru Anti-EpCAM-PE; CD45'i saptayabilmek için, fluorokrom kaplı antikoru Anti-Human CD45-APC-H7 eklenmiştir ve 4°C'de karanlıkta 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası akan hücre ölçer boyama tamponu eklenmiştir. 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine akan hücre ölçer boyama tamponu eklenerek 4-8°C'de karanlıkta gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası deney tüpü, 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Perm/Wash tampon çözeltisi 1X olacak şekilde dilüe edilmiştir. Pellet üzerine Perm/Wash tampon çözeltisinden eklenerek, 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Pellet üzerine Phosflow Perm III tampon çözeltisi eklenerek, 30 dakika boyunca 4-8°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, Perm/Wash tampon çözeltisi eklenmiştir. Akan hücre ölçer boyama tamponu eklenmiştir. Hücre içi antijenlerden olan sitokeratinleri saptayabilmek için fluorokrom kaplı antikorları eklenmiştir. CK19'u saptayabilmek için Anti-Human Cytokeratin 14, 15, 16, 19-Alexa 647, CK 7,8'i saptayabilmek için Anti-Cytokeratin-FITC eklenmiştir. 4-8°C'de karanlıkta 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası Perm/Wash tampon çözeltisi eklenerek 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine akan hücre ölçer boyama tamponu eklenerek vortekslenmiştir (84).

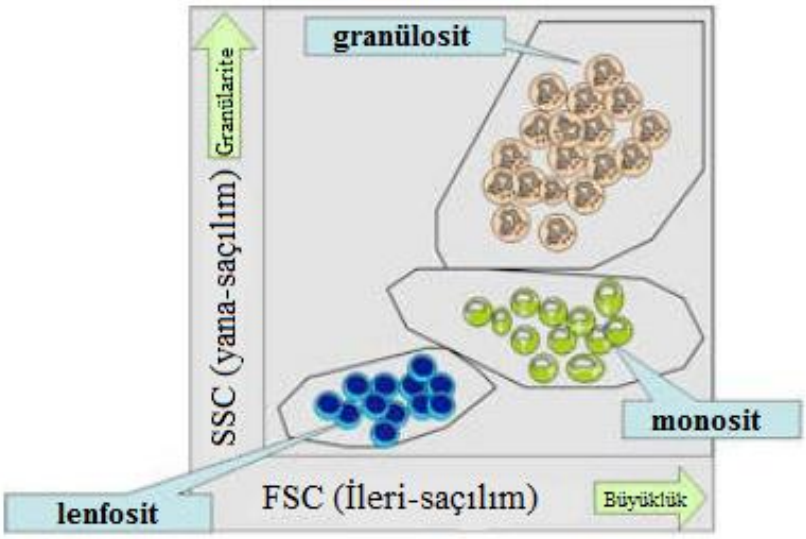
İzotip Kontrol Tüpü Örneğinin Hazırlanması: İzotip kontrol tüpü 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine CellWASH solüsyonu eklenmiştir. İzotip kontrol antikorları APC-H7 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control ve PE Mouse IgG1 Kappa Isotype Control eklenerek, 4°C'de karanlıkta 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası akan hücre ölçer boyama tamponu eklenmiştir. 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine akan hücre ölçer boyama tamponu eklenerek 4-8°C'de karanlıkta gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası izotip kontrol tüpü, 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Perm/Wash tampon çözeltisi 1X olacak şekilde dilüe edilmiştir. Pellet üzerine Perm/Wash tampon çözeltisinden eklenerek, 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Pellet üzerine Phosflow Perm III tampon çözeltisi eklenerek, 30 dakika boyunca 4-8°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, Perm/Wash tampon çözeltisi eklenmiştir. Akan hücre ölçer boyama tamponu eklenmiştir. Hücre içi antijenlerden olan sitokeratinleri saptayabilmek için fluorokrom kaplı antikorları eklenmiştir. Alexa Fluor 647 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control ve FITC Mouse IgG2a Kappa Isotype Control eklenerek, 4-8°C'de karanlıkta 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası Perm/Wash tampon çözeltisi eklenerek 350 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine akan hücre ölçer boyama tamponu eklenerek vortekslenmiştir (84).

Akan hücre ölçer cihazında sırasıyla kontrol tüpü, izotip kontrol tüpü ve deney tüpü okunarak analiz edilmiştir.

3.2.4. Örneklerin Akan Hücre Ölçer Cihazında Analiz Edilmesi

Akan hücre ölçer cihazında, hücrelerin büyüklüklerine göre ayrılmalarını sağlayan sistem "İleri Saçılım (Forward Scatter-FSC)", granülaritelerine göre ayrılmalarını sağlayan sistem ise "Yana Saçılım (Side Scatter-SSC)" olarak adlandırılmaktadır (86). FSC/SSC histogramında, hücre süspansiyonu içindeki farklı

hücre popülasyonları büyüklüklerine ve granülaritelerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Örneğin; periferik kanda lenfositler, monositler ve granülositler farklı büyüklüklere ve granülariteye sahip oldukları için FSC/SSC histogramında farklı bölgelerde dağılırlar (Şekil 3.4) (82). Lazerden geçen hücreler elektrostatik bir bölüme yönlendirilir ve yüklerine göre ayrılıp uygun tüplere toplanırlar (80).



Şekil 3.4. Lökosit popülasyonlarının FSC/SSC histogramında gösterimi (87).

Hücre popülasyonları bu şekilde büyüklük ve granülaritelerine göre ayrıldıktan sonra, içlerinden bilgi edinilmek istenilen hücre ve/veya hücre gruplarının seçilmesi işlemine "kapılama (gating)" adı verilmektedir. Kapılama yapıldıktan sonra, sistem verilen komutlara uygun olarak sadece kapılanan alandaki hücreler hakkında bilgi verir (82).

Boyamanın ve ayrımın başarılı bir şekilde gerçekleşmesi uygun monoklonal antikorların seçilmesine bağlıdır, FACS kullanımı için özel ekipman ve eğitimli personel gerektirmektedir (80).

CTC araştırmalarında genel olarak akan hücre ölçer cihazı, CTC'nin sayımı için kullanılmış olsa da, bu teknik aynı zamanda çoklu işaretleyiciler ile CTC'nin moleküler karakterizasyonun yapılabilmesi için olanak sağlar. Karakterize edilen CTC'lerin kolayca tek tek elde edilmesi ve toplanması FACS teknolojisi ile

mümkündür (6). Hücreler cihaz tarafından emilir ve tek tek lazer demetinden geçirilir. Saçılan ışık ve floresan emisyonu detektörler tarafından değerlendirilir (88).

CTC tespitinde akan hücre ölçer cihazının kullanımının avantajları; sadece belirtecin ekspresyonunun olup olmadığını değil, ekspresyonun düzeyini de inceleme olanağı sunması, çoklu belirteçlerin kullanımına uygun olması, örneğin ayrılmasının mümkün olması ve kolayca toplanmasını sağlamasıdır. Dezavantajı ise testin duyarlılığını artırmak için ön zenginleştirme işlemleri gerektirmesidir (6).

Çalışmamızda kullanılan BD FACSAria™ III Cell Sorter cihazı şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. BD FACSAria™ III Cell Sorter cihazı.

Çalışmamızda kapılama işlemi sırasıyla Anti-CK 19 (Anti-CK 14, 15, 16, 19), Anti-CK (CK 7,8), Anti-EpCAM ve Anti-CD 45 olacak şekilde yapılmıştır. CK 19 pozitif, anti-CK pozitif, EpCAM pozitif ve CD 45 negatif olan hücreler CTC olarak kabul edilmiştir.

3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada; yaş ve CTC sayılarının dağılımı Shapiro-wilk testi ile incelenmiştir. Yaş, normal dağılım gösterdiği için ortalama ± standart sapma ile; CTC sayıları ortanca (min-maks: minimum-maksimum) ile ve cinsiyet gibi kategorik değişkenler sayı (%) ile ifade edilmiştir.

Hasta grubunun operasyon öncesi ve sonrası CTC sayıları ile kontrol grubunun CTC sayıları Mann-Whitney U testi ile; hasta grubunun operasyona göre CTC sayılarının farklılığı Wilcoxon testi ile değerlendirilmiştir. Hasta grubunda invazivlik durumuna göre CTC sayıları grup içinde Wilcoxon testi ile; gruplar arasında Mann-Whiney U testi ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda test istatistiği ve p değeri verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ kabul edilmiştir.

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 10 mesane kanserli hasta ile 10 kontrolün yaş ortalaması sırasıyla 60.70±17.07 yıl ve 56.90±16.03 yıl olarak hesaplanmıştır. Hasta ve kontrol grubunda birer hastanın kadın olduğu belirlenmiştir. 4 (% 40.0) hastada invazivlik söz konusu olduğu; 2 (% 20) hastanın RC operasyonu geçirdiği belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Demografik özellikler.

	Hasta grubu	**Kontrol grubu**	**Genel**
Yaş	60.70±17.07[1]	56.90±16.03	58.80±16.23
Cinsiyet			
Kadın	1 (10.0)[2]	1 (10.0)	2 (10.0)
Erkek	9 (90.0)	9 (90.0)	18 (90.0)
İnvazivlik durumu	4 (40.0)	-	4 (40.0)
Operasyon türü			
RC	2 (20.0)	-	2 (20.0)
TUR	8 (80.0)	-	8 (80.0)

[1] ortalama ± standart sapma

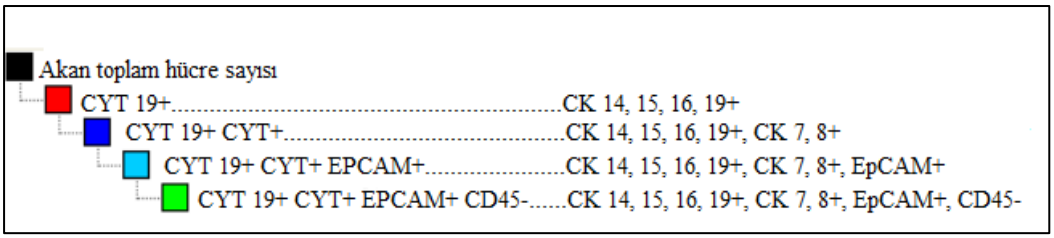
[2] sayı (%)

Çalışmamıza dahil edilen hastaların opere öncesi ve opere sonrası CTC sayıları Tablo 4.2'deki gibidir.

Tablo 4.2. Hastaların CTC sayıları.

Hasta No	Operasyon Türü	Opere öncesi CTC sayısı	Opere sonrası CTC sayısı
1	TUR	13	0
2	TUR	8	-
3	TUR	5	-
4	TUR	5	0
5	TUR	21	-
6	TUR	6	5
7	TUR	15	-
8	RC	6	2
9	TUR	6	-
10	RC	4	0

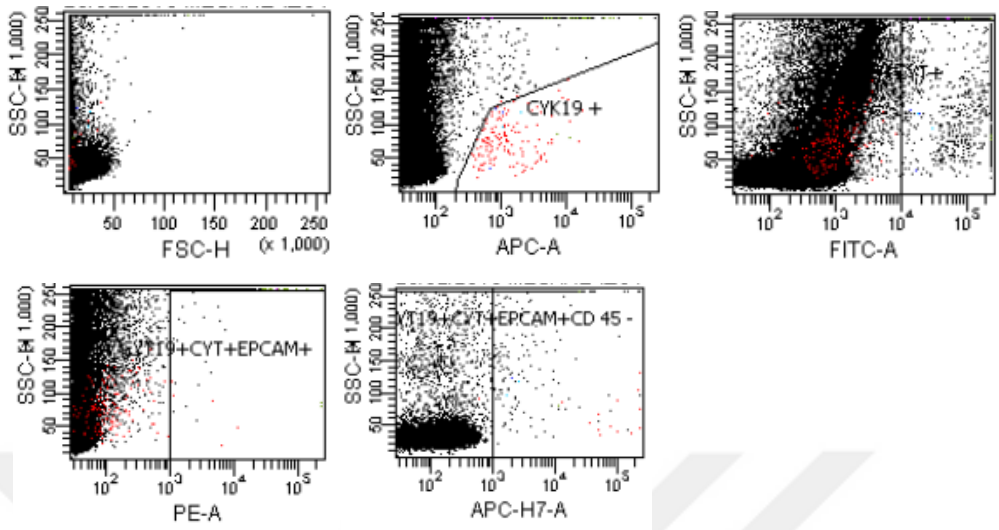
Akan hücre ölçer verilerindeki ifadelerde CYT 19+'nın karşılığı CK 14, 15, 16, 19+; CYT 19+ CYT+'nın karşılığı CK 14, 15, 16, 19+ ve CK 7, 8+; CYT 19+ CYT+ EPCAM+'nın karşılığı CK 14, 15, 16, 19+, CK 7, 8+ ve EpCAM+; CYT 19+ CYT+ EPCAM+ CD45-'nin karşılığı CK 14, 15, 16, 19+, CK 7, 8+, EpCAM+ ve CD45-'dir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Akan hücre ölçer verilerindeki ifadeler.

Çalışmamızda ilk olarak akan hücre ölçer cihazında, hücrelerde özgün olmayan bağlanmalardan kaynaklı zemin boyanmasının tespiti için izotip kontrol tüpleri analiz edilmiştir. Bu tüplerde kullanılan reaktifler, incelenecek antikorların aynı Ig alt tipine sahip olan antikorlardır (89). Çalışamızda kullanılanlar; Alexa Fluor 647 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control, FITC Mouse IgG2a Kappa Isotype Control,

PE Mouse IgG1 Kappa Isotype Control, APC-H7 Mouse IgG1 Kappa Isotype Control'dür (Şekil 4.2).



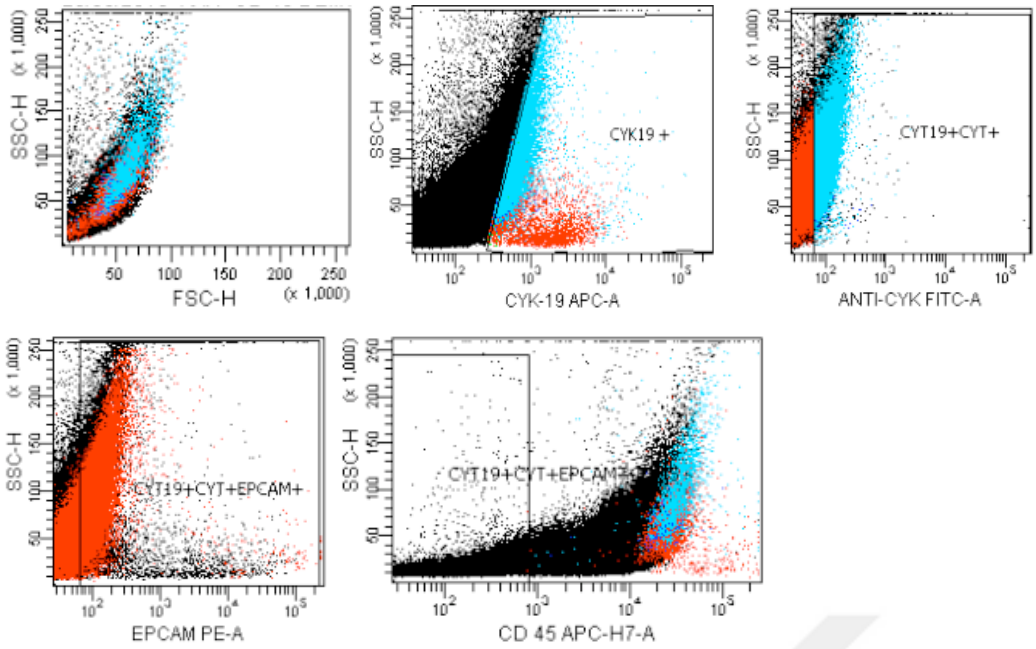
Tube: IZOTIP

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	279,571	####	100.0
CYK19 +	156	0.1	0.1
CYT19+CYT+	7	4.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	4	57.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.2. İzotip tüpü akan hücre ölçer verisi.

Çalışmamıza dahil edilen 10 hastanın opere öncesi ve opere sonrası CTC sayılarına ilişkin akan hücre ölçer verileri Şekil 4.3-Şekil 4.17 arasında verilmiştir.

Hasta 1'in TNM evresi Ta N0 M0 olup tümör invaziv değildir. Bu hastaya TUR uygulanmıştır. Opere öncesi akan hücre ölçer verisi ve grafikleri Şekil 4.3'te gösterilmiş olup CTC sayısı 13'tür. Opere sonrası akan hücre verisi Şekil 4.4'te gösterilmiş olup CTC sayısı 0'dır. Grafik görüntüleri tüm hastalar için benzer şekilde olup, örnek grafik Şekil 4.3'te verilmiştir.



Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	5,364,302	####	100.0
CYK19 +	46,244	0.9	0.9
CYT19+CYT+	17,720	38.3	0.3
CYT19+CYT+EPCAM+	15,639	88.3	0.3
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	13	0.1	0.0

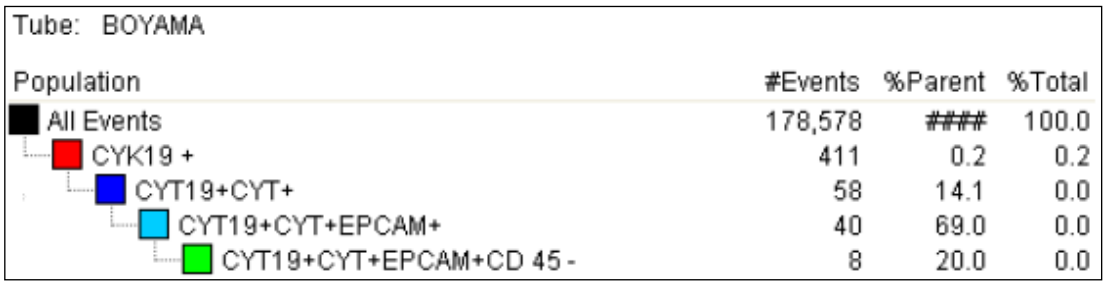
Şekil 4.3. Hasta 1'in opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	647,979	####	100.0
CYK19 +	778	0.1	0.1
CYT19+CYT+	50	6.4	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	44	88.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.4. Hasta 1'in opere sonrası deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Hasta 2'nin TNM evresi Ta N0 M0 olup tümör invaziv değildir. Hastanın tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu bulunmakta olup, lökosit esteraz aktivitesi yüksek bulunmuştur. İdrarında Klebsiella oxytoca bakterisi üremiştir. Bu hastaya TUR uygulanmıştır. Opere öncesi akan hücre ölçer verisi Şekil 4.5'te gösterilmiş olup CTC sayısı 8'dir. Opere sonrası hastadan kan alınamamış, bundan dolayı opere sonrası verileri sunulamamıştır.

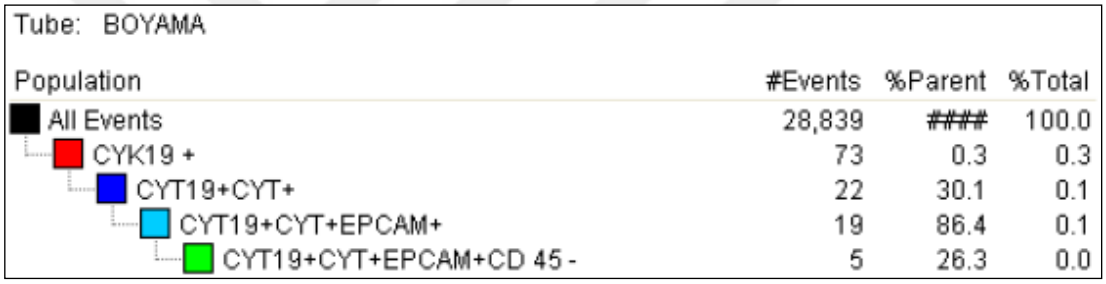


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	178,578	####	100.0
CYK19 +	411	0.2	0.2
CYT19+CYT+	58	14.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	40	69.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	8	20.0	0.0

Şekil 4.5. Hasta 2'nin opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Hasta 3'ün TNM evresi Ta N0 M0 olup tümör invaziv değildir. Bu hastaya TUR uygulanmıştır. Opere öncesi akan hücre ölçer verisi Şekil 4.6'da gösterilmiş olup CTC sayısı 5'tir. Opere sonrası hastadan kan alınamamış, bundan dolayı opere sonrası verileri sunulamamıştır.

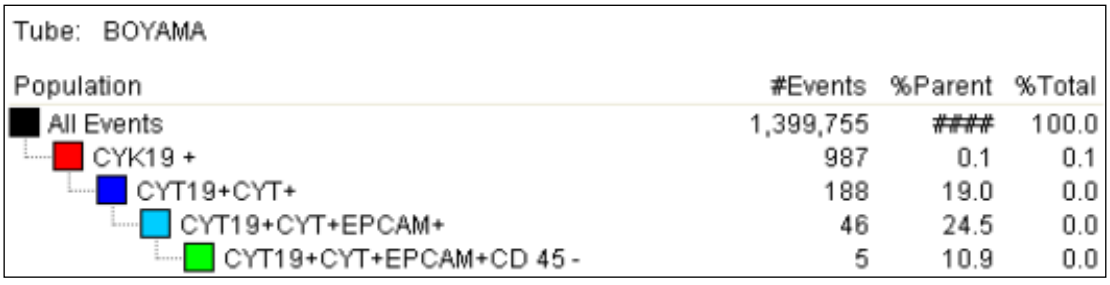


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	28,839	####	100.0
CYK19 +	73	0.3	0.3
CYT19+CYT+	22	30.1	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+	19	86.4	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	5	26.3	0.0

Şekil 4.6. Hasta 3'ün opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

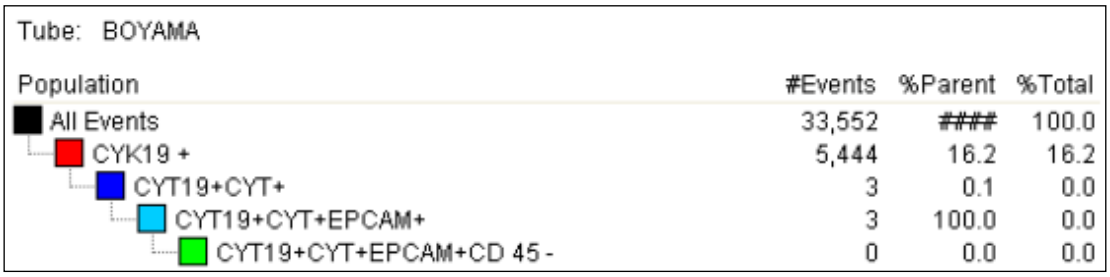
Hasta 4'ün TNM evresi Ta N0 M0 olup tümör invaziv değildir. Hasta sigara kullanmaktadır. İdrar yapma zorluğu şikayeti ile kliniğe başvurmuş olup, idrarda hematüri saptanmıştır. Bu hastaya TUR uygulanmıştır. Opere öncesi akan hücre ölçer verisi Şekil 4.7'de gösterilmiş olup CTC sayısı 5'tir. Opere sonrası akan hücre verisi Şekil 4.8'de gösterilmiş olup CTC sayısı 0'dır.



Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,399,755	####	100.0
CYK19 +	987	0.1	0.1
CYT19+CYT+	188	19.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	46	24.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	5	10.9	0.0

Şekil 4.7. Hasta 4'ün opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

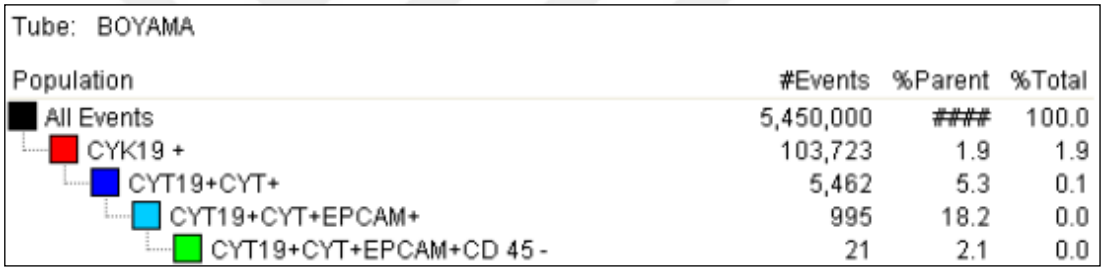


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	33,552	####	100.0
CYK19 +	5,444	16.2	16.2
CYT19+CYT+	3	0.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	3	100.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.8. Hasta 4'ün opere sonrası deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Hasta 5'in TNM evresi T1 N0 M0 olup tümör invazivdir. Hastada idrar yolu enfeksiyonu saptanmış olup, idrarda lökosit esteraz aktivitesi yüksek bulunmuştur. Bu hastaya TUR uygulanmıştır. Opere öncesi akan hücre ölçer verisi Şekil 4.9'da gösterilmiş olup CTC sayısı 21'dir. Opere sonrası hastadan kan alınamamış, bundan dolayı opere sonrası verileri sunulamamıştır.

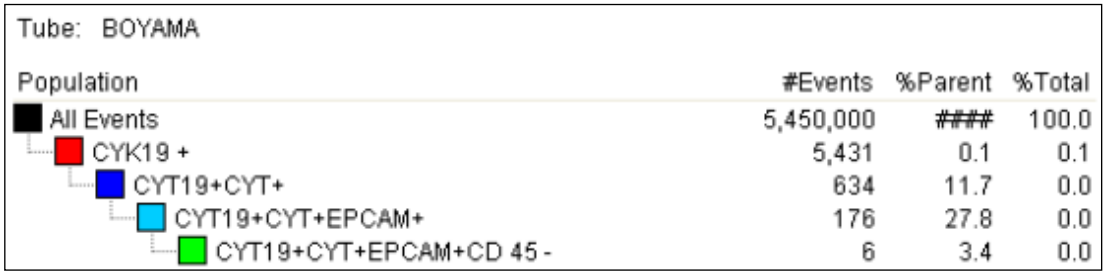


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	5,450,000	####	100.0
CYK19 +	103,723	1.9	1.9
CYT19+CYT+	5,462	5.3	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+	995	18.2	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	21	2.1	0.0

Şekil 4.9. Hasta 5'in opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

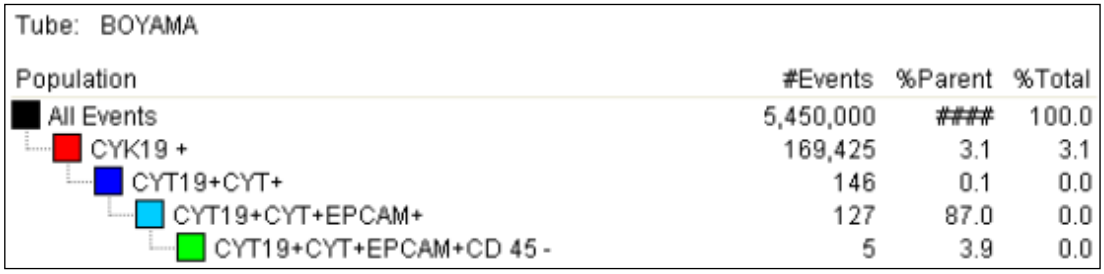
Hasta 6'nın TNM evresi Ta N0 M0 olup tümör invaziv değildir. Hastaya 7 ay önce de TUR uygulanmıştır, bu aşamada TUR tekrarlanmıştır. Opere öncesi akan hücre ölçer verisi Şekil 4.7'de gösterilmiş olup CTC sayısı 6'dır. Opere sonrası akan hücre verisi Şekil 4.8'de gösterilmiş olup CTC sayısı 5'tir.



Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	5,450,000	####	100.0
CYK19 +	5,431	0.1	0.1
CYT19+CYT+	634	11.7	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	176	27.8	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	6	3.4	0.0

Şekil 4.10. Hasta 6'nın opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

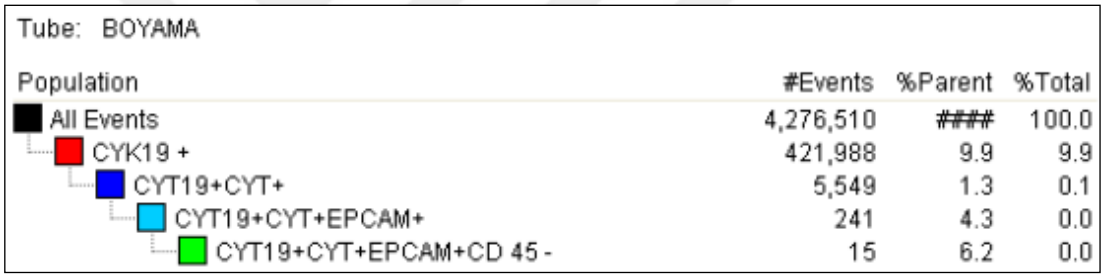


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	5,450,000	####	100.0
CYK19 +	169,425	3.1	3.1
CYT19+CYT+	146	0.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	127	87.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	5	3.9	0.0

Şekil 4.11. Hasta 6' nın opere sonrası deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Hasta 7'nin TNM evresi Ta N0 M0 olup tümör invaziv değildir. Hasta sigara kullanmayı 1997 yılında bırakmıştır. İdrarda hematüri saptanmıştır. Bu hastaya TUR uygulanmıştır. Opere öncesi akan hücre ölçer verisi Şekil 4.12'de gösterilmiş olup CTC sayısı 15'tir. Opere sonrası hastadan kan alınamamış, bundan dolayı opere sonrası verileri sunulamamıştır.

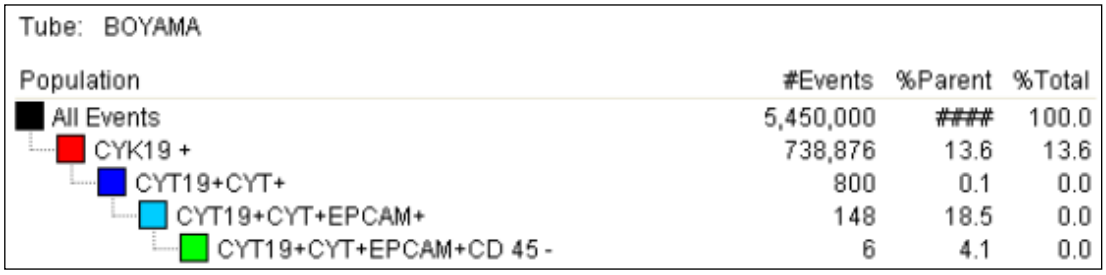


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	4,276,510	####	100.0
CYK19 +	421,988	9.9	9.9
CYT19+CYT+	5,549	1.3	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+	241	4.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	15	6.2	0.0

Şekil 4.12. Hasta 7'nin opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Hasta 8'in TNM evresi T1 N0 M0 olup tümör invazivdir. Bu hastaya RC uygulanmıştır. Opere öncesi akan hücre ölçer verisi Şekil 4.13'de gösterilmiş olup CTC sayısı 6'dır. Opere sonrası akan hücre verisi Şekil 4.14'te gösterilmiş olup CTC sayısı 2'dir.



Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	5,450,000	####	100.0
CYK19 +	738,876	13.6	13.6
CYT19+CYT+	800	0.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	148	18.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	6	4.1	0.0

Şekil 4.13. Hasta 8'in opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	2,786,198	####	100.0
CYK19 +	8,085	0.3	0.3
CYT19+CYT+	46	0.6	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	17	37.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	2	11.8	0.0

Şekil 4.14. Hasta 8' in opere sonrası deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Hasta 9'un TNM evresi T2 N0 M0 olup tümör muskularis propriayı invaze etmektedir. Bu hastaya TUR uygulanmıştır. Opere öncesi akan hücre ölçer verisi Şekil 4.15'te gösterilmiş olup CTC sayısı 6'dır. Opere sonrası hastadan kan alınamamış, bundan dolayı opere sonrası verileri sunulamamıştır.

Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	640,189	####	100.0
CYK19 +	62,127	9.7	9.7
CYT19+CYT+	75	0.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	27	36.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	6	22.2	0.0

Şekil 4.15. Hasta 9'un opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Hasta 10'un TNM evresi Tis N2 M0 olup tümör invazivdir. Bu hastaya RC uygulanmıştır. Opere öncesi akan hücre ölçer verisi Şekil 4.16'da gösterilmiş olup CTC sayısı 4'tür. Opere sonrası akan hücre verisi Şekil 4.17'de gösterilmiş olup CTC sayısı 0'dır.

Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	520,835	####	100.0
CYK19 +	84,181	16.2	16.2
CYT19+CYT+	33	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	9	27.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	4	44.4	0.0

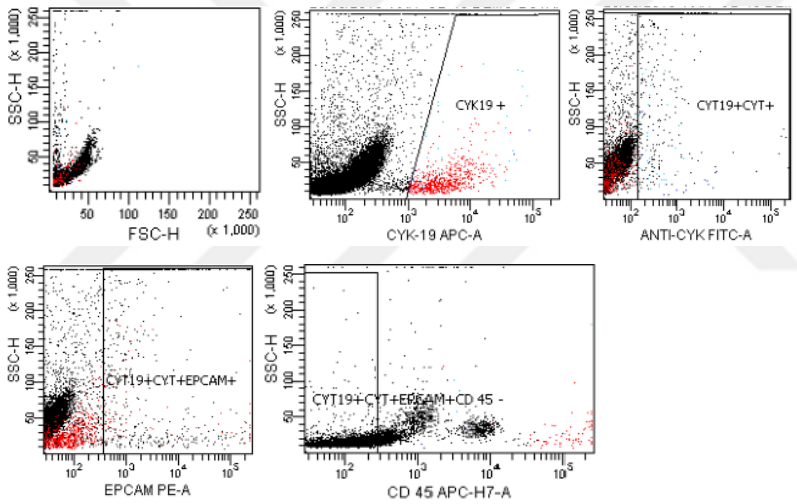
Şekil 4.16. Hasta 10'un opere öncesi deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,040,990	####	100.0
CYK19 +	3,517	0.3	0.3
CYT19+CYT+	110	3.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	2	1.8	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.17. Hasta 10' un opere sonrası deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Çalışmamıza dahil edilen 10 kontrol bireyinin CTC sayılarına ilişkin akan hücre ölçer verileri Şekil 4.18-Şekil 4.27 arasında verilmiştir. Hiçbir bireyde CTC saptanmamıştır. Grafikler tüm bireylerde benzer şekilde olup, örnek grafik Şekil 4.18'de verilmiştir.



Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	62,815	####	100.0
CYK19 +	728	1.2	1.2
CYT19+CYT+	47	6.5	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+	35	74.5	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

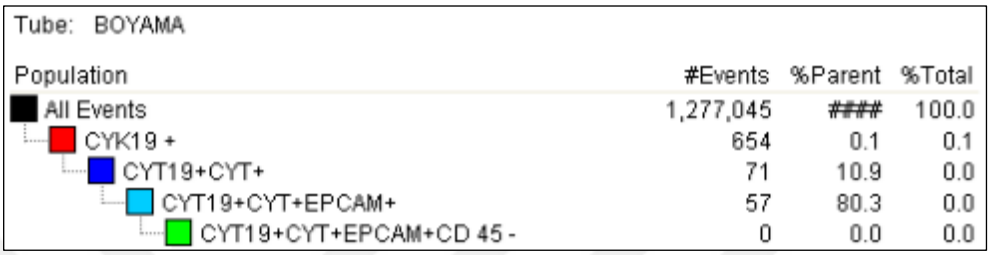
Şekil 4.18. Kontrol 1'in deney tüpü akan hücre ölçer verisi.



Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	197,459	####	100.0
CYK19 +	288	0.1	0.1
CYT19+CYT+	1	0.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

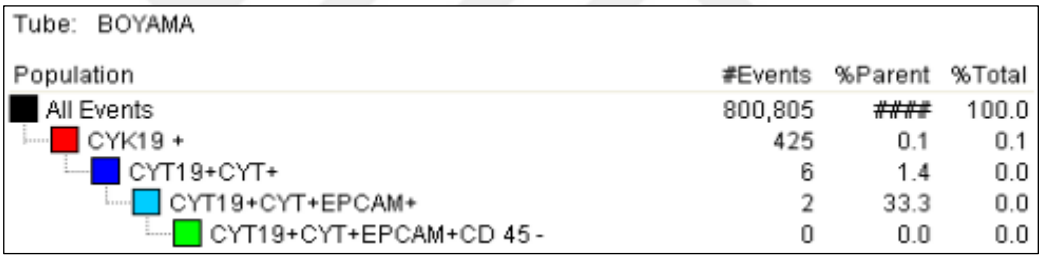
Şekil 4.19. Kontrol 2'nin deney tüpü akan hücre ölçer verisi.



Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,277,045	####	100.0
CYK19 +	654	0.1	0.1
CYT19+CYT+	71	10.9	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	57	80.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

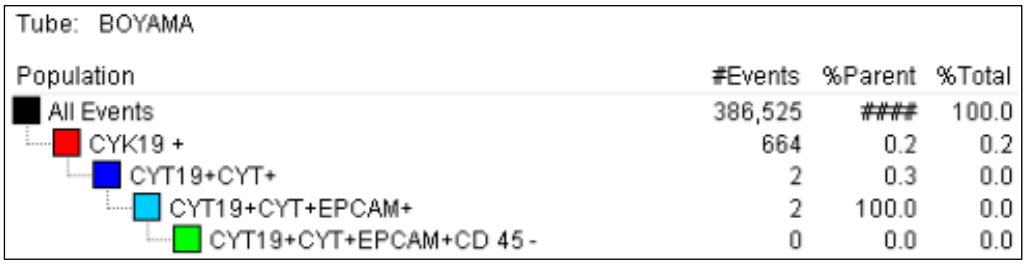
Şekil 4.20. Kontrol 3'ün deney tüpü akan hücre ölçer verisi.



Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	800,805	####	100.0
CYK19 +	425	0.1	0.1
CYT19+CYT+	6	1.4	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	2	33.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.21. Kontrol 4'ün deney tüpü akan hücre ölçer verisi.



Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	386,525	####	100.0
CYK19 +	664	0.2	0.2
CYT19+CYT+	2	0.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	2	100.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.22. Kontrol 5'in deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,322	####	100.0
CYK19 +	175	1.7	1.7
CYT19+CYT+	2	1.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	1	50.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.23. Kontrol 6'nın deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	226,125	####	100.0
CYK19 +	1,389	0.6	0.6
CYT19+CYT+	17	1.2	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	2	11.8	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.24. Kontrol 7'nin deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Tube: BOYAMA

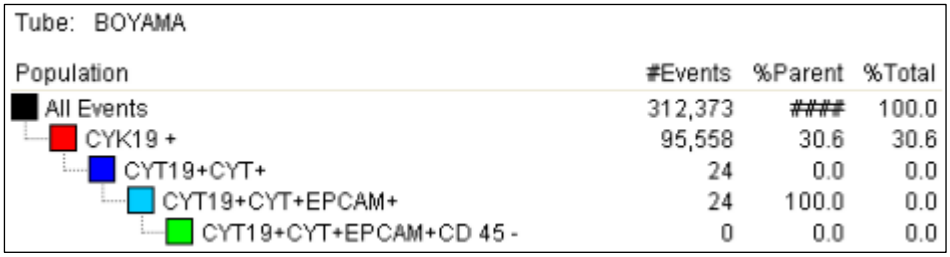
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	24,574	####	100.0
CYK19 +	86	0.3	0.3
CYT19+CYT+	2	2.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	2	100.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.25. Kontrol 8'in deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	344,446	####	100.0
CYK19 +	443	0.1	0.1
CYT19+CYT+	14	3.2	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	13	92.9	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.26. Kontrol 9'un deney tüpü akan hücre ölçer verisi.



Şekil 4.27. Kontrol 10'un deney tüpü akan hücre ölçer verisi.

Hasta grubunun CTC sayısı ortancası operasyon öncesinde 6.0 (min-maks: 4.0 – 21.0); operasyon sonrasında 0.0 (min-maks: 0.0 – 5.0) şeklinde hesaplanmıştır (Tablo 4.3). Operasyondan sonra CTC sayılarının anlamlı düzeyde düştüğü görülmüştür ($Z=2.032$; $p=0.042$). Kontrol grubunda CTC tespit edilmemiştir. Hasta grubunun operasyon öncesi CTC sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($Z=4.047$; $p<0.001$). Hasta grubunun operasyon sonrası CTC sayısı ile kontrol grubunun CTC sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir ($p=0.254$).

Tablo 4.3. CTC sayılarının hasta ve kontrol grubunda dağılımı.

	Hasta grubu	**Kontrol grubu**[1]	**Test istatistiği**	**p**
CK-19	n=10	n=10		
Operasyon öncesi	6.0 (4.0-21.0)[2]	0.0 (0.0 – 0.0)	4.047	<0.001
	n=5	n=10		
Operasyon sonrası	0.0 (0.0 – 5.0)	0.0 (0.0 – 0.0)	2.070	0.254
Test istatistiği	2.032	–		
p	0.042	–		

[1] Kontrol grubunda, yapılan tek ölçümlerin sonuçları verilmiştir.

[2] ortanca (min-maks)

Hasta grubunda invazivlik durumuna göre CTC sayıları karşılaştırıldığında, operasyon öncesi ve sonrası CTC sayıları bakımından invaziv olan ve olmayan hastaların benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$; Tablo 4.4). İnvaziv olan ve olmayan hastalarda operasyon sonrasında CTC sayılarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 4.4. İnvazivlik durumuna göre CTC sayısı dağılımı.

	İnvaziv	**İnvaziv olmayan**	**Test istatistiği**	**p**
CK-19	n=6	n=4		
Operasyon öncesi	6.0 (4.0-21.0)[1]	7.0 (5.0 – 15.0)	0.217	0.941
	n=3	n=2		
Operasyon sonrası	0.0 (0.0 – 5.0)	0.0 (0.0 – 2.0)	0.000	1.000
Test istatistiği	1.414	1.604		
p	0.157	0.109		

[1] ortanca (min-maks)

5. TARTIŞMA

Dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC); dolaşımda yer alan primer tümör hücreleri veya metastatik hücrelerdir (6). Kanda çok nadir bulunan CTC'ler ilk olarak 1869 yılında Ashworth tarafından bahsedilmiştir (64). CTC'lerin yüzey özelliklerine göre tespit edilmesi modern tekniklerle mümkündür (19) ve çalışmamızda da bu özelliklerden yararlanılmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda CTC'lerin sayımı ve karakterizasyonu üzerine yoğunlaşılmış, prognostik ve farmakodinamik bir belirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır (65).

Birçok çalışma CTC'nin saptanabilir ve sayılabilir olduğunu göstermiştir ancak kanda çok az miktarda bulunduklarından dolayı, alınan 7.5 mL kanda aslında olduğundan daha az bulunması ihtimalinin çok yüksek olduğu bilinmeli ve mevcut CTC'lerin kaçırılabilir olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Aşağıda verilen teknolojik gelişmeler ile bu durum en aza indirilmiştir.

Günümüzde kanserde bireysel tedavi oldukça önemli hale gelmiştir. Hastalarda CTC saptanması ve karakterize edilmesi ile bireysel tedavi hedefine ulaşmak umut edilmektedir. Karakterizasyonun moleküler düzeyde yapılması ile CTC çalışmaları ileri bir düzeye ulaşmıştır. CTC saptama yöntemlerinin özgüllükleri henüz tam olarak bilinemediği için klinik uygulamalara dahil edilmemiştir.

"Sıvı biyopsi" olarak adlandırılan, invaziv olmayan, kandaki biyobelirteçlerin değerlendirilmesine dayanan işlemde; miRNA'lar ve proteinlere ek olarak eksozomlar, serbest dolaşan DNA'lar ve CTC'ler de değerlendirilebilir (63). CTC analizleri, tedavi takibine ve tedavinin bireyselleştirilmesine olanak sağlamaktadır (66). Kanserde epitelyal-mezenkimal dönüşüm esnasında CTC oluşumunun spesifik rolü henüz tam olarak ortaya konulamamıştır ve kanser hücrelerinde bu dönüşümün indüklenmesinin CTC üretiminin en önemli sebebi olduğu düşünülmektedir (63).

İlerlemiş tümörü olan hastalarda 10^{12} kan hücresi başına 1 adet CTC saptanmıştır (90). Hastalardan alınan kanın sınırlı miktarda olması da CTC saptanmasını zorlaştırmaktadır. En çok kullanılan yöntemlerde izlenilen yol iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada örneğin zenginleştirilmesi işlemi gerçekleştirilir.

İkinci aşamada ise saptama basamağıdır. Tümör hücresinin saptanmasında, normal kan hücreleri ile arasındaki farklar göz önünde bulundurulmaktadır., örneğin; tümör hücresi ile normal hücrenin antijen ifadeleri farklıdır (6, 72).

CTC'lerin zenginleştirilmesi için kullanılan yoğunluk gradiyentine bağlı ayrımda tümör hücrelerini de içeren lenfositler, monositler ve trombositlerden oluşan mononükleer hücreler (PBMC); eritrositler, granülositler ve plateletler gibi diğer hücrelerden yoğunluk farklarına göre ayrılır (74). Bu işlem için 3 yöntem mevcuttur. Bunlar; Fikol ile ayrım, OncoQuick (Greiner BioOne, Frickenhausen, Almanya) sistemi ile ayrım ve Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norveç) ile ayrımdır (53, 74). OncoQuick sistemi ile ayrım henüz yeni bir sitemdir (74). Bu sistemde 15-35 mL kan örneği kullanılması sistemin en büyük dejavantajıdır (75). Lymphoprep çok daha az tercih edilen bir yöntemdir (76). Çalışmamızda kullandığımız standart yöntem olan Fikol ile ayrım tekniğinde kan kontaminasyon riskinin daha az olduğu yapılan çalışmalarda ispatlanmıştır (53). Mililitre başına yalnızda 2000-10000 lökosit kontaminasyonu görülmektedir (75, 91). Çalışamızda, lökosit kontaminasyonu CD45 deplesyonu ile en aza indirilmiştir.

CTC'ler, epitelyal antijenleri eksprese ederler. Bu nedenle CTC'leri saptayabilmek için epitelyal antijenlere karşı spesifik antikorlar kullanılmaktadır. EpCAM ve sitokeratinler pozitif seçilimde, CD45 negatif seçilimde kullanılmaktadır (75). İzole edilen hücreler farklı yöntemler ile analiz edilmektedir.

CTC'lerin saptanması için farklı yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan en bilineni Amerika İlaç ve Gıda Dairesi tarafından olaylanan CellSearch (Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, NJ, United States) sistemidir. Bu sistem yarı otomatik bir sistem olup, Celltrack Otoprep ve Celltrack Analiz olmak üzere iki bileşenden oluşur. Otoprep aşamasında CTC'ler EpCAM ile pozitif olarak seçilip, Sitokeratin 8, 18 ve 19'a karşı floresan antikorlarlar ve lökosit antijeni CD45'e karşılık antikorlar ile işaretlenirler. Celltrack Analiz aşaması, yarı otomatik Floresan mikroskopu ile görüntüleme ve CTC'lerin bir analiz yazılımı ile lökositlerden ayırt edilmesi işlemlerini kapsar. Bu aşamada; Sitokeratin pozitif ve CD45 negatif hücreler olarak tanımlanan CTC'ler, çekirdeklerinde bulunan DNA'larına bağlanan DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol) boyası ile pozitif olarak boyanıp saptanırlar (92, 93). Bu sistemin CTC saptama duyarlılığı %78.9 ile %82 arasındadır (94, 95). CellSearch

sistemi ile metastatik meme, prostat ve kolon kanserlerinde CTC saptanması prognostik olarak klinik uygulamalarda kullanılmakta olup, 3 kanser türü için CTC eşik değerleri belirlenmiştir. Bu eşik değerler 7.5 mL kanda meme kanseri ve prostat kanseri için ≥5 CTC, kolon kanseri için ≥3 CTC'dir (6). Bu değerlerin altında CTC tespit edilen hastalarda henüz metastaz görülmediği, ama bu değerlere denk ya da üzerinde CTC saptanan hastalarda metastaz görüldüğü ve genel sağkalımların kötü olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (96, 97, 98).

Mesane kanserli hastalarda CellSearch sistemi ile CTC tespit çalışması, ilk olarak 2007 yılında Naoe ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş olup; uzak metastazı olan 14 mesane kanserli hastanın 8'inde (%57) CTC saptanmış, metastazı olmayan 12 mesane kanserli hastada CTC bulunamamıştır (99). 2008 yılında gerçekleştirilen Gallagher ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise, yine CellSearch sistemi ile, uzak metastazı olan 33 mesane kanserli hastanın 14'ünde (%44) CTC saptanmıştır (100). Guzzo ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu çalışma ise, CellSearch sistemi ile, radikal sistektomi tedavisi uygulanan mesane kanserli hastalarda CTC saptanması açısından bir ilktir. Bu çalışmada; radikal sistektomi öncesi, 43 hastanın yalnızca 9'unda (%21) CTC tespit edilebilmiştir (101). Rink ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, radikal sistektomi tedavisi sonrası 100 mesane kanserli hastanın 23'ünde CTC saptanmıştır. Bu çalışmada, radikal sistektomi sonrası bir tek CTC bile bulunmasının kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (102).

Bu çalışmaya konu olan mesane kanseri için CellSearch sisteminde belirlenen bir "CTC eşik değeri" bulunmamaktadır. Şu ana kadar CellSearch sistemi ile yapılan mesane kanseri CTC tespit çalışmalarında duyarlılık oldukça düşük olup, hastaların yalnızca %17 ile %23'ü arasında CTC saptanabilmiştir (103). Erken evre mesane kanserli hastalarda çoğunlukla bu sistem ile CTC saptanamamıştır (104).

Mesane kanserinde de CTC tespiti oldukça önemli olup, kötü prognostik faktörlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (56). CTC saptamak için çeşitli idrar belirteçleri de çalışmalarda kullanılmıştır, ama rutin üroloji testlerinde kullanılabilecek kadar duyarlılık gösterememişlerdir (104). Sitokeratinler hücre içi proteinler oldukları için idrarda saptanmaları, yalnızca hücre ölümünden sonra mümkündür (43). Gazzaniga ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada; invaziv

olmayan mesane kanserli hastaların %20'sinde kanda CTC tespit edilmiş olup, progresyonsuz sağkalım ve nüks süresi tahmin edilebilmiştir (105). Bir diğer çalışmada Rink ve arkadaşları; invaziv olan mesane kanserli hastalarda radikal sistektomi sonrası CTC varlığının kötü sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ancak, invaziv olmayan mesane kanserli hastalarda CTC-pozitif ve CTC-negatif hastalar arasında sağkalım açısından fark bulamamışlardır (102).

Çalışmamızda, CTC'ler akan hücre ölçer cihazı ile tespit edilmiştir. CTC'ler oldukça heterojen bir doğaya sahip olduklarından dolayı, çoklu belirteç kullanılması bu sistemi, daha avantajlı kılmıştır (6). Bu sistemde protein bazlı karakterizasyon gerçekleştirilmektedir. Çalışmamızda da yapmış olduğumuz CD45 deplesyonu sonrası CTC'lerin akan hücre ölçer cihazında tespit duyarlılığı %57 ile %94 arasındadır (106). Yapılan çalışmalarla akan hücre ölçer cihazının CTC saptama duyarlılığının oldukça yüksek olduğunun gösterilmesi, çalışmamızda bu sistemi kullanmamızın en önemli sebebidir.

Çalışmamızda; mesane kanserli hastalarda opere öncesi CTC saptamış olup, opere sonrası CTC sayılarında anlamlı düzeyde düşüş gözlenmiştir. Opere sonrası bazı hastalardan kan alamayışımızın sebebi, hastaların şehir dışından geliyor olması ve ikamet ettikleri şehirde tedavilerine devam edilecek olmasıdır. Kontrol grubunda CTC tespit edilmemiştir. Hasta grubunun operasyon öncesi CTC sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Hasta grubunun operasyon sonrası CTC sayısı ile kontrol grubunun CTC sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir ve bu beklenen bir durumdur. Bu çalışma CTC tespiti ile ilgili umut verici sonuçlar içerip, CTC'nin klinik uygulamalarda kullanılabileceğini göstermiştir. Çalışmamız; tüm CTC tespit yöntemlerinde görülen ve aşılması gereken sorunlara da işaret etmektedir. İdeal yöntemin çok hassas olması ile ancak her CTC saptanabilir. Çalışmamızda yer alan 10 hastanın CTC verileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak eşik değeri belirlemek için klinik evrelemesi yapılmış, daha fazla popülasyonun, genel sağkalımları göz önünde bulundurularak analiz edilmesi gerektiği ortaya konmuştur.

Dolaşımdaki tümör hücrelerinin tespiti ile yalnızda prognoz tahmini değil, aynı zamanda tedavinin bireyselleştirilmesi ve planlanması gerçekleştirilebilecektir. CTC'lerin ayrıntılı analizi ile metastaz süreci de daha net anlaşılabilecektir. Bu

bağlamda, akan hücre ölçer cihazı ile CTC'lerin tek olarak hücresel düzeyde tespit edilebilmeleri ile, kültür edilmeleri ve/veya çeşitli tekniklerle (örn. ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu ile) moleküler düzeyde karakterize edilmeleri de hedeflerimiz arasındadır. Moleküler karakterizasyon ile CTC'lerin biyolojik davranışı daha net anlaşılabilecektir. Bu sayede, bir tüp (7.5 mL) kan ile, invaziv olmayan "sıvı biyopsi" tekniği ile tedavinin bireyselleştirilmesi mümkün hale gelebilecektir.

Fehm ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kontrol bireylerinde %20'ye kadar sitokeratin pozitif hücreler bulunmuştur. Bunun en önemli sebebi; spesifik olmayan bağlanmalardır. Örneğin; antikorlar, epitelyal antijen ekspresyonu olan hücrelere bağlanması gerekirken, lökositlere spesifik olmayan bağlanmalar gerçekleştirebilmektedir (107). Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için, saptama basamağındaki belirteçler seçilirken, lökositlere ve dolaşımdaki tümör olmayan diğer hücrelere bağlanmayacağından emin olunmalıdır (108). Aynı zamanda benign tümörlü hastalarda da, operasyon sonrası malign olmayan epitel hücreler görülmektedir (75, 109). Bizim çalışmamızda; kontrol bireylerde, yanlış pozitif sonuçlara rastlanılmamıştır. Çeşitli sitokeratinlerin bir arada kullanılmış olması duyarlılığı artırmıştır. Ancak opere sonrasında 6. ve 8. hastalarda hala CTC tespit edilmiş olması, yanlış pozitiflik sonucu ortaya çıkmış olabilir. Ya da bu hastalarda tümör tam olarak temizlenememiş olup, malign durum devam etmektedir. Bu hastaların ilerleyen zamanlarda takibinin devam etmesi ve CTC tespit çalışmalarının tekrarlanması sonucu kesin bilgi edinilmesi, hedeflerimiz arasındadır.

İnvaziv tümörü olan hastaların bazılarında invaziv olmayanlara göre daha az CTC saptanmıştır. Bunun en önemli sebebi işlem sırasında kayıpların olmasıdır. Sebeplerden birisi olan; Fikol aşamasında PBMC tabakasının yeterince ayrılamaması sonucu CTC'ler kaçırılabilmektedir. Tabakanın belirgin bir şekilde ayrılabilmesi için öncesinde liziz yapılarak yöntem optimize edilebilir. Bazı invaziv tümörü olan ve çalışmamıza radikal sistektomi (RC) esnasında dahil edilen hastaların da daha öncesinde transüretral rezeksiyon (TUR) operasyonu geçirdikleri belirlenmiş olup, CTC sayılarının invaziv olmayan tümörlü hastalara oranla daha az oluşunu bu durum açıklamaktadır.

Bu çalışma, CTC saptama aşamasında antikorlar ve manyetik boncuklar gerektirmesi açısından maliyette önemli yer teşkil etmektedir. Bu nedenle yöntemimizi optimize ederek maliyeti düşürmek ve klinik uygulamalarda kullanılabilir duruma getirmek de hedeflerimiz arasındadır. Mesane kanserinin erken tanı ve evrelemesi, tedavi sürecinin izlenmesi için, invaziv olmayan yöntemlere acil ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışılan mevcut yöntemde duyarlılığı artırmak, yanlış bağlanmaları önlemek, yeni belirteçlerin kullanılması, bu tekniğin iyileştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu nedenle daha fazla sayıda ve daha fazla klinik bilgiye sahip olunan hastalarda; optimize edilmiş yöntem ile CTC tespit çalışmalarına devam etmek hedeflenmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- CTC'lerin sayımı ve karakterizasyonu üzerine çalışmalar yoğunlaşmış olup, prognostik ve farmakodinamik bir belirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır.

- Mesane kanserinde CTC tespiti oldukça önemlidir ve kötü prognostik faktörlerle ilişkili olduğu bilinmektedir.

- Bazı CTC saptama yöntemlerinde bazı kanser türlerine spesifik 'CTC eşik değerleri' belirlenmiştir. Ancak mesane kanseri için henüz belirlenen bir eşik değeri mevcut değildir.

- Çalışmamıza 10 mesane kanserli hasta dahil edilmiştir, bu hastaların 5'inde opere öncesi ve sonrası CTC tespiti ile takipleri yapılmıştır.

- Söz konusu çalışmamızda, mesane kanserli hastalarda, CTC'ler akan hücre ölçer cihazı ile tespit edilip, sayımları gerçekleştirilmiş ve analiz edilmiştir.

- Çalışmamızda, CTC'leri zenginleştirme aşamasında; Fikol ile gradiyente bağlı ayrım ve immünomanyetik olarak CD45 mikro-boncuklar ile deplesyon gerçekleştirilmiştir.

- Saptama aşamasında ise CTC'ler; EpCAM, CK 7,8 ve CK 14, 15, 16, 19 ile işaretlenmiştir.

- Mesane kanserli hastalarda opere öncesi CTC saptamış olup, opere sonrası CTC sayılarında anlamlı düzeyde düşüş gözlenmiştir.

- Hasta grubunun operasyon öncesi CTC sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir.

- Kontrol grubunda CTC tespit edilmemiştir.

- Çalışmamızda yer alan 10 hastanın CTC verileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

- Hasta grubunun operasyon sonrası CTC sayısı ile kontrol grubunun CTC sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir.

- Çalışmamızda, mesane kanseri için bir CTC eşik değeri belirlenememiştir.

- Çalışmamız; tüm CTC tespit yöntemlerinde görülen ve aşılması gereken sorunlara da işaret etmektedir.

- Bu çalışma CTC tespiti ile ilgili umut verici sonuçlar içerip, CTC'nin klinik uygulamalarda kullanılabileceğini göstermiştir.

- Son zamanlarda kanserde bireysel tedavinin oldukça önemli olduğu anlaşılmıştır. Hastalarda CTC tespiti ile karakterizasyonu bireysel tedavide umut vaad etmektedir.

- CTC karakterizasyonunun moleküler düzeyde yapılması ile CTC çalışmaları daha ileri bir düzeye ulaşılabilir.

- CTC saptanırken antikorlar ve manyetik boncuklar gerektirmesi açısından maliyette önemli yer teşkil etmektedir. Yöntemimiz optimize edilerek maliyet düşürülmeli ve bu yöntem klinik uygulamalarda kullanılabilir duruma getirilmelidir.

- Bu çalışmaya konu olan mevcut yöntemde duyarlılık artırılmalı, varsa yanlış bağlanmalar önlenmelidir. Yeni belirteçler kullanılarak teknik daha uygun bir hale getirilmelidir.

- Daha fazla sayıda ve daha fazla klinik bilgiye sahip olunan hastalarda; optimize edilmiş yöntem ile CTC tespit ve karakterizasyon çalışmalarına devam edilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Allison L. *Temel Moleküler Biyoloji*, 2. baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2014:546-550

2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman DB. World Cancer Research Fund International. http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data. 1 Haziran 2016

3. Feng Y, Kang Y, He Y, Liu J, Liang B, Yang P, Yu Z. microRNA-99a acts as a tumor suppressor and is down-regulated in bladder cancer, *BMC Urol*., 2014, 14(1):50.

4. Ribal MJ, Mengual L, Marin M, Algaba F, Ars E, Fernandez PL, Oliva R, Villavicencio H, Alcaraz A. Molecular staging of bladder cancer with RT-PCR assay for CK20 in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes: comparison with standard histological staging, *Anticancer Res.*, 2006, 26(1A):411-419.

5. Uyar C. Mesane Kanserinde 20q11-13 Bölgesi Heterozigotluk Kaybı Analizi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi, 2014.

6. Lowes LE, Allan AL. Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells, *Cancers (Basel)*, 2014, 6(1):595-624.

7. Thalgott M, Heck MM, Pantel K. Detektion zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut beim Prostatakarzinom, *Urologe*, 2014, 53(4):509-513.

8. Danila DC, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer, *Clin Cancer Res*., 2011, 17(12):3903-3912.

9. Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer, Mechanisms, Targets and Therapeutics*, 3rd ed. Oxford, Oxford University Press, 2012: 2-20.

10. Weaver RF, Hedrick P. Genes and Cancer. In: Weaver RF, Hedrick P (eds). *Genetics*. 3rd ed. Dubuque, Brown Publishers, 1997:482-503.

11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5):646-674.

12. Dhingra S, Tan D. Oncogenes. In: Tan D, Lynch H (eds). *Principles of Molecular Diagnostics and Personalized Cancer Medicine*. 1st ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2013:65.

13. Hengstler JG, Bogdanffy MS, Bolt HM, Oesch F. Challenging dogma: thresholds for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003, 43:485-520.

14. Strachan T, Read A. *Human Molecular Genetics*. 4th ed. Connecticut, Garland Science, 2010: 537-540.

15. Şen F. Klinik Onkolojinin Temeli-Karsinogenez. İçinde: Molinas Mandel N (editör). *Onkoloji El Kitabı*, 1. Baskı. Adana, Çukurova Nobel Kitapevi, 2015:9-13.

16. Davies M, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma, *Oncogene*, 2010, 29(41):5545-5555.

17. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. NewYork, Garland Sciences, 2008:1205-1208.

18. Arslan Ç. Klinik Onkolojinin Temeli-Kanserde Tanı: Patoloji ve Laboratuvar. İçinde: Molinas Mandel N (editör). *Onkoloji El Kitabı*. 1. Baskı Adana, Çukurova Nobel Tıp Kitapevi, 2015:32-34.

19. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed. New York, Garland Science, 2015:1100-1103.

20. Warshawsky D, Landolph JR. *Molecular Carcinogenesis and the Molecular Biology of Human Cancer*. Los Angeles, CRC Press, 2006:1-419.

21. Bechter OE, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Homologous recombination in human telomerase-positive and ALT cells occurs with the same frequency, *EMBO Reports*, 2003, 4(12):1138-1143.

22. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Prolif*., 2012, 45(6):487-498.

23. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited, *Nat Rev Cancer*., 2003, 3:453-458.

24. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth, *Semin Cancer Biol*., 1992, 3(2):65-71.

25. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N Engl J Med*., 1971, 285(21):1182-1186.

26. Miyata Y, Sakai H, Kanda S. Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Bladder Cancer. In: Canda AE (ed). *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery*. 1st ed. Rijeka, Croatia, InTech, 1992:117-128.

27. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in tumorigenesis. *Tumor Angiogenes Basic Mech Cancer Ther*., 2008, 19:67-88.

28. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: Building a framework, *Cell*, 2006, 127(4):679-695.

29. Cifone MA, Fidler IJ. Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms, *Proc Natl Acad Sci. USA*., 1981, 78(11):6949-6952.

30. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer, *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(2):118-132.

31. Brábek J, Mierke CT, Rösel D, Veselý P, Fabry B. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion, *Cell Commun Signal*, 2010, 8:22.

32. Konstantopoulos K, Thomas SN. Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells, *Annu Rev Biomed Eng.*, 2009, 11:177-202.

33. Baykara M. Ürogenital Organların Anatomik ve Histolojik Yapısı-Mesane. İçinde: Anafarta K, Arıkan N, Bedük Y (editörler). *Temel Üroloji*, 4. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2011:7-11.

34. Arifoglu Y. *Her Yönüyle Anatomi*, 1. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitapevi, 2016:400-401.

35. Drake RL, Vogl AW, Mitchell AW. *Gray's Anatomy for Students,*3rd ed. Ohio, Churchill Livingstone, Elsevier, 2015:421-532.

36. World Health Organization. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_part2.pdf?ua=1. 1 Haziran 2016.

37. National Cancer Institute. SEER Stat Fact Sheets: Bladder Cancer. http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html. 1 Haziran 2016.

38. Öztürk MA. Spesifik Maligniteler-Mesane Kanseri. İçinde: Molinas Mandel N (editör). *Onkoloji El Kitabı*, 1. Baskı. Adana, Çukurova Nobel Tıp Kitapevi, 2015:174-179.

39. Türk Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı, Türkiye' de Kanser İnsidansları. http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/Turkiye_Kanser_istatistikleri.pdf. 1 Haziran 2016.

40. Gültekin M, Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. http://www.kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu.pdf. 1 Haziran 2016.

41. Bedük Y. Ürogenital Tümörler-Mesane Tümörleri. İçinde: Anafarta K, Arıkan N, Bedük Y (editörler). *Temel Üroloji*. 4. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2011:774-792.

42. Edge S, Byrd D, Compton C, Fritz A, Greene F, Trotti A. Genitourinary Sites-Uninary Bladder. In: Edge S, Byrd D, Compton C, Fritz A, Greene F, Trotti A (eds). *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, Springer, 2015:497-507.

43. Alkibay T, Gürocak S. Ürogenital Tümörler. İçinde: Anafarta K, Arıkan B, Bedük Y (editörler). *Temel Üroloji*. 4. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2011:737-739.

44. Dawam D. Biomarkers of Bladder Cancer in Urine : Evaluation of Diagnostic and Prognostic Significance of Current and Potential Markers. In: Canda AE (ed). *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery*. 1st ed. Rijeka, Croatia, InTech, 2012:47-59.

45. Unoki M, Kelly J, Neal D, Ponder B, Nakamura Y, Hamamoto R. UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer. In: Canda AE (ed). *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery*. 1st ed. Rijeka, Croatia, InTech, 2012:129-146.

46. Miremami J, Kyprianou N. The promise of novel molecular markers in bladder cancer, *Int J Mol Sci*.. 2014, 15(12):23897-23908.

47. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J, Roupret M. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, *Eur Urol*., 2011, 59:997-1008.

48. Köberle B, Piee-staffa A. The Molecular Basis of Cisplatin Resistance in Bladder Cancer Cells. In: Canda AE (ed). *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery*. 1st ed. Rijeka, Croatia, InTech, 2012:265-290.

49. Zaghloul MS, Gouda I. Bladder Cancer and Schistosomiasis: Is There a Difference for the Association? In: Canda AE (ed). *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery*. 1st ed. Rijeka, Croatia, InTech, 2011:195-218.

50. Altayli E, Güneş S. Mesane kanseri gelişiminde moleküler mekanizmalarin rolü, *Turkiye Klin J Med Sci*., 2011, 31(1):191-205.

51. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D, Sidransky D. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis, *Science*, 1996, 271(5249):659-662.

52. Fuessel S, Kunze D, Wirth MP. Bladder Cancer Biology. In: Canda AE (ed). *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery*. 1st ed. Rijeka, Croatia, InTech, 2010:4-44.

53. Nezos A, Pissimisis N, Lembessis P, Sourla A, Dimopoulos P, Dimopoulos T, Tzelepis K, Koutsilieris M. Detection of circulating tumor cells in bladder cancer patients, *Cancer Treat Rev*., 2009, 35(3):272-279.

54. Sternberg CN, Donat SM, Bellmunt J, Millikan RE, Stadler W, Mulder PD, Sherif A, Maase H, Tsukamoto T, Soloway MS. Chemotherapy for bladder cancer: treatment guidelines for neoadjuvant chemotherapy, bladder preservation, adjuvant chemotherapy, and metastatic cancer, *Urology*, 2007, 69:62-79.

55. Rhijn BWG, Liu L, Vis AN, Bostrom PJ, Zuiverloon TCM, Fleshner NE, Alkhateeb SS, Bangma CH, Jewett MAS, Zwarthoff EC, Bapat B, Kwast TH, Zlotta AR. Prognostic value of molecular markers, sub-stage and European Organisation for the Research and Treatment of Cancer risk scores in primary T1 bladder cancer, *BJU Int.*, 2012, 110(8):1169-1176.

56. Nagata M, Muto S, Horie S. Molecular biomarkers in bladder cancer : novel potential indicators of prognosis and treatment outcomes, *Disease Markers*, 2016, 2016:8205836.

57. Matouk I. The H19-IGF2 Role in Bladder Cancer Biology and DNA-Based Therapy. In: Canda AE (ed). *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery*. 1st ed. Rijeka, Croatia, InTech, 2012:364-380.

58. Memiş B. Mesane Kanserinde Peritümöral ve İntratümöral İmmün Cevabın, Tümör Nüksü ve Prognostik Faktörlerle İlişkisi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Sakarya: TC Sağlık Bakanlığı Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2015.

59. Bladder cancer symptoms, stages and treatment. http://www.medicinenet.com/bladder_cancer_pictures_slideshow/article.htm. 21 Nisan 2016.

60. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, White EW, Sarosdy MF, Wood DP, Raghavan D, Crawford ED. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer, *N Engl J Med*., 2003, 349(9):859-866.

61. Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM, Kerbrat P, Sanchez Rovira P, Wersall P, Cleall SP, Roychowdhury DF, Tomlin I, Visseren-Grul CM, Conte PF. Gemcitabine and Cisplatin versus Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study, *J Clin Oncol*., 2000, 17(17):3068-3077.

62. 78 Steps Health Journal- Bladder Cancer. http://www.78stepshealth.us/bladder-cancer/surgical-procedures.html. 21 Nisan 2016.

63. Zhang C, Guan Y, Sun Y, Ai D, Guo Q. Tumor heterogeneity and circulating tumor cells, *Cancer Lett*., 2016, 374(2):216-223.

64. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death, *Aust Med J*., 1869, 14(146).

65. Castle J, Shaker H, Morris K, Tugwood JD, Kirwan CC. The significance of circulating tumour cells in breast cancer : A review, *The Breast*., 2014, 23(5):552-560.

66. Eccles SSA, Aboagye EOE, Ali S, Anderson AS, Armes J, Berditchevski F, Blaydes JP, Brennan K et al. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer, *Breast Cancer Res*., 2013, 15(5):92.

67. Battula VL, Evans KW, Hollier BG, Shi Y, Marini FC, Ayyanan A, Wang RY, Brisken C, Guerra R, Andreef M, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition-

derived cells exhibit multi- lineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, 2010, 28(8):1435-1445.

68. Trzpis M, McLaughlin PMJ, de Leij LMFH, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule, *Am J Pathol*., 2007, 171(2):386-395.

69. Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BJ, Miyamoto DT, Brachtel E, Yu M, Chen P, Morgan B, Trautwein J et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells, Sci Transl Med., 2013, 5(179):1-20.

70. Trowbridge I, Thomas M. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development, *Annu Rev Immunol*., 1994, 12:85-116.

71. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Brechot C, Paterlini-Brechot P. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulatingtumor cells, *Am J Pathol*., 2000, 156(1):57-63.

72. Hou HW, Warkiani ME, Khoo BL, Li ZR, Soo RA, Tan DSW, Lim WT, Han J, Bhagat AAS, Lim CT. Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces, *Sci Rep*., 2013, 3:1259.

73. Fabbri F, Carloni S, Zoli W, vd. Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs, *Cancer Lett*., 2013, 335(1):225-231.

74. Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Führer K, Dahm M, Phelps R, Thorban S, Nekarda H, Siewert JR. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood, *Cytometry*, 2002, 49(4):150-158.

75. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions, *Cancer Lett*., 2007, 253(2):180-204.

76. Panteleakou Z, Lembessis P. Detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients: methodological pitfalls and clinical relevance, *Mol Med*., 2009, 15(3-4):1.

77. Andergassen U, Hofmann S, Kölbl AC, Schindlbeck C, Neugebauer J, Hutter S, Engelstaedter V, Ilmer M, Friese K, Jeschke U. Detection of tumor cell-specific mRNA in the peripheral blood of patients with breast cancer-evaluation of several markers with real-time reverse transcription-PCR, *Int J Mol Sci*., 2013, 14(1):1093-1104.

78. Suhrbier K. Untersuchung der möglichen Rolle von zirkulierenden vaskulären und lymphatischen Endothelzellen , sowie zirkulierenden Tumorzellen im Blut als Surrogatmarker für die klinische Wirkung bei der antiangiogenetischen Therapie mit SU014813, Haematologie und Onkologie, Uzmanlık Tezi, Hamburg: Universitaeres Cancer Center Hamburg, 2009.

79. Yılmaz S, Avcı Ç, Şığva Z, Nazlı O, Gunduz C. Molecular evaluation of cytokeratin 20 mRNA expression of transitional cell carcinoma cases, *Ege J Med*., 2011, 50(2):81-86.

80. Basu S, Campbell HM, Dittel BN, Ray A. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS), *J Vis Exp*., 2010, (41):1546.

81. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and flow cytometry: A view from Stanford, *Clin Chem*., 2002, 48(10):1819-1827.

82. Gazioğlu Bilgiç S. Genel Bilgiler. İçinde: Deniz G, Yanıkkaya Demirel G (editörler). *Akan Hücre Ölçer*, 1. Baskı. İstanbul, Yelken Ajans Reklamcılık, Yayıncılık ve Matbaacılık, 2014:9-13.

83. Karaboz İ, Kayar E, Akar S. Flow sitometri ve kullanım alanları, *Elektron Mikrobiyoloji Derg*., 2008, 6(2):1-18.

84. Simsek E, Guler OO, Carhan A, Ersan B, Arkan TK, Dilek Y, Ercan E, Oz BE, Terzi E, Calisir E, Tiryaki M, Pinarli FA, Korkmaz MH. Determination of circulating tumor cells in peripheral blood by flow cytometry, 2014, doi: 10.5152/niche.2015.246.

85. Halkman AK, Ayhan K. Mikroorganizma Sayımı. İçinde: Halkman AK, Ayhan K (editörler). *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, 2. Baskı. Ankara, Sim Matbaası, 2000:522.

86. Shapiro MH. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, 2003.

87. Kühn J. Modulation der Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln durch Tumorzellen und Leukozyten – Einsatz von Zuckerderivaten, Klinik für Innere Medizin, Uzmanlık Tezi, Thüringen: Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2010.

88. Dorsch V. Methodische Untersuchung zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Blut, Strahlenklinik, Uzmanlık Tezi, Nürnberg: der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2015.

89. Dalva K, Gülbaş Z. Akim sitometri uygulamaları. http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/molhem_14.pdf. 3 Haziran 2016.

90. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: Approaches to isolation and characterization, *J Cell Biol*., 2011, 192(3):373-382.

91. Zabaglo L, Ormerod MG, Parton M, Ring A, Smith IE, Dowsett M. Cell filtration-laser scanning cytometry for the characterisation of circulating breast cancer cells, *Cytometry A*., 2003, 55(2):102-108.

92. Ross JS, Slodkowska EA. Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer, *Am J Clin Pathol*., 2009, 132(2):237-245.

93. Allan AL, Keeney M. Circulating tumor cell analysis: Technical and statistical considerations for application to the clinic, *J Oncol*., 2010, 2010.

94. Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, Burke JF. Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients, *Breast Cancer Res*., 2008, 10(4):R69.

95. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, vd. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system, *Clin Cancer Res*., 2007, 13(3):920-928.

96. Cristofanilli M, Budd T, Matthew JE, Stopeck A, Matera J, Miller CM, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LWMM, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, 2004, 781-791.

97. Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LWWM, Pienta KJ, Raghavan D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer, *Clin Cancer Res*., 2008, 14(19):6302-6309.

98. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LWMM, Meropol NJ. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer, *Ann Oncol*., 2009, 20(7):1223-1229.

99. Naoe M, Ogawa Y, Morita J, Omori K, Takeshita K, Shichijyo T, Okumura T, Igarashi A, Yanaihara A, Iwamoto S, Fukagai T, Miyazaki A, Yoshida H. Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the CellSearch System, *Cancer*, 2007, 109(7):1439-1445.

100. Gallagher DJ, Milowsky MI, Ishill N, trout A, Boyle MG, Riches J, Fleisher M, Bajorin DF. Detection of circulating tumor cells in patients with urothelial cancer, *Ann Oncol*., 2008, 20(2):305-308.

101. Guzzo TJ, McNeil BK, Bivalacqua TJ, Elliott DJ, Sokoll LJ, Schoenberg MP. The presence of circulating tumor cells does not predict extravesical disease in bladder cancer patients prior to radical cystectomy, *Urol Oncol Semin Orig Investig*., 2012, 30(1):44-48.

102. Rink M, Chun FK, Dahlem R, Soave A, Minner S, Hansen J, Stoupiec M, Coith C, Kluth LA, Ahyai SA, Friedrich MG, Shariat SF, Fisch M, Panten K, Riethdorf S. Prognostic role and HER2 expression of circulating tumor cells in peripheral blood of patients prior to radical cystectomy: A prospective Study, *Eur Urol*., 2012, 61(4):810-817.

103. Alva A, Friedlander T, Clark M, Hübner T, Daignault S, Hussain M, Lee Cheryl, Hafez K, Hollenbeck B, Weizer A, Premasekharan G, Tran T, Fu C, Zanetti CL, Schwartz M, Fan A, Paris P. Circulating tumor cells as potential biomarkers in bladder cancer, *J Urol*., 2015, 194(3):790-798.

104. Gazzaniga P, Gradilone A, Berardinis E, Busetto GM, Raimondi C, Gandini O, Nicolazzo C, Petracca A, Vincenzi B, Farcomeni A, Gentile V, Cortesi E, Frati L. Prognostic value of circulating tumor cells in nonmuscle invasive bladder cancer: a CellSearch analysis, *Ann Oncol*., 2012, 23(9):2352-2356.

105. Gazzaniga P, Berardinis E, Raimondi C, Gradilone A, Busetto GM, Falco E, Nicolazzo C, Giovannone R, Gentile V, Cortesi E, Pantel K. Circulating tumor cells detection has independent prognostic impact in high-risk non-muscle invasive bladder cancer, *Int J Cancer*., 2014, 135(8):1978-1982.

106. Liu Z, Fusi A, Klopocki E, Schmittel A, Tinhofer I, Nonnenmacher A, Keilholz U. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients, *J Transl Med*., 2011, 9(1):70.

107. Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J, Gebuaer G. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells, *Cytotherapy*, 2005, 7(2):171-185.

108. Gerges N, Rak J, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells, *Br Med Bull*., 2010, 94(1):49-64.

109. Crisan D, Ruark DS, Decker DA, Drevon AM, Dicarlo RG. Detection of circulating epithelial cells after surgery for benign breast disease, *Mol Diagn*., 2000, 5(1):33-38.

EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRİLDİĞİ VE RIZASININ ALINDIĞINI GÖSTEREN METİNDE YER ALMASI GEREKEN HUSUSLAR

Gönüllülerin bilgilendirilmesi için hazırlanacak metinde aşağıda belirtilen bilgiler yer almalıdır.

ANA ESASLAR:

HER BİR GÖNÜLLÜYE AŞAĞIDAKİ BİLGİLER VERİLMELİDİR:

1. a. Araştırma ile ilgili çalışmaların açıklanması
   b. Araştırmanın amacı
   c. Gönüllünün araştırmaya katılacağı süre
   d. İzlenecek işlemler
   e. Her bir deneysel uygulamanın bildirilmesi

2. Gönüllünün uygulama sırasında karşılaşabileceği rahatsızlıklar ve riskler

3. Kişi veya kişiler için araştırmadan beklenilen tıbbi yarar

4. a. Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda uygulanacak tıbbi tedavi ve her türlü işlemler
   b. Muhtemel zarar durumunda gönüllünün veya yakınının bilgi için ilişki kuracağı kişinin ismi

5. a. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığının beyanı
   b. Gönüllüye araştırmayı red etme hakkına sahip olduğunun bildirilmesi
   c. Gönüllüye, araştırma başladıktan sonra devam etmek istemediğinde, bu hakka sahip olduğunun bildirilmesi
   d. Gönüllünün kendi rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabileceğinin bildirilmesi

6. Çalışmadaki gönüllülerin yaklaşık sayısı

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı, İmzası, Görevi:

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Farklı Evrelerdeki Mesane Kanseri Hastalarında Tespiti'dir.

Bu araştırmanın amacı, sağlıklı bireylerin ve mesane kanseri hastalarının kanlarında dolaşan tümör hücrelerinin olup olmadığını tespit etmektir. Bu araştırmada sizden sadece **1 (bir) kez** bir tüp (7.5 mL) kan alınacaktır. Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 20 'dır.

Bu araştırma ile ilgili olarak doktorunuzun önerilerine uymak sizin sorumluluklarınızdır. Bu araştırmada kan alımı sırasında veya kan alındıktan sonra görülebilecek riskler ve rahatsızlıklar söz konusu olabilir. Bunlar, bu bölgede kanın

dokulara sızması sonucu şişme (hematom oluşumu) sonrasında ağrı, bazı durumlarda enfeksiyon, uyuşma, seyirme, bulantı, kusma, bayılma gibi durumlardır; ancak bu sonuçlarla çok nadir olarak karşılaşılır. Sizin için beklenen yararları, mesane kanseri erken tanısının konulabilecek olması ve kanserin sıçrama (metastaz) yapıp yapmadığının belirlenmesidir.

Bu araştırmanın olası yararları, sizden alınan kanlarda dolaşan tümör hücrelerinin varlığı araştırılacak ve mesane kanseri hastalarının kanlarında bu hücreler sayılacaktır. Dolaşan tümör hücresi tespit edilen hastalarda metastaz görülüp görülmeyeceği hakkında yorum yapılabilecek olmasıdır. Riskleri ise mesane kanseri hastalarında, bu tümör hücrelerinin tespit edilememesi (yanlış negatif sonuç) ya da sağlıklı bireylerde tümör hücresi tespiti (yanlış pozitif sonuç) olabilir. Ancak bu iki durumun gerçekleşme ihtimali çok düşüktür.

Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu olduğunda, bu durumun tedavisi sorumlu araştırıcı tarafından yapılacak, ortaya çıkan masraflar bireyin kendi sağlık güvencesi olan sosyal güvenlik kurumu tarafından karşılanacaktır. Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0312 291 25 25 no`lu telefondan Doç. Dr. Abdullah Erdem CANDA'ya, Doç.Dr. Ali Fuat ATMACA'ya ve Doç.Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a başvurabilirsiniz.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Bu araştırmada yer almak tamamen **sizin isteğinize bağlıdır**. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırıcı bilginiz dâhilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan gerekleri yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız nedeni ile sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da

araştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilecektir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz (tedavinin gizli olması durumunda, gönüllüye kendine ait tıbbi bilgilere ancak verilerin analizinden sonra ulaşabileceği bildirilmelidir).

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırıcıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün,
Adı-Soyadı:
Adresi:
Tel.-Faks:
Tarih ve İmza:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,
Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza: