

Mesane tümörleri ve genetik tanı

Bladder cancer and genetics

Dr. Ata Özen¹, Dr. Cavit Can²

¹Van Bölge Eğitim Araştırma Hastanesi, Van

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Eskişehir

ÖZET

Klinikte mesane kanserlerinin çoğunluğu adele invazif olmayan (yüzeysel) tipte görülür. Tedavi sonrasında rekürrensler sıktır ve idrar sitolojisi ve sistoskopik olarak takibi gerektirir. Ayrıca progresyon riski de oldukça yüksektir.

Konvansiyonel histopatolojik değerlendirme çoğu mesane kanserinin davranışını öngörmeye yetersiz kalmaktadır. Adele invazif olmayan kanserlerin hangisinin tekrarlıyacağı veya progrese olacağı ve invazif kanserlerden hangisinin metastaz yapacağını belirleme gerekliliği mesane kanserli hastalar için çeşitli prognostik belirleyicilerin tanımlanmasına yol açmıştır. Bununla birlikte, bugüne kadar tanımlanan belirteçlerden hiç biri mesane kanserinin belirlenmesi ve davranışını öngörmeye yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip değildir.

Son yıllarda mesane kanserindeki genetik değişiklikleri belirlemek amaçlı çok çalışma yapılmaktadır. Moleküler düzeydeki bilgilenme, yakın gelecekte risk gruplamasında yeni yöntemlerin gelişmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar kelimeler: mesane kanseri, tümör belirteçleri, genetik değişiklikler

İletişim (✉): ccan@ogu.edu.tr

Mesane tümörü tüm kanserler içinde erkeklerde 4. kadınlarda 8. sıklıkta görülmektedir (1). Adele invazif olmayan hastalarda erken nüksü ve progresyonu tespit edebilmek için takipte altın standart yöntem halen sistoskopidir. Bununla beraber sistoskopi invazif bir yöntem olması sebebiyle sistoskopi sayısını azaltmak ve hastaların hayat kalitesini bozmamak adına mesane tümörü tanısında ve takibinde invazif olmayan tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Ayrıca bu non-invazif tanı yöntemlerinden bir kısmı ile sadece hastalığın takibi değil, hastalığın prognozu hakkında da fikir sahibi olunabileceği görülmüştür.

Sistoskopi ile tümör görülerek ve tümörün rezeksiyonu sonrası patolojik inceleme ile, sitolojide ise hücre morfolojisindeki malignite bulguları ile tanı konulurken, diğer tümör belirleyicileri ile tümör hücrelerinde veya tümör hücrelerinin bulunduğu stromadaki biyokimyasal (dipstick veya ELISA ile protein tayini) veya genetik (RT-PCR ile mRNA ekspresyonu veya floresan in situ hibridizasyon ile kromozomal düzensizliklerin belirlenmesi) değişikliklerin belirlenmesi ile tanı konulur. BTA-Stat/Trak, NMP-22, UBC-Rapid, HA-HAase gibi

ABSTRACT

The majority of bladder cancers seen in the clinic are of non-muscle invasive (superficial) type. Recurrences following therapy are frequent and requiring surveillance by urine cytology and cystoscopy. In addition, the risk of progression is likewise high.

Conventional histopathologic evaluation is inadequate to accurately predict the behavior of most bladder cancers. The need to establish which non-muscle invasive cancers will recur or progress and which invasive cancers will metastasize has led to the identification of a variety of potential prognostic markers for bladder cancer patients. However, none of the biomarkers reported to date have shown sufficient sensitivity and specificity for detecting and predicting the behavior of bladder cancer.

At last years, much work has been done to identify genetic alterations in bladder cancer. Hopefully, information at the molecular level will help improve current methods of risk stratification in the near future.

Keywords: bladder cancer, tumor markers, genetic alterations

testler idrarda çözünebilir tümöral ürünleri belirlerken, FISH, telomeraz, mikrosatellit DNA analizi eksfoliy hücrelerin hücre yüzey antijenlerinin, nükleer morfolojinin veya gen ekspresyonunun tespit edilmesine olanak sağlar. Tümöral belirteçlere idrarda, yıkama sıvısında ve dokuda bakılabilir. Genelde idrarda ve yıkama sıvısında bakılanlar tanı amaçlı kullanılırken dokuda bakılanlar tümörün oluşumu ve doğal seyrini belirleyebilmek amaçlıdır.

Genetik tümör belirteçlerinden bahsetmeden önce halen kullanımda olan bazı yöntemlerden ve sentezi genetik olarak kontrol edilen idrarda tanı amaçlı araştırılan proteinlerden bahsetmek faydalı olacaktır.

Mesane kanserinde tümör belirteçleri

Sitoloji

İdrar sitolojisinin tanısal değeri tümörün histolojik derecesiyle, materyalin tedavi öncesi veya tedavi sonrası alınmasıyla, spesmenin kalitesiyle, materyalin elde edilme yöntemiyle ilişkili olarak değişiklik göstermektedir (2). İdrar sitolojisinin mesane tümörü tanısında özgüllüğü

%90-95 fakat duyarlılığı %11-76 (ortalama %35-40) civarındadır (3,4). Özellikle düşük dereceli tümörlerin değerlendirilmesinde sitolojinin duyarlılığı oldukça düşüktür. Yüksek dereceli tümörlerin belirlenmesinde ise yüksek duyarlılığa sahiptir (2,5).

BTA-STAT ve TRAK

Bu iki yöntem idrarda insan kompleman faktör H bağımlı proteinin tespitine dayanmaktadır. Hücre kültürlerinde, normal hücreler H-ilişkili protein ekspresyone etmezler (6). BTA-Stat immünassay prensipleri ile kalitatif olarak protein tespiti yapar. BTA-Trak ise ELISA yöntemiyle kantitatif olarak protein ölçümü yapmaktadır.

BTA-Stat testinin genel sensitivite ve spesifitesi sırasıyla %57-83 ve %60-92 olarak bildirilmektedir (7,8). Düşük dereceli tümörlerde sensitivitesi %13-55 iken yüksek dereceli tümörlerde %36-90 olarak belirtilmektedir (9,10). Histolojik derece arttıkça BTA Stat sensitivitesi artar. İdrar sitolojisi ile karşılaştırıldığında BTA Stat testinin sensitivitesinin daha iyi olduğu ve daha düşük dereceli tümörlerin de tespit edilebileceği bildirilmektedir. Ancak idrar sitolojisinin BTA-Test'ine göre spesifitesinin çok daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (11). BTA-Trak testinin ise sensitivitesi %57-83, spesifitesi ise %50-70 arasında değişmektedir (12).

Sağlıklı bireylerdeki spesifitesi oldukça yüksek olan (%97) bu iki testin özgüllüğü hematüri, benign prostat hipertrofisi, üriner taş, sistit ve nefrit gibi hastalıklarda %46'ya kadar düşer (13).

Bakıldığında her iki test tanıdan çok rekürrensin izleminde faydalı olacaktır. İkisi de FDA tarafından sistoskopi ile kombinasyon için onaylanmıştır ve yüksek yalancı pozitiflik oranları nedeniyle tek başlarına kullanımı önerilmemektedir (12,13).

NMP-22

NMP (Nuclear Matrix Protein) hücre çekirdeğinin yapısal elemanlarından. Hücre çekirdeğinin yapısal bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur ve DNA replikasyonu ve gen ekspresyonunda görev alır. Tümör hücrelerinde nükleer mitotik aktivite artar ve NMP-22 hücrelerden salınır. Sağlıklı bireylerde idrarda NMP miktarının düşük olduğu ancak mesane tümörlü olgularda normalin 25 katına kadar yükselebildiği bildirilmiştir (14,15).

NMP-22 testi iki antikorlu bir mikroelisa testidir. Araştırmacılar arasında kestirim değeri

konusunda kesin bir görüş birliği yoktur. Duyarlılığı %47-100 arasında değişmektedir. Bu farklılığın sebebi ise tümör büyüklüğü, histolojik derecesi, evre ve farklı kestirim noktalarının kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Özgüllüğü %60-90, pozitif öngörü değeri ise %34-76, negatif öngörü değeri ise %77-98 aralığındadır (16,17). Taş hastalığı, BPH, enflamasyon ve üriner sistem hastalığı bulunanlarda yanlış pozitifliği artmaktadır. Bu koşullar ekarte edilirse spesifitesi %95 civarındadır (18,19). Sistoskopi ile kombinasyonun rekürrens tespitinde %99 başarılı olduğu bildirilmiştir (20).

BLCA-1 ve BLCA-4

BLCA-1 ve BLCA-4 (Bladder Cancer Specific Nuclear Matrix Protein 1-4) transkripsiyon faktörü olup, fazla ekspresyonu hücrenin büyüme hızını arttırır. BLCA-1 sadece malign ürotelyumdan salınıp malign olmayan ürotelyumdan salınmazken, BLCA-4 hem tümörden hem de tümöre komşu alanlardan salınır. Ancak malignite bulunmayan ürotelyumdan BLCA-4 salınımı olmaz (21,22).

BLCA-4'ün idrarda ölçülebilir sensitivitesi %89-96, spesifitesinin de %100'e ulaştığı bildirilmektedir (23,24). BLCA-1'in sensitivitesi %80 ve spesifitesi %87'dir. Her iki belirteç de tümörün histolojik derecesinden etkilenmemektedir. Ayrıca BLCA-4 seviyeleri kataterizasyon, sistit, sigara kullanımı gibi durumlardan etkilenmemektedir (25). Yapılacak geniş serili çalışmalar ve validasyon çalışmaları ile ileride kullanılabilir potansiyel bir tümör belirteci olmaya adaydır.

Survivin

Survivin proteini, apoptoz gen inhibitörüdür. Survivin gen aktivasyonunun idrardaki seviyesi mesane tümör varlığı, nüks, progresyon ve tümör derecesi ile ilişkilidir (26-29). Sensitivitesi %64-100, spesifitesi ise %78-100 arasında değişmektedir (26,30). Ancak düşük dereceli tümörlerin tespitinde yeterince güvenilir (sensitivite %35) değildir (31).

Sitokeratinler

Sitokeratinler hücre iskeleti proteinleridir. Mesane tümörlerinde protein 8, 18, 19, 20 ya da mRNA düzeyinde tümör belirteci olarak kullanılmaktadırlar (15).

UBC testi ile sitokeratin 8 ve 18, CYFRA 21-1 testi ile de sitokeratin 19 tespit edilebilir (15). UBC testinin sensitivitesi %57-83, spesifitesi ise %70-90 arasında değişmektedir (29). CYFRA 21-1 testinin sensitivitesi ise %75-97,

spesifitesi %67-71'dir ve taş hastalığı, üriner enfeksiyonlar, BPH sonucu etkilemektedir (32-34). İdrar sitolojisi ile karşılaştırıldığında UBC test daha düşük sensitivite ve spesifiteye sahiptir (35). Yine BTA-Stat ve BTA-Trak testlerinin sensitivitesi UBC testine göre daha iyidir (32,36).

Hyaluronik asit-hyaluronidaz testi (HA-HAase) testi

Hyaluronik asit ve hyaluronidazın idrardaki miktarını ölçen testtir. Hyaluronik asit hücre adezyon, migrasyon ve proliferasyonunda rol alır. Ayrıca tümör hücrelerini çevreleyerek immün sistemden korunmasını sağlar (37). Hyaluronik asit'in hyaluronidaz tarafından parçalanmasıyla anjiyogenik özelliğe sahip küçük fragmanlar ortaya çıkar ve tümör anjiyogenezinde rol alır. Hyaluronik asit ile tüm derecelerdeki tümörler tespit edilebilirken hyaluronidaz ile sadece yüksek dereceli tümörler tespit edilebilmektedir. Hem hyaluronik asit hem de hyaluronidaz testlerinin kombinasyonu daha iyi sonuçlar vermiştir. Testin sensitivitesi %83-94, spesifitesi ise %77-84 olarak bildirilmiştir (38-39). Tümör rekürrensünün tespit edilmesinde BTA-Stat testine göre daha iyi olduğu bildirilmiştir (10). Ancak özellikle düşük dereceli tümörlerin tespitinde sitolojiye göre başarı oranı düşüktür (40).

Immuncyct

Sitoloji ile bir immünofloresan testin kombin edilmesidir. Bu test ile idrar fikse edilerek eksfoliy hücreler izole edilir ve floresanla işaretlenmiş, mesane tümörü için spesifik olan M344, LDQ10, 19A211 gibi 3 monoklonal antikorla boyanır. Testin sensitivitesi %38-100, spesifitesi ise %75-90 arasında değişmektedir. Duyarlılığındaki değişkenliğin sebebi olarak taranan hasta popülasyonundaki ve testi uygulayan kişiler arasındaki farklılıklar gösterilmektedir (41-43). BPH veya sistitli hastalarda spesifitesi %69-70'e kadar düşebilir (42). Sitolojiye göre düşük dereceli tümörlerde daha yüksek sensitiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (44).

DD23

Bir IgG1 monoklonal antikorunun mesane kanseri hücrelerinde bulunan bir protein dimerini tanıması ile uygulanmaktadır. DD23'ün sensitivitesi ve spesifitesi sırasıyla %80,5 ve 59,7'dir. Sitoloji ile kombine kullanımının düşük dereceli kanserlerin tanısında daha iyi sonuçlar verebileceği bildirilmektedir (45).

Genetik tümör belirteçleri

Mikrosatellit analizleri

Mikrosatellitler kısa, oldukça polimorfik sıralı DNA dizinleridir. Somatik kromozomların maternal ve paternal iki kopyasında farklı sayıda fakat aynı mikrosatellit satelit sayısı mevcuttur. Mesane tümöründe 4p, 8p, 9p, 9q, 11p, 13p, 16q, 17p'de heterozigosite kaybı tespit edilmiştir. Mikrosatellit değişikliklerin tespiti için idrardaki hücrelerden DNA izole edilir ve PCR ile çoğaltılır. Bu teknikle tümör hücre transformasyonundan kaynaklanan genomik değişikliklerde oluşan iki allel arasındaki normal oran kaymaları değerlendirilir. Mikrosatellit DNA analizinin sensitivitesi %72-97, sağlıklı bireylerde spesifitesi %95'in üzerindedir (46,47). Sitoloji ile kombine edildiğinde sensitivitesinin arttığı bildirilmiştir (48). Ancak tek başlarına, özellikle düşük dereceli tümörlerin tespitinde etkinlikleri yeterli değildir (49).

Telomeraz

Telomerler kromozomların sonunda bulunan DNA yapısında tekrarlayan baz dizileridir. Her hücre bölünmesinde telomerler kısalır. Telomerlerin kısalması sonucunda kromozom instabilitesi meydana gelerek hücre ölümüne neden olur. Telomeraz, tekrarlayan telomer dizilerinin sentezinde yer alır ve somatik hücrelerde inaktif olarak bulunur. Enzimin aktivitesindeki değişiklikler hücrenin ölümsüzleşmesine yol açar (50). Telomeraz idrarda iki yöntem ile ölçülebilir. Birincisi TRAP (Telomeric repeat amplification protocol assay), diğeri ise human telomeraz RT-PCR yöntemidir. Her iki test için %7-95 aralığında sensitivite bildirilmektedir. Farklılığın sebebi ise telomeraz ve telomeraz mRNA'sının idrarda stabilitesinin düşüklüğüdür (30 dakikadan kısa). Spesifitesi ise %60-70 civarındadır ve idrar yolu enfeksiyonu ve taş hastalığında azalır (51,52).

Florasan in situ Hibridizasyon (FISH)

Mesane tümöründeki kromozomal anormallikleri idrara dökülen kanser hücrelerinde FISH yöntemi ile tespit etmek mümkündür. FISH testi sitolojideki morfolojik değişiklikler ile moleküler DNA değişikliklerini kombine eden bir testtir. Multitarget multicolor FISH çalışmasının duyarlılığı standart FISH çalışmasına göre daha yüksektir. Urovysion, p16 tümör supresör geninin 9p21 lokus kaybı ile birlikte 3, 7 ve 17. kromozomlardaki anöploidiyi tespit eden multitarget FISH testidir (53). Urovysion ile bildirilen sensitivite %70-100, spesifite ise %90 civarındadır (54).

Sistoskopisi normal ancak FISH testi pozitif hastalarda 12 ay içerisinde pozitif mesane tümörü biyopsisi görüldüğü bildirilmektedir ve FISH testinin stabil olmayan üretelyumu önceden tespit edilemediği şeklinde yorumlanmaktadır (55,56). Ayrıca FISH testinin BCG tedavisinden etkilenmediği hatta BCG tedavisi sonrası FISH pozitif hastalarda erken nüks ihtimalinin arttığı bildirilmiştir (57).

Epigenetik değişiklikler

İdrarda gen metilasyon analizi yapılabileceği gösterilmiştir. Çeşitli gen metilasyonları üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. DAPK, RARbeta ve E-Cadherin metilasyonunun mesane tümörünün idrarda tespitinde iyi sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu rapor edilmiştir (58). Yine TWIST-1 ve NID-2 hipermetilasyonunun %90'ın üzerinde sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu gösterilmiştir.

FGFR3 Mutasyonu

FGFR3 mutasyonu özellikle düşük dereceli tümörlerde yaygındır ve vakaların %85'inde pTa tümörlerde görülür. 9 farklı FGFR3 mutasyonunu tespit eden bir test ile sensitivite %62 olarak belirtilmiştir (59). Yine rekürrenslerin tespiti için yapılan bir çalışmada sensitivitenin %58 ile sitolojiden daha iyi olduğu görülmüştür (60).

İdrarda genetik değişikliklerin saptanması - tek nükleotid polimorfizm değişiklikleri

Pek çok kanser genomik instabilite ile karakterizedir. Kanser hücrelerini saptamanın diğer bir yolu da neoplastik hücrelerden kaynaklanan atipik nükleik asitlerin ortaya çıkarılmasıdır. Heterozigot alleller arasında doğal olarak var olan oranda ortaya çıkan değişiklikleri, genomik delesyonları ve neoplastik hücrelerin karakteristiği olan amplifikasyonları saptayarak, normal hücre ile kanserli hücre ayırt edilebilir. Bu orandaki değişiklikler tek nükleotid polimorfizmi ile saptanabilir (61). Yapılan bir çalışmada mesane tümürlü hastaların idrarında 24 veya daha fazla tek nükleotid polimorfizmi saptanmış ve az miktardaki hücreyi saptamada geleneksel mikrosatellit analize göre daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (62).

Sentrozomal anormallikler

Kromozomların anormal dengelenmesine bağlı anöploidi, kanser hücrelerindeki genetik instabilitenin nedenlerinden birisidir. Anöploidinin, dengeli kromozomal

“Bu tekniklerle anlık moleküler bir profil elde edilir. Bu nedenle verilerin doğru yorumlanabilmesi için, karsinogenezis dinamiklerinin, tümörün kalıtsal heterojenitesinin gözden geçirilmesi gerekir. Ayrıca eksprese edilen genler her zaman işlevsel proteinlerin oluşumuna neden olmazlar.”

ayrışmadan sorumlu organel sentrozomun tam işlev görmemesinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı iddia edilmektedir (61). Sentrozomal anormallikleri saptamak için γ-tubulin immünoassay kullanımının veya kromozomal bozuklukları saptamak için multi-target FISH kullanımının, DNA anöploidisi saptamasından daha basit ve duyarlı testler olabileceği ileri sürülmektedir (63). Düşük dereceli tümörlerde bile önemli oranda sentrozomal bozukluk olduğu göz önüne alınırsa mesane tümörünün tanısında ve progresyonunun tespitinde önemli bir belirteç olabilir (61).

Mesane tümörünün tanısı için çok sayıda genetik marker üzerinde çalışılmıştır. Ancak halen bunların klinik kullanımı konusunda görüş birliği yoktur. Yirmi idrar belirtecinin sitoloji ile karşılaştırıldığı, 54 yayının ve 10.000'in üzerinde hasta verilerinin incelendiği bir meta-analizde tümör belirteçlerinin özellikle düşük dereceli tümörlerde sitolojiye göre daha duyarlı oldukları ancak spesifite konusunda sitoloji kadar değerli olmadıkları sonucuna varmışlardır (64). Yine primer mesane tümörü tanısında kullanımı konusunda yapılan 42 çalışmanın incelenmesi sonucunda sitoloji en spesifik belirleyici iken sensitivitesi en yüksek belirleyici telomeraz olarak bulunmuştur (65).

Tümör belirteçlerinin mesane tümörünün tanısında ve takibinde değişik çalışmalarda farklı sonuçlar vermesi ve yeterli sensitivite ve spesifiteye sahip olmamaları nedeniyle klinik kullanımları kısıtlı kalmıştır. Bu tekniklerle anlık moleküler bir profil elde edilir. Bu nedenle verilerin doğru yorumlanabilmesi için, karsinogenezis dinamiklerinin, tümörün kalıtsal heterojenitesinin gözden geçirilmesi gerekir. Ayrıca eksprese edilen genler her zaman işlevsel proteinlerin oluşumuna

“Kanser gelişiminde ve seyrinde hücre siklusu kontrolü ve hücre metabolizmasının önemli basamaklarında rol alan genlerde meydana gelebilecek olası genetik değişimler aktif rol oynamaktadır. Aynı zamanda bu faktörlerin yanında çeşitli çevresel etkenler de kanser gelişiminde yer almaktadır.”

neden olmazlar. Bu nedenle genetik analizle birlikte, tümör hücrelerindeki proteinlerin de analizi yapılmalıdır. Bazı testlerin idrar sitolojisi ile klinik kullanımı faydalı olabilese de günümüzde halen daha mesane tümörünün tanı ve takibinde altın standart sistoskopi ve sitolojidir.

Mesane tümörünün doğal seyrine etki eden genetik faktörler

Mesane tümörünün doğal seyrini öngörebilmek için genetik ve moleküler belirteçler üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Kanser gelişiminde ve seyrinde hücre siklusu kontrolü ve hücre metabolizmasının önemli basamaklarında rol alan genlerde meydana gelebilecek olası genetik değişimler aktif rol oynamaktadır. Aynı zamanda bu faktörlerin yanında çeşitli çevresel etkenler de kanser gelişiminde yer almaktadır. Günümüzde yüzeysel ve yavaş ilerleyen mesane tümörlerinin oluşumunda genetik yatkınlığın varlığı, agresif ürotelyal karsinomların ve skuamöz hücreli karsinomların çeşitli karsinojenler ve kimyasalların etkisiyle sonradan geliştiği düşünülmektedir.

Ürotelyal karsinomların genetik özelliklerine bakıldığında iki ayrı yolak dikkati çekmektedir. Papiller lezyonlar hiperplazik ürotelyumdan köken alırken, invazif tümörler ise displazik ürotelyumdan gelişmektedir. Papiller tümörler RAF/MEK/ERK ve PIK3CA yolağındaki genlerin değişimi ile ilgili iken, invazif tümörler p53 ve pRb yolağındaki değişimlerle ilgilidir. Her iki yolağın da başlangıcında 9. kromozomda değişimler olduğu düşünülmektedir (66). Çok sayıda kromozomal değişiklik tanımlanmıştır. Özellikle 9. kromozomdaki kayıplar hem yüzeysel hem

de invazif tümörlerde gösterilmişken 3p, 5p ve 17p'deki kayıplar sadece invazif tümörlerde tanımlanmıştır (67).

Mesane tümörünün gelişimi ve seyrini açıklamak için çok sayıda tümör supresör gen, onkogen ve büyüme faktörleri ve reseptörlerini kodlayan gen araştırılmıştır. Bunlar kromozomal anomaliler, DNA mutasyonları, epigenetik değişiklikler, miRNA başlıkları altında incelenebilir.

Kromozomların yapısal ve sayısal anomalileri

Kromozom 9'da gözlenen delesyonlar mesane tümörünün hem invazif formunda hem de yüzeysel formunda gösterilmiştir. Ancak bu durum normal histolojik yapıdaki hücrelerde de gözlemlendiği için hastalığın başlangıç aşamasını gösterdiği düşünülmektedir (68).

Mesane tümörü ve 9. kromozomun uzun kolu arasındaki ilişki etkilenen bölgede farklı tümör baskılayıcı genlerin olabileceğini düşündürmüştür. Özellikle TSC1, PTCH1 ve DBC1 tümör baskılayıcı genlerinin etkili olabileceği gösterilmiştir (69). Yine 9. kromozomun kısa kolunda meydana gelen kayıpların önemli bir bölümü hücre döngüsünü kontrol eden üç farklı proteinin (p16^{INK4A}, p14^{ARF}, p15^{INK4B}) kodlandığı 9p21 bölgesinde olmaktadır (70-72). Bu bölgede bulunan CDKN2A ve CDKN2B tümör baskılayıcı genleri homozigot delesyon ile inaktive olmaktadır ve hücre döngüsünü kontrol eden protein sentezinin durmasıyla kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açmaktadır (73). Heterozigosite kaybı, bir alelin daha önceden inaktive olduğu bir hücrede kalan alelin de normal fonksiyonunu yitirmesi olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmalar kromozom 9'un uzun kolundaki (9q) heterozigosite kaybının kısa koldakilere (9p) oranla daha fazla prognostik değer taşıdığını göstermektedir (74).

Mesane kanserinde görülen diğer kromozomal değişiklikler ise özellikle invazif mesane kanserlerinde görülen 6q, 11p, 18q delesyonları ve 1q, 8q, 17q kazanımlarıdır (75).

DNA dizilim anomalileri

Genomun DNA dizilimindeki değişiklikler mutasyonlar ile ortaya çıkmakta ve işlev kaybına ya da kazanımına yol açmaktadır. Mesane tümörü ile ilişkili en önemli mutasyonlar p53'ün işlev kaybı ve FGFR3'ün işlev kazanımına yol açanlardır (74).

H-RAS mutasyonları: RAS gen ailesi tirozin kinaz reseptörleri ile etkileşim içinde olup

sinyal iletiminde rol oynayan bir proteini kodlar. Tüm RAS geni ürünleri GTPaz aktivitesine ve hücre çoğalmasının kontrolü gibi fonksiyonlara sahiptir (76). RAS geninde sık gözlenen nokta mutasyonları en sık kodon 12 olmak üzere kodon 13 ve 61'de görülür. Sonuçta onkogenik RAS oluşumuna neden olarak hücre çoğalmasının hızlanmasına yol açmaktadırlar. Özellikle kodon 12'de gözlenen nokta mutasyonunun hastalığın kötü prognozu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (77). Yine H-Ras D intronu bölgesindeki 2719. pozisyonda adenin yerine guanin gelmesine sebep olan nokta mutasyon sonucunda Ras geni ürünü olan p21 proteini düzeyinde artış görülmekte ve bu tümörlerin çoğunu da kasa invazif tümörler oluşturmaktadır (78).

FGFR-3 mutasyonları: Daha önce bahsedildiği üzere mesane tümörünün tanısında da kullanılmak üzere araştırılan FGFR-3, embriyolojik gelişim, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, hücre çoğalması ve anjiogenez için önemli olan tirozin kinaz reseptör gen ailesindedir. FGFR-3 aktivasyonu birçok kinaz yolağını tetiklemektedir ve bunlar içinde en önemlisi Ras yolağıdır. Bu nedenle FGFR-3 ve Ras mutasyonlarının karşılıklı etkileşim sonucunda aynı fenotipik değişikliklere yol açtığı düşünülmektedir (79). Düşük dereceli kasa invazif olmayan tümörlerin %70'inden fazlasında FGFR-3 mutasyonu saptanırsa, bu oran invazif tümörlerde sadece %10-20'dir (80). FGFR-3 mutasyonları etkilenen hücrelere büyüme avantajı sağlasa da, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptoz mekanizmaları bozulmamaktadır. Bu nedenle daha yavaş seyreden tümörlerde daha sık görüldüğü söylenebilir. Kas invazif tümörlerde ise apoptoz mekanizmalarının da bozulduğu p53 mutasyonu gibi değişiklikler daha sık görülmektedir (74).

p53 işlev kaybı: Kromozom 17p13 yerleşiminde olan p53 geni, hücre döngüsünün durdurulması için yaşamsal öneme sahip bir proteini kodlayan tümör supresör genidir. DNA hasarlanması saptandığında hücre döngüsünü durdurmak için p53 protein düzeyi artar. Böylece DNA tamirine olanak sağlanarak hatalı DNA sentezi önlenir (81). p53 gen mutasyonu vahşi tip proteinden daha uzun yarılanma ömürlü işlev bozukluğu olan proteinlerin üretilmesine yol açar ve mutant p53 gen ürünlerinin hücre çekirdeğinde birikimine neden olur (82).

Kromozom 17p kaybı ve p53 mutasyonları kasa invazif tümörlerde, yüzeysel tümörlere göre daha sık görülmektedir. Ancak yüzeysel tümörlerde p53 mutasyonu varlığı

önemlidir. p53 mutasyonu görülen yüzeyel tümörlerde nüks daha siktir (83).

Nükleer p53 birikiminin BCG tedavisi sonrası progresyonu öngörmeye önemli olduğu bildirilmektedir (84). Yine radikal sistektomi uygulanan hastalarda p53 ekspresyonundaki değişim hastalık nüksünü önemli oranda arttırmakta ve vahşi tip p53 ekspresyonu olan hastalarla karşılaştırıldığında yaşam süresini kısaltmaktadır (85).

Tüm bunlara karşılık tümör evresi ve histolojik grade ile karşılaştırıldığında p53'ün immünohistokimyasal olarak saptanmasının hastalığın doğal seyrini öngörmeye yönelik ek katkı sağlamadığını bildiren çalışmalar da vardır (86-88).

Çok sayıda yapılan çalışmaya rağmen p53'ün prognozu öngörmeye rolü henüz net olarak tanımlanamamıştır. Çalışmalar arasındaki çelişkilerin sebebi immunohistokimyasal olarak seçilen antikörlerin ve kullanılan eşik değerlerin çeşitliliğidir. Aynı zamanda boyanmanın yetersiz olduğu durumlarda yorumlayıcılar arasındaki görüş farklılığı bir diğer neden olarak sayılabilir (89).

Rb işlev kaybı: Kromozom 13q14 yerleşiminde bulunan Rb geni, hücre döngüsünün ilerlemesini G1/S noktasında engelleyen bir fosfoprotein kodlanmasından sorumludur (90). Ortaya çıkan mutasyonlar sonucunda p53 mutasyonlarına benzer şekilde hücre döngüsünün kontrolü kaybolur. Defosforilize haldeyken aktif, fosforilize edildiğinde ise inaktif hale geçer. pRb inaktivasyonu fosforilasyonu katalizleyen siklinler tarafından gerçekleştirilirken, Cdk inhibitörleri (p21^{WAF1/Cip1}, p16^{INK4A}, p27^{Kip1}) Cdk/Cyclin kompleksini inhibe ederek pRb'nin fosforilasyonunu önlerler (91-93). Rb değişimleri yüksek derece ve evredeki tümörlerde sıklıkla bulunur (94). Rb kaybı bulunmayan hastalarda evreden bağımsız olarak genel yaşam süresi Rb kaybı bulunanlara göre daha uzundur (95). Ayrıca hem p53 hem de Rb yolağında değişiklikler saptanan hastalarda, saptanmayanlara göre rekürrens ve progresyon daha fazla görülür ve sağkalım süreleri daha kısadır (96).

Epigenetik değişiklikler: DNA metilasyonu tümör gelişiminde ve progresyonunda rol oynayan önemli bir epigenetik mekanizmadır. DNA promotör bölgesindeki sitozin-guanin adacıklarında DNA metiltransferaz enzimi tarafından katalize edilen

“... hücre döngüsünü kontrol eden proteinler, anjiyogeneze etki eden moleküller ve genetik değişimler, gelecekte mesane kanserinin doğal seyrini ve tümörün uygulanacak tedavilere vereceği yanıtı daha güvenilir biçimde öngörmeye rol oynayabileceklerdir.”

bir reaksiyonla tümör supresör genlerde transkripsiyon durmakta ve gen sessiz hale geçmektedir. Bu mekanizmanın tümör gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Genomun düzenleyicisi olan promotör bölgedeki anormal hipermetilasyon hastalığa özgü olabilecek bazı tümör supresör genler, proto-onkogenler, hücre adezyonunu ve hücre siklusunu düzenleyen genlerde hipermetilasyon araştırılmaktadır. RUNX-3 metilasyonun tümör oluşumunda ve hatta sigara içiminde semptomlar ortaya çıkmadan önce risk altındaki popülasyonu belirlediği öne sürülmüştür (97). TIMP-3 metilasyonun hastalığın progresyonu ve hasta prognozu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (98). Literatürde CDH-1, RASSF1A gibi genlerdeki hipermetilasyonun yüksek tümör grade' i ile, APAF-1, IGFBP3, p16^{INK4A}, p14^{ARF} metilasyonunun tümör rekürrensi ile RUNX-3, Myopodin metilasyonunun da tümör progresyonu ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (99-104).

DNA hipometilasyonu da mesane kanseri gelişiminde önemli rol oynamaktadır. DNA'nın bölgesel metilasyonu, gereksiz genetik aktivitenin artmasını kontrol eden bir savunma mekanizmasıdır. Bu mekanizma demetilasyon veya hipometilasyon ile düzenlenmektedir. Mesane tümöründe HPSA gen hipometilasyonunun normal üroepitele oranla daha yüksek olduğu bildirilmektedir (105).

Mikro-RNA regülasyon kaybı: Mikro RNA'lar gen ekspresyonu ile ilgili RNA parçalarıdır ve bu RNA'ların aşırı üretimi farklı genler üzerine etki ederek tümör oluşumuna katkıda bulunabilir. Mikro-RNA'ların bir kısmı tümör baskılayıcı gen özelliğine sahipken diğer bir bölümü onkogen olarak davranmaktadır. Düşük dereceli tümörlerde

birçok mikro-RNA molekülünün ekspresyonunda azalma saptanırken, yüksek dereceli tümörlerde düzeylerinde artış saptanmakta ve p53 işlevinde baskılanmaya yol açmaktadır (106).

Diğerleri

AKT1 ve PIK3CA mutasyonları: PIK3CA geni 3q26.3 kromozomunda lokalizedir. PIK3CA geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda PIK3CA'nın enzimatik aktivitesi artmakta ve AKT yolağının anormal aktivasyonu gerçekleşmektedir ve hastalığın kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir (107).

PTEN mutasyonları: Kas invazif mesane tümörlerinin yaklaşık %50'sinde 10. kromozomunun uzun kolunda heterozigotluk kaybı gözlenmektedir. PTEN geni 10q23.3 bölgesinde lokalize ve tümör supresör bir genidir. Pek çok kanser türünde PTEN geninde mutasyon saptanmıştır. İnvazif mesane tümörlerinde yaklaşık %50 oranında PTEN mutasyonu bildirilmektedir. PTEN mutasyonlarının daha çok invazif nitelikteki ve kötü prognozlu kas invazif mesane tümörlerinde görüldüğü belirtilmektedir (108,109).

Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi: Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi, hücre çoğalması, farklılaşması, invazyon ve metastaz gibi pek çok hücre fonksiyonundan sorumludurlar. Mesane tümörlerinde epidermal büyüme faktörlerini kodlayan genlerde mutasyonların varlığı saptanmış ve prognoz ile ilişkili olduğu söylenmektedir (110).

Myc Gen Ailesi: Kromozom 8q bölgesinde bir onkogen olan myc gen kopya sayısının artımı mesane tümörlerinde sık gözlenen bir değişimdir. Bu değişim hastalığın daha agresif bir nitelik kazanması ile sonuçlanmaktadır (111).

Halen mesane tümörünün doğal seyrini öngörebilmek için gen ve genlerin ürünleri olan proteinler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Umut verici bulgular olmasına rağmen henüz sonuçlar yeterli değildir. Bununla beraber, hücre döngüsünü kontrol eden proteinler, anjiyogeneze etki eden moleküller ve genetik değişimler, gelecekte mesane kanserinin doğal seyrini ve tümörün uygulanacak tedavilere vereceği yanıtı daha güvenilir biçimde öngörmeye rol oynayabileceklerdir.

Kaynaklar

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006;56:106-130.
2. Juan Rosai. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. New York, Mosby, 2004;1330-31.
3. Wiener HG, Mian C, Haitel A et al. Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer?. *J Urol* 1998;159:1876-80.
4. Konety BR, Metro MJ, Melham MF et al. Diagnostic value of voided urine and bladder barbotage cytology in detecting transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Urol Int* 1999;62:26-30.
5. Brown FM, Urine cytology: It is still the gold Standard for screening? *Urol. Clin. North Am* 2000;27:25-37.
6. Poulakis V, Witzsch U, De Vries R et al. A comparison of urinary nuclear matrix protein-22 and bladder tumour antigen tests with voided urinary cytology in detecting and following bladder cancer: the prognostic value of false-positive results. *BJU Int*. 2001;88:692-701.
7. Leyh H, Marberger M, Conort P, et al. Comparison of the BTA-Stat test with voided urine cytology and bladder wash cytology in the diagnosis and monitoring of bladder cancer. *Eur Urol* 1999;35:52-6.
8. Leyh H, Mazeman E. Bard BTA test compared with voided urine cytology in the diagnosis of recurrent bladder cancer. *Eur Urol* 1997;32:425-8.
9. Boman H, Hedelin H, Jacobsson S, et al. Newly diagnosed bladder cancer: the relationship of initial symptoms, degree of microhematuria and tumor marker status. *J Urol* 2002;168:1955-59.
10. Lokeshwar VB, Schroeder GL, Selzer MG, et al. Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-Stat tests. *Cancer* 2002;95(1):61-72.
11. Mungan NA, Atan A, Tekdoğan ÜY et al. Mesane kanserinin tespitinde BTA testi ile idrar sitolojisini tanısal değerinin karşılaştırılması. *Türk Üroloji Dergisi* 2002;28(3):276-280.
12. Thomas L, Leyh H, Marberger M, et al. Multicenter trial of quantitative BTA-TRAK assay in the detection of bladder cancer. *Clin Chem* 1999;45:472-77.
13. Tsihlias J, Grossman HB. The utility of fibrin/fibrinogen degradation products in superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2000;27:39-46.
14. Zippe C, Pandrangi L, Potts JM, et al. NMP-22: a sensitive, cost cost effective test in patients at risk for bladder cancer. *Anticancer Res* 1999;19:2621-23.
15. Baltacı S, Gökçe İ. Ürolojide tümör belirleyicileri. *Türkeri L, Özer A, Narter F eds. Moleküler Üroloji*. 2012;20:365-78.
16. Serretta V, Lo Presti D, Vasile P, et al. Urinary NMP-22 for the detection of recurrence after transurethral resection of transitional cell carcinoma of the bladder: experience on 137 patients. *Urology* 1998;52:793-96.
17. Ponsky LE, Sharma S, Pandrangi L, et al. Screening and monitoring for bladder cancer: refining the use of NMP-22. *J Urol* 2001;166:75-78.
18. Sharma S, Zippe CD, Pandrangi L, et al. Exclusion criteria enhance the specificity and positive predictive value of NMP-22 and BTA stat. *J Urol* 1999;162:53-57.
19. Sanchez-Carbayo M, Herrero E, Megias J, et al. Evaluation of nuclear matrix protein 22 as a tumour marker in the detection of transitional cell carcinoma of bladder. *BJU Int* 1999;84:706-713.
20. Grossman H.B, Soloway M, Messing E, et al. Surveillance for recurrent bladder cancer using a point of care proteomic assay. *JAMA* 2006;295:299-305.
21. Myers-Irvin JM, Landsittel D, Getzenberg RH. Use of the novel marker BLCA-1 for the detection of bladder cancer. *J Urol* 2005;174:64-68.
22. Konety BR, Nguyen TS, Dhir R, et al. Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4. *Clin Cancer Res* 2000;6:2618-25.
23. Van Le TS, Miller R, Barder T, Babjuk M, et al. Highly specific urine-based marker of bladder cancer. *Urology* 2005;66:1256-60.
24. Van Le TS, Myers J, Konety BR, et al. Functional characterization of the bladder cancer, BLCA-4. *Clin Cancer Res* 2004;10:1384-91.
25. Konety BR, Nguyen TS, Brenes G, et al. Clinical usefulness of the novel marker BLCA-4 for the detection of bladder cancer. *J Urol* 2000;164:634-39.
26. Schultz IJ, Kiemeny LA, Karthaus HF, et al. Survivin mRNA copy number in bladder washings predicts tumor recurrence in patients superficial urothelial cell carcinomas. *Clin Chem* 2004;50:1425-8.
27. Shariat SF, Casella R, Khoddami SM, et al. Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer. *J Urol* 2004;171:626-30.
28. Smith SD, Wheeler MA, Plescia J, et al. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *JAMA* 2001;285:324-8.
29. Weikert S, Christoph F, Schrader M, et al. Quantitative analysis of survivin mRNA expression in urine and tumor tissue of bladder cancer patients and its potential relevance for disease detection and prognosis. *Int J Cancer* 2005;116:100-4.
30. Sanchez-Carbayo M, Ciudad J, Urrutia M, et al. Diagnostic performance of the urinary bladder carcinoma antigen ELISA test and multiparametric DNA/cytokeratin flow cytometry in urine voided samples from patients with bladder carcinoma. *Cancer* 2001;92:2811-19.
31. Horstmann M, Bontrup H, Hennenlotter J, et al. Clinical experience with survivin as a biomarker for urothelial bladder cancer. *World J Urol* 2010;28:399-404.
32. Mian C, Lodde M, Haitel A, et al. Comparison of two qualitative assays, the UBC-Rapid test and the BTA-Stat test, in the diagnosis of urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2000;56(2):228-31.
33. Pariente JL, Bordenave L, Jacob F, et al. Analytical and prospective evaluation of urinary cytokeratin 19 fragment in bladder cancer. *J Urol* 2000;163:1116-69.
34. Retz M, Lehmann J, Amann E, et al. Mucin 7 and cytokeratin 20 as new diagnostic urinary markers for bladder tumor. *J Urol* 2003;169:86-89.
35. Hakenberg OW, Fuessel S, Richter K, et al. Qualitative and quantitative assessment of urinary cytokeratin 8 and 18 fragments compared with voided urine cytology in diagnosis of bladder carcinoma. *Urology* 2004;64:1121-6.
36. Babjuk M, Kostirova M, Mudra K, et al. Qualitative and quantitative detection of urinary human complement factor H-related protein (BTA-Stat and BTA-Trak) and fragments of cytokeratin 8 and 18 (UBC rapid and UBC IRMA) as markers for transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2002;41:34-9.
37. Knudson W. Tumor associated hyaluronan: providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am J Pathol* 1996; 148 (6): 1721-26.
38. Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:581-6.
39. Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol* 2000;163:348-56.
40. Hautmann S, Toma M, Lorenzo Gomez MF, et al. Immunocyt and the HA-HAase urine tests for the detection of bladder cancer: a side-by-side comparison. *Eur Urol* 2004;46:466-71.
41. Mian C, Pycha A, Wiener H, et al. Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *J Urol* 1999;161:1486-89.
42. Olsson H, Zackrisson B. Immunocyt: a useful method in the follow-up protocol for patients with urinary bladder carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 2001;35:280-2.
43. Lodde M, Mian C, Negri G, et al. Role of uCyt in the detection and surveillance of urothelial carcinoma. *Urology* 2003;61:243-247.
44. Pfister C, Chautard D, Devonec M, et al. Immunocyt test improves the diagnostic accuracy of urinary cytology: results of a French multicenter study. *J Urol* 2003;169:921-4.
45. Sözen S. Mesane kanserlerinde tümör belirleyicileri. *Haluk Özener, Levent Türkeri ed. Mesane Kanserlerinde Tümör Belirleyiciler. Üroonkoloji Kitabı* 2007. Cilt 1:185-190.
46. Sengelov L, Christensen M, von der Maase HD, Horn T, Marcussen N, Kamby C, Orntoft T. Loss of heterozygosity at 1p, 10p, 13q and 17p in advanced urothelial cancer and lack of relation to chemotherapy response and outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 123 (2): 109-13.
47. Utting M, Werner W, Dahse R, Schubert J, Junker K. Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8 (1):35-40.
48. Wild PJ, Fuchs, T, Stoehr, et al. Detection of urothelial bladder cancer cells in voided urine can be improved by a combination of cytology and standardized microsatellite analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009, 18, 1798-1806.
49. Roupert M, Hupertan V, Yates DR, et al. A comparison of the performance of microsatellite and methylation urine analysis for predicting the recurrence of urothelial cell carcinoma, and definition of a set of markers by Bayesian network analysis. *BJU Int* 2008;101:1448-53.
50. Bavaccini, S., Casadio, V., Amadori, D., Calistri, D., and Silvestrini, R. The current role of telomerase in the diagnosis of bladder cancer. *Indian J. Urol* 2005, 25, 40-46.
51. Kavalier E, Landman J, Chang Y, et al. Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer* 1998; 82 (4): 708-14.
52. Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Koshida K, Namiki M, Inoue M. Detection of human telomerase reverse transcriptase Messenger RNA in voided urine samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4 (11): 2807-10.
53. Junker K, Boerner D, Schulze W, Utting M, Schubert J, Werner W. Analysis of genetic alterations in normal bladder urothelium. *Urology* 2003;62:1134-8.
54. Friedrich MG, Toma MI, Helstern A, et al. Comparison of multitarget fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer. *BJU Int* 2003;92(9):911-4.
55. Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J Urol* 2003;169:2101-5.
56. Gofrit ON, Zorn KC, Silvestre J, et al. The predictive value of multitargeted fluorescent in-situ hybridization in patients with history of bladder cancer. *Urol Oncol* 2008;26:246-9.

57. Kipp BR, Karnes RJ, Brankley SM, et al. Monitoring intravesical therapy for superficial bladder cancer using fluorescence in situ hybridization. *J. Urol.* 2005; 173, 401-404.
58. Phe V, Cussenot O, Roupre't M. Interest of methylated genes as biomarkers in urothelial cell carcinomas of the urinary tract. *BJU Int* 2009;104:896-901.
59. Van Oers JM, Lurkin I, van Exsel AJ, et al. A simple and fast method for the simultaneous detection of nine fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder cancer and voided urine. *Clin Cancer Res* 2005;11:7743-8.
60. Zuiverloon TC, van der Aa MN, van der Kwast TH, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation analysis on voided urine for surveillance of patients with low-derece nonmuscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:3011-8.
61. Quek ML, Sanderson K, Daneshmand S, et al. New molecular markers for bladder cancer detection. *Curr Opin Urol* 2004;14:259-264
62. Hoque MO, Lee J, Begum S, et al. High-throughput molecular analysis of urine sediment for the detection of bladder cancer by high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer Res* 2003;63:5723-6
63. Jiang F, Caraway NP, Sabichi AL, et al. Centrosomal abnormality is common in and a potential biomarker for bladder cancer. *Int J Cancer* 2003;106:661-5
64. Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 2003;61(1):109-118
65. Glas AS, Roos D, Deutekom M, et al. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J Urol* 2003;169(6):1975-82
66. Baffa R, Letko J, McClung C, et al. Molecular genetics of bladder cancer: targets for diagnosis and therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006;25(2):145-60.
67. Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T, et al. Infiltrating urothelial carcinoma. In: Eble NJ, Sauter G, Epstein JI, et al. *World Health Organization Classification of Tumours, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* France, Lyon, 2004; 90-109.
68. Abraham R, Pagano F, Gomella L, et al. Chromosomal deletions in bladder cancer: shutting down pathways. *Front. Biosci.* 2007;12:826-838.
69. Pollard C, Smith SC, Theodorescu D. Molecular genesis of non-muscle invasive urothelial carcinoma (NMIBC). *Expert Rev Mol Med.* 2010;25:12:e10.
70. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochem Biophys Acta.* 1998;1378:115-117.
71. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA et al. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995;83:993-1000.
72. Hirai H, Roussel MF, Kato JY, et al. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK 6. *Molecular Cellular Biology.* 1995;15:2672-2681.
73. Chapman E, Harriden P, Chambers P, et al. Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11:5740-5747.
74. Tinay İ, Türkeri L. Mesane Kanseri Moleküler Süreç ve Tedavileri. Türkeri L, Özer A, Narter F eds. *Moleküler Üroloji.* 2012;23:411-421.
75. Chan M, Hui A, Yip S, et al. Progressive increase of genetic alteration in urinary bladder cancer by combined allelotyping analysis and comparative genomic hybridization. *Int J Oncol* 2009 ;34:963-970.
76. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827.
77. Buyru N, Tigli H, Ozcan F, Dalay N. Ras oncogene mutations in urine sediments of patients with bladder cancer. *J Biochem Mol Biol.* 2003;36(4):399-402.
78. Czerniak B, Cohen GL, Etkind P, et al. Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the H-ras gene in urinary bladder carcinomas. *Hum Pathol* 1992;23:1199-204.
79. Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, et al. FGFR-3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:5218-25.
80. Lacy S, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, et al. Molecular pathogenesis of urothelial carcinoma: the clinical utility of emerging new biomarkers and future molecular classification of bladder cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 2009;31:5-16.
81. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-16.
82. Esrig D, Spruck CH 3rd, Nichols PW, et al. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade and stage in bladder cancer. *Am J Pathol.* 1993;143:1389-1397.
83. Ecke T, Sachs M, Lenk S, et al. TP53 gene mutations as an independent-marker for urinary bladder cancer progression. *Int J Mol Med* 2008;21:655-661.
84. Toktas G, Türkeri LN, Unluer E, et al. Clinical significance of nuclear p53 protein accumulation in bladder cancer. *Int Urol Nephrol* 1999;31(3):327-34.
85. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *1994;331:1259-1264.*
86. Shiina H, Igawa M, Nagami H, et al. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen, p53 protein and nuclear DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1996;78:1762-1774.
87. Pfister C, Buzelin F, Casse C, et al. Comparative analysis of MiB1 and p53 expression in human bladder tumors and their correlation with cancer progression. *Eur Urol* 1998;33:278-284.
88. Pfister C, Moore L, Allard P, et al. Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21 and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence. *Clin Cancer Res* 1999;5:4079-4084.
89. Çal Ç. Mesane Kanseri Doğal Seyrinin Moleküler Mekanizmaları. Özen H., ent Türkeri ed. *Üroonkoloji Kitabı* 2007 Cilt 1. 13:159-172.
90. Bookstein R, Lee EY, To H, et al. Human retinoblastoma susceptibility gene: genomic organisation and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:2210-2214.
91. Mihara K, Cao XR, Yen A, et al. Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 1989;246:1300-1303.
92. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-1677.
93. Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000;100:71-78.
94. Xu HJ, Cairns P, Hu SX, et al. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer* 1993;53:781-784.
95. Cordon-Cardo JC, Wartinger D, Petrylak D, et al. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1251-1256.
96. Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, et al. Combined effects of p53, p21 and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:1007-1013.
97. Erika M. Wolff, Gangning Liang, Connie C. Cortez et al. RUNX-3 methylation reveals that bladder tumours are older in patients with a history of smoking. *Cancer Res* 2008; 68(15): 6208-14.
98. Mohammad Obaidul Hoque, Shahnaz Begum, Mariana Brait et al. TIMP-3 promoter methylation is an independent prognostic factor for bladder cancer. *J Urol* 2008;179:743-747.
99. Horikawa Y, Sugano K, Shigyo M, et al. Hypermethylation of an E-cadherin (CDH-1) promoter region in high grade transitional cell carcinoma of the bladder comprising carcinoma in situ. *J Urol* 2003;169:1541-5.
100. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001;61:8659-63.
101. Frank C, Steffen W, Carsten K, et al. Regularly methylated novel pro-apoptotic genes associated with recurrence in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer* 2006;119:1396-1402.
102. Ken K, Hideki E, Takenari G, et al. p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *BBRC* 2006;339:790-796.
103. Eun-Jung K, Yong-June K, Pildu J, et al. Methylation of the RUNX-3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. *J Urol* 2008;180:1141-1145.
104. Miguel A, Virginia C, Jesus M.F, et al. Myopodin methylation is associated with clinical outcome in patients with T1G3 bladder cancer. *J Urol* 2010;184:1507-1513.
105. Ogishima T, Shiina H, Breault JE, et al. Promoter CpG hypomethylation and transcription factor EGR1 hyperactivate heparanase expression in bladder cancer. *Oncogene* 2005;24:6765-6772.
106. Catto JW, Miah S, Owen HC, et al. Distinct microRNA alterations characterize high and low grade bladder cancer. *Cancer Res* 2009;69:8472-81.
107. Meng Q, Xia C, Fang J, et al. Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. *Cell Signal.* 2006;18(12):2262-71.
108. Cairns P, Evron E, Okami K, et al. Point mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 in primary bladder cancers. *Oncogene.* 1998;16(24):3215-8.
109. Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, et al. Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br J Cancer.* 1999;80(5-6):904-8.
110. Chow NH, Chan SH, Tzai TS, et al. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res.* 2001;7(7):1957-62.
111. Sardi I, Dal Canto M, Bartoletti R, et al. Molecular genetic alterations of c-myc oncogene in superficial and locally advanced bladder cancer. *Eur Urol.* 1998;33(4):424-30.