



T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

MESANE İNFİLTRATİF ÜROTELYAL  
KARSİNOMLARINDA *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*  
MUTASYON ANALİZİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. ŞEYMA BÜYÜCEK

Konuralp Kampüsü

DÜZCE-2021





T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MESANE İNFİLTRATİF ÜROTELYAL  
KARSİNOMLARINDA *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*  
MUTASYON ANALİZİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. ŞEYMA BÜYÜCEK

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. BİNNUR ÖNAL

DR. ÖĞR. ÜY. SİNEM KANTARCIOĞLU COŞKUN

Konuralp Kampüsü

DÜZCE-2021

## TEŞEKKÜR

Patoloji ihtisasım süresince engin bilgi ve deneyimlerini paylaşan, bilimsel olarak her türlü desteği sağlayan, geniş bakış açısı ile yol gösteren değerli anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Binnur Önal'a, özverili mesleki yaklaşımı, araştırmacı ufku ve öğretim sevgisi ile hekimlik hayatıma değer katan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet Gamsızkan'a, her daim nezaket ve hoşgörüsü ile yanımda olduğunu hissettiğim, patoloji eğitimimde büyük katkısı olan değerli hocam, tez danışmanım Dr. Öğr. Üy. Sinem Kantarcıoğlu Coşkun'a,

Tezimin değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Sevgiye Kaçar Özkara ve Dr. Öğr. Üyesi Cem Horozoğlu'na,

Tezimin uygulama aşamasında teknik ve teorik kısımlarında yardımcı olan Biyolog Abdurrahman Demir'e, Moleküler Biyolog Ahmet Varış'a ve Msc Biyolog Hüseyin Karacan'a,

Tezimin istatistiksel analizini yapan sevgili hocam Doç. Dr. Şengül Cangür'e, klinik verilerin derlenmesi konusunda yardımcı olan Doç. Dr. Onur Eşbah'a,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan keyif aldığım teknisyen arkadaşlarım Asiye Kasapoğlu, Murat Süzen, Feride Yılmaz, Ayşe Pekcan Çelebioğlu ve Beyda Aktepe'ye, arşiv görevlimiz Kübra Kurnaz'a, değerli sekreterimiz Gülçin Şahin'e ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma,

Beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum, zorlu günlerde desteklerini hissettiğim yol arkadaşlarım Dr. Aslı Naldemir ve Dr. Atike Bahcivan'a, aramıza son dönemlerde katılan, kısa sürede uyum sağlayan Dr. Ayşegül Ceyhan ve Dr. Sena Şık'a,

Destek ve güvenlerini her an hissettiğim, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim çok kıymetli aileme teşekkür ederim.

## ÖZET

**Amaç:** Mesane kanseri, genitoüriner sistemde prostattan sonra en sık görülen kanserdir ve dünyadaki kanserler arasında en yaygın 7. kanserdir. Dünyada ve Türkiye’de erkeklerde sıklığı belirgin olarak yüksektir ve Türkiye’de erkeklerde gözlenen en sık 4. kanserdir. Mesane kanserleri invaziv-olmayan ve infiltratif ürotelyal karsinom (İÜK)’lar olarak iki gruba ayrılmaktadır. İÜK’da daha agresif tedavi yöntemleri (sistektomi, kemoterapi) uygulanmakta ve evrede ilerleme, metastaz sık görülmektedir. Bu bağlamda İÜK’da yeni tedavi yöntemleri geliştirmek, moleküler yolların keşfi önem kazanmaktadır. Moleküler analizler, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinde yol gösterici olmuştur. Hücre büyümesinde tirozin-reseptör-kinazın sinyal yolağında; *RAS-BRAF-MEK-ERK* ve *PIK3CA-PTEN-AKT* kaskadlarının onkogenlerinin mutasyona uğraması kanser gelişmesine yol açmaktadır. Çalışmamızda İÜK’da *PIK3CA*, *KRAS* ve *BRAF* mutasyonlarının analizini amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** DÜTF Patoloji ABD’da tanı alan 24 İÜK çalışmaya dahil edildi. İÜK olguları diferansiasyon (glandüler, sarkomatoid vb) gösteren/göstermeyen olarak ayrıldı. Dokulardan parafinin ayrıştırılması sonrası DNA ekstraksiyonu yapıldı. İzole DNA, RANDOX cihazı biyoçip dizilerine konularak *KRAS*, *PIK3CA* ve *BRAF* mutasyon analizi yapıldı. Mutasyon sıklıkları olguların demografik, histopatolojik, klinik bulguları ile karşılaştırıldı; genel/hastaliksız sağkalım oranları, aldıkları kemoterapi türü/sayısı ve TNM evresine göre değerlendirildi.

**Bulgular:** İÜK vakalarının ortalama tanı yaşı 70.1 olup erkek/kadın:11/1’dir. İÜK olgularının %33.3’ünde *KRAS*, %12.5’inde *PIK3CA*, %8.3’ünde *BRAF* mutasyonu saptanmıştır. Çoğunluğu gemsitabin+sisplatin olmak üzere 14 hasta kemoterapi tedavisi görmüştür. Tümörlerin %79,1’i evre 2’de tanı almıştır ve histopatolojik incelemede eşlik eden in-situ karsinom (n:8), nekroz (n: 13), lenfovasküler invazyon (n: 12) ve perinöral invazyon (n: 10) saptanmıştır. Mutasyon glandüler, sarkomatoid ve skuamöz diferansiasyonlu olgularda mevcut iken mikropapiller ve berrak hücre diferansiasyonlu olgularda saptanmamıştır. Histopatolojik özelliklerin mutasyon analizi ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç gözlenmedi. Bu

çalışmada yapılan analizlere göre (*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*) olguların sağkalım oranları arasında fark görülmedi.

**Tartışma:** Tümörlerin moleküler karakterlerinin belirlenmesi, hedeflenen tedavi algoritmalarının oluşturulmasında ve uygun hastanın seçilmesinde bir kılavuzdur. Reseptör tirozin kinaz yolu, tümörlerde en sık mutasyona uğrayan yollardan biridir.

**Sonuç:** Mesane kanseri olan hastaların tedavisine yön verebilecek mutasyon profillerini bulmak için daha geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, bunların prognoza etkisinin daha geniş serilerde araştırılması gerekir.

**Anahtar kelimeler:** İnfiltratif ürotelyal karsinom, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*

## ABSTRACT

**Aim:** Bladder cancer is the most common cancer of the genitourinary system after prostate and 7th most common cancer among the cancers in the world with obvious male predominance. Urothelial tumors are divided into two major groups according to their molecular pathogenesis: Non-muscle invasive (pT0, pT1) and infiltrating urothelial carcinomas (IUC) (pT2-pT4). Since, IUC tend to progress and metastasize, more aggressive treatment (cystectomy, chemotherapy) is applied. Therefore, the discovery of molecular pathways to develop new treatment methods, especially in invasive bladder cancers is important. Based on the new discoveries at bladder cancers, we aimed to define mutations seen on receptor tyrosine kinase pathway (*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*).

**Material and Method:** A total of 24 cases of IUC from the archive of Düzce University School of Medicine, Department of Pathology & Cytology were included. IUC cases were divided into two categories according to whether there is divergent differentiation or not. Appropriate tumor area was detected on microscopic examination and macro-dissected from the paraffin-embedded samples for the mutational analysis. Respectively, DNA extraction and PCR amplification was done. PCR products were placed in RANDOX device biochip sequences and *KRAS*, *PIK3CA* and *BRAF* mutation analysis was performed. Results of the analysis were compared with the clinical, demographic and histopathological findings. Survival rates were evaluated according to the mutations and chemotherapy regimens.

**Results:** The mean age at diagnosis of IUC cases was 70,2 and male / female ratio was 11/1. Fourteen patient had received chemotherapy including mostly gemsitabin+sisplatin regimens. Histopathological examination revealed in-situ component (n:8), necrosis (n:13), lymphovascular invasion (n:12) and perineural invasion (n:10). Most of the cases were diagnosed at stage 2 (79,1%). *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF* mutations were detected in 33,3%, 12,5%, 8,3% of cases, respectively. While several mutations were present in cases with glandular, sarcomatoid and squamous differentiation, there was no mutation in cases with micropapillary and clear cell differentiation. No statistically significant results could be obtained in the comparison

of histopathologic properties and mutation analysis. No difference was seen between the survival rates of the cases when compared according to their analysis done in this study (*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*).

**Discussion:** The determination of the molecular characters of tumors is a guide in the creation of targeted treatment algorithms and in choosing the appropriate patient. The receptor tyrosine kinase pathway is one of the most frequently mutated pathways in tumors.

**Conclusion:** Studies with larger series are needed to find out the mutation profiles that may guide the treatment of patients with bladder cancer. Also, their impact to prognosis need to be investigated in larger series.

**Keywords:** Infiltrating Urothelial Carcinoma, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*

## İÇİNDEKİLER

Sayfalar

TEŞEKKÜR .....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mesane Embriyolojisi.....	3
2.2. Mesane Anatomisi.....	4
2.3. Mesane Histolojisi.....	6
2.4. Mesane Kanseri Epidemiyolojisi.....	7
2.5. Mesane Kanserinde Etiyoloji ve Risk Faktörleri.....	8
2.6. Mesane Kanserinde Prognostik Faktörler.....	9
2.7. Mesane Tümörlerinin Sınıflaması.....	11
2.7.1. Ürotelyal tümörler.....	12
2.7.1.1. İnfiltratif ürotelyal karsinom.....	12
2.7.1.1.1. Farklı diferansiasyonlu infiltratif ürotelyal karsinom.....	13
2.7.1.1.2. Skuamöz diferansiasyon.....	13
2.7.1.1.3. Glandüler diferansiasyon.....	14
2.7.1.1.4. Trofoblastik diferansiasyon.....	14
2.7.1.1.5. Nested varyant.....	14
2.7.1.1.6. Mikrokistik varyant.....	14
2.7.1.1.7. Mikropapiller varyant.....	15
2.7.1.1.8. Lenfoepitelyoma benzeri varyant.....	15
2.7.1.1.9. Plazmositoid/ taşlı yüzük hücreli/ difüz varyant.....	15
2.7.1.1.10. Sarkomatoid varyant.....	16
2.7.1.1.11. Dev hücreli varyant.....	16
2.7.1.1.12. Yağdan zengin varyant.....	17
2.7.1.1.13. Berrak hücreli (glikojenden zengin) varyant.....	17

2.7.1.1.14. Kötü diferansiye tümörler .....	17
2.8. Kanser Gelişiminin Moleküler Temeli.....	17
2.9. Mesane Kanseri ve Reseptör Tirozin Kinaz Yolağı.....	23
2.9.1. <i>KRAS</i> .....	24
2.9.2. <i>BRAF</i> .....	26
2.9.3. <i>PIK3CA</i> .....	29
2.10. Mesane Kanserinde Tanımlanmış Moleküler Yolaklar.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	35
3.1. Olgu Seçimi.....	35
3.2. Moleküler çalışma.....	35
3.3 İstatistik.....	36
4. BULGULAR .....	44
4.1. Klinik ve Demografik Bulgular.....	44
4.2. Histopatolojik ve Moleküler Özellikler.....	44
4.3. İstatıstıksel Bulgular.....	44
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇLAR .....	66
7. KAYNAKLAR .....	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD:	Amerika Birleşik Devleti
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
AL:	Lysis Buffer
ATL:	Tissue Lysis Buffer
AW1:	Wash Buffer 1
AW2:	Wash Buffer 2
CRD:	Sisteinden zengin kısım
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR:	Epitelyal büyüme faktörü reseptör
ERK:	Ekstraselüler sinyal yolağı kinaz
FDA:	Food and Drug Administration
FISH:	Floresan in situ hibridizasyon
FTI:	Farnesil transferaz inhibitörü
HMWCK :	Yüksek moleküler ağırlıklı keratin
ICCR:	Uluslararası Kanser Raporlama Kollaborasyon Kurumu
ISUP:	Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği
İÜK:	İnfiltratif Ürotelyal Karsinom
İSK:	İn-situ karsinom
KT:	Kemoterapi
KRAS:	Kirsten Rat Sarkom
MAPK:	Mitojen aktive protein kinazı
MEK:	Mitojen ekstraselüler kinaz

NAK:	Neoadjuvan kemoterapi
NİDDPÜK:	Non-invaziv düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom
NİYDPÜK:	Non-invaziv yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDK1:	Protein bağımlı kinaz 1
PI3K:	Fosfoinositid 3 kinaz
PIK:	Fosfoinositid kinazlar
PIK3/AKT:	Fosfoinositid 3 kinaz/protein kinaz B
PIK3CA:	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3 kinaz, katalitik subunit alfa
PIP3:	Fosfotidilinositol trifosfat
RAS:	Rat Sarkom Faktörü
RBD:	RAS bağlayıcı alana
RKIP:	Raf-kinaz inhibitör proteinin
RTK:	Reseptör tirozin kinaz
TCGA:	Kanser genom atlas projesi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1:** Sekiz haftalık fetüste kloakanın ürorektal septum ile iki bölüme ayrılaşması ve allantois ile ilişkisi.

**Şekil 2:** A) Mezonefrik duktus ürogenital sinüse açılımı B) Sinüs büyüdükçe mezonefrik duktusun proksimali absorpsiyonu ve mezonefrik duktuslar ve üreterlerin farklı yerlerden mesaneye açılması C) Açılım yerleri ilk etapta birbirlerine yakın D) Absorpsiyonun devam etmesi üreterlerin yukarı-laterale yer değiştirmesine neden olmakta, ortada mezodermden köken alan trigonun gelişimini sağlamakta.

**Şekil 3:** Mesanenin kadın ve erkeklerdeki anatomik organ komşuluklarının gösterimi.

**Şekil 4:** A) Mesane tabakalarının histolojik görünümünün şematizasyonu (13), B) Transizyonel epitel tabakaları H&E, x400.

**Şekil 5:** Mesane kanserinde patolojik evrelendirme.

**Şekil 6:** Reseptör tirozin kinaz yolağı aktivasyon şeması.

**Şekil 7:** COSMIC veri setinde İÜK olgularında saptanan mutasyon oranları.

**Şekil 8:** RAF'ın yapısı ve RAS/RAF/MEK/ERK ile ilişkisi.

**Şekil 9:** PI3K sinyal yolağı kaskadı.

**Şekil 10:** PIK3CA geninde mutasyona uğrayan 'hotspot'/yoğun bölgeler.

**Şekil 11:** Parafin bloklardan tümör alanlarının bistüri yardımı ile makrodiseksiyonu.

**Şekil 12:** Ekstraksiyon esnasında formaldehit etkisinin geri kazanılmasını sağlayan 90°C de inkübasyon.

**Şekil 13:** Ekstraksiyon ürününün QIAamp MinElute kolonuna alınması.

**Şekil 14:** DNA ekstraksiyonu sonrası DNA miktarlarının ölçülmesi.

**Şekil 15:** PCR işlemi döngü basamaklarının süre ve ısı değerlerinin cihaz üzerinde gösterimi.

**Şekil 16:** PCR ürünleri pipet yardımı ile biyoçiplere şekilde gösterilen alandan damlatılarak nakledilmesi.

**Şekil 17:** İnfiltratif ürotelyal karsinom olgularında gözlenen diferensiyasyon tipleri ve sıklıkları.

**Şekil 18:** İnfiltratif ürotelyal karsinomlarında tespit edilen mutasyonlu olguların dağılımı.

## TABLULAR DİZİNİ

**Tablo 1.** Dünya Sağlık Örgütü 2016 Ürotelyal Tümörler Sınıflaması

**Tablo 2.** ‘Randox Evidence Investigator’ ile analiz edilen *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyon kodonları ve aminoasit değişimleri

**Tablo 3.** İnfiltratif Mesane Karsinomu Olgularının Klinik ve Demografik Özellikleri

**Tablo 4.** İnfiltratif Mesane Karsinomu Olgularının Histopatolojik Özellikleri

**Tablo 5.** Olgu bazında tespit edilen mutasyonlar, diferansiyasyon durumları ve hedef kodonları

**Tablo 6.** Diferansiyasyon Gösteren ve Göstermeyen Grupların Histopatolojik Parametrelerinin İstatistiksel Analizi

**Tablo 7.** Diferansiyasyon Gösteren ve Göstermeyen Grupların Mutasyon Durumlarının İstatistiksel Analizi

**Tablo 8.** *KRAS* Mutasyonunun Histopatolojik Özellikler ile İstatistiksel Analizi

**Tablo 9.** *BRAF* Mutasyonunun Histopatolojik Özellikler ile İstatistiksel Analizi

**Tablo 10.** *PIK3CA* Mutasyonunun Histopatolojik Özellikler ile İstatistiksel Analizi

**Tablo 11.** Sağkalım Sürelerine Ait İstatistiksel Analiz Sonuçları

**Tablo 12.** Kemoterapi Alan Hastalarda Mutasyon Varlığının Sağkalım Süresine Etkisinin İstatistiksel Analizi

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri genitouriner sistemin prostattan sonra görülen en sık kanseridir (1). Dünyada her iki cinsiyet birlikte değerlendirildiğinde tüm kanserler arasında görülme sıklığı 7. sıradadır ve kanserden olan ölümlerde 12. sırada yer almaktadır (2). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı kanser istatistiklerine göre mesane kanseri erkeklerde 4. sıklıkta görülmektedir. Yine de her iki cinsiyet birlikte değerlendirildiğinde ilk on kanser arasında yer almamaktadır (3). Hem dünyada hem ülkemizde erkeklerde daha sık görülen mesane kanserinde sigara önemli bir risk faktörüdür (4).

Mesane kanserleri, kasa invaziv olmayan (pTa, pT1) ve kasa invaziv ( $\geq$ pT2) olarak ikiye ayrıldığında invaziv olmayan mesane kanserleri %50-70 tekrarlamakta olup nadiren (%10-15) invaziv karsinoma dönüşmektedir (4,5). İnvaziv olmayan mesane kanserlerinde BCG tedavisi ile tamamen kür sağlanabilmektedir. İnvaziv kanserlerde hem agresif tedavi yöntemleri uygulanmakta (sistektomi, kemoterapi); hem de evrede ilerleme, metastaz daha çok görülmektedir (1). Bu yüzden özellikle invaziv olan mesane kanserlerinde yeni tedavi yöntemleri geliştirmek için moleküler yolların keşfi değer kazanmaktadır.

Son yıllarda diğer kanser türlerinde olduğu gibi hedefe yönelik moleküler tedavilerin geliştirilmesi için mesane kanserlerinin mutasyon analizi ana araştırma konularından biri olmuştur. Türkiye’de mesane kanserlerinde moleküler alt tip incelemesinin yapılması tümörün daha yüksek oranda görülmesi nedeniyle önemlidir. Ülkemizde Doğu Marmara/ Batı Karadeniz bölgesi sanayinin yoğun olduğu bir bölgedir. Sigara tüketimi yüksek olduğundan mesane kanserinin ülkemizde daha yüksek oranda görülmesi beklenen bir durumdur. Diğer yandan bu yüksek oranın nedeni toplumsal olarak farklı bir moleküler temel ile açıklanabilir.

Tirozin reseptör kinazın başlangıç noktasını oluşturduğu sinyal yolağında *RAS-BRAF-MEK-ERK* ve *PIK3CA-PTEN-AKT* onkogenlerinin yer aldığı basamaklardaki genlerin mutasyona uğraması hücrenin apoptozdan korunarak kanser geliştirmesine yol açmaktadır (5). Meric-Bernstam ve arkadaşlarının yaptığı 2000 hastanın katıldığı geniş serili moleküler analiz çalışmasında sık görülen ondan fazla kanserde en sık

bulunan 4 mutasyon sırasıyla *TP53*, *PIK3CA*, *KRAS*, *BRAF* olmuştur (6). Kansere oluşumunda bu dört genin önemli etkilerinin olduğu görölmektedir. Tirozin kinaz reseptörüne ve aktive onkogenlere yönelik yapılacak hedefe yönelik tedaviler hastaların prognozuna önemli katkılar sağlayabilir (7). Hangi hastada nasıl bir mutasyonun geliştiği ve hangi tedavinin başlanması gerektiği moleküler çalışmalar neticesinde tespit edilebilecektir.

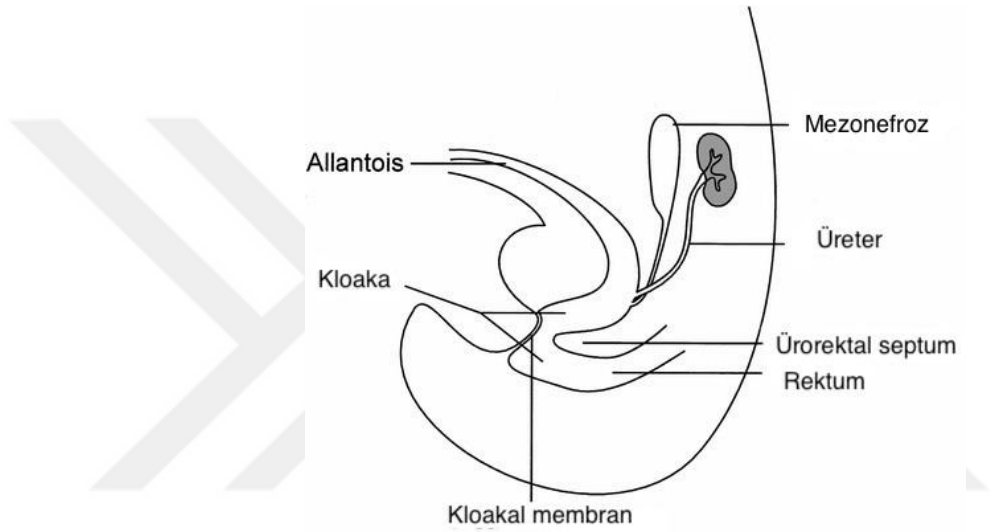
Çalışmamızda, RANDOX moleküler cihazı ile invaziv mesane kanserlerinde *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* mutasyon analizini yapmak, klinik-demografik veriler ve prognozla potansiyel ilişkilerini tespit etmek amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

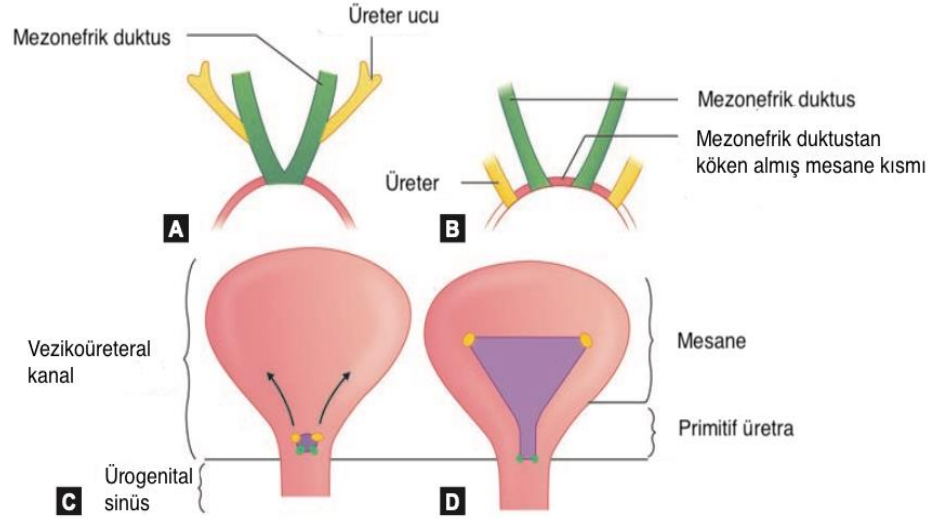
### 2.1. Mesane Embriyolojisi

Mesane gelişimi intrauterin 4. haftada ürogenital septumun kloakayı ön ürogenital sinüs ve arka rektum kısmına ayırmasıyla başlamaktadır (8). Ön kısımda ürogenital sinüs, arka kısımda rektum oluşmaktadır (Şekil 1).



**Şekil 1.** Sekiz haftalık fetüste kloakanın ürorektal septum ile iki bölüme ayrılması ve allantois ile ilişkisi (9).

Mezoderm tabakasından gelişen mezonefrik duktusların kaudal kısmı genişler ve mesane trigon bölgesini oluşturmak üzere ürogenital sinüsün orta-arka kısmıyla birleşir. Mezonefrik duktusların proksimalinde üreter tomucukları gelişmeye başlar. Zamanla mezonefrik duktuslarının ürogenital sinüsün içine çekilmesi ile üreterler ayrı girişlere sahip olmaktadır. Mezonefrik duktusların ürogenital sinüsün içine çekilmeye devam etmesiyle üreterler laterale, kraniale doğru hareket ederler. Neticede mezodermden trigon bölgesi gelişimi tamamlanmış olur (Şekil 2).



**Şekil 2.** A) Mezonefrik duktus ürogenital sinüse açılımı B) Sinüs büyüdükçe mezonefrik duktusun proksimal kısmının absorpsiyonu ve mezonefrik duktuslar ve üreterlerin farklı yerlerden mesaneye açılması C) Açılım yerleri ilk etapta birbirlerine yakın D) Absorpsiyonun devam etmesi ile üreterlerin yukarı-laterale yer değiştirmesi ve ortada mezodermden köken alan trigonun gelişimi (10).

Primitif ürogenital sinüse mezonefrik kanalların açıldığı noktanın üst kısmı vezikoüreteral kanal olarak bilinmektedir. Vezikoüreteral kanalın üst kısmından mesane, bu kanalın daha dar olan alt kısmından ise üretra gelişmektedir. Gelişmekte olan mesane kranial kesimde allantois ile devamlılık göstermektedir. Vezikoüreteral kanalın kranial kısmında yer alan endoderm tabakasından mesane epiteli gelişmektedir. Trigonun epiteli mezoderm tabakasından gelişmekte ve absorbe olan mezonefrik duktustan meydana gelmektedir. Mesanenin musküler ve seröz tabakası splanikoplörik mezodermden gelişmektedir (10).

## 2.2.Mesane Anatomisi

İnfant ve çocukluk döneminde abdomende yerleşik olan mesane, adölesan dönemine kadar aşağıya inerek pelvis minöre yerleşmektedir. Mesanenin alt kısmı kadınlarda pubovezikal, erkeklerde puboprostatik bağlarla sabit durumdadır. Kranial

kısmı ise üriner dolun sürecine adaptasyonun sağlanabilmesi için fibrolipomatöz yağ doku içerisinde serbest halde bulunmaktadır (11).

Mesane boşken dört yüzeyle ters piramit şeklinde olup tavan kısmı pariyetal periton ile örtülüdür. Anatomik olarak posteriora, kadınlarda uterin serviks ve vajenle, erkeklerde seminal vezikül ve vaza deferensin ampullası ile rektumdan ayrılmaktadır (Şekil 3). İleri evre mesane kanserlerinde komşu organ invazyonları, evreyi ve ameliyat prosedürünü belirleyen unsurlardandır. İnferolateral yüzeylerde mesane levator ani kasının fasyası ile komşuluk göstermektedir. Apeks olarak tariflenen anterosuperior kısımda yer alan median umbilikal ligaman, urakal kalıntı olup urakal karsinomların geliştiği bölgedir.

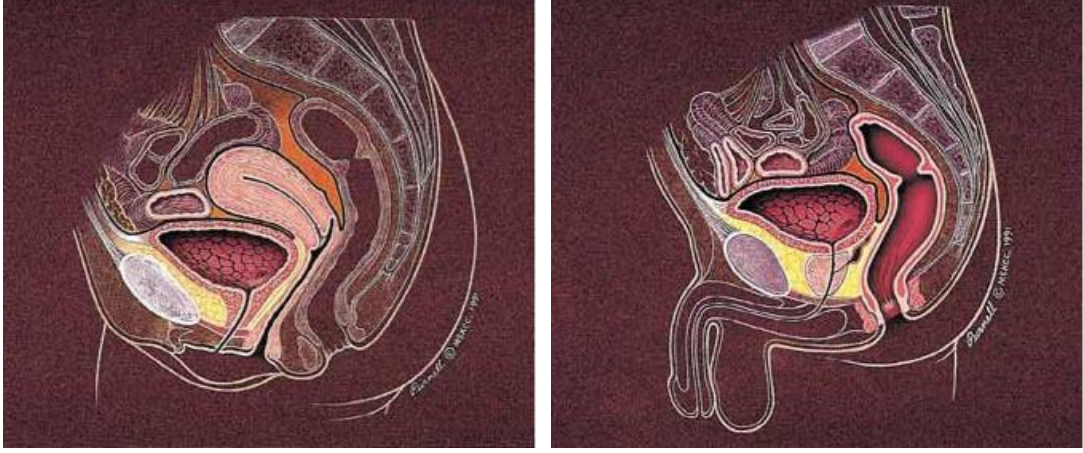
Trigon, mesanenin inferoposteriorunda yer alan embriyolojik gelişimi farklı olan mukozal kısımdır. Trigon bölgesinin superolateral kısımlarından üreter mesaneye girmektedir. Mesane içerisinde üreter kas tabakası Waldeyer kılıfı ile mesane kas tabakasında bağlanmaktadır ve bu kılıf mesanenin detrusör kas tabakası ile devamlılık göstermektedir. Bu anatomik bağlantı mesane dolumu sırasında kas tabakası gerildiğinde üreterlerin kapanmasını sağlayarak reflüyü önleyen bir mekanizmayı sağlamaktadır.

Mesane boynu olarak bilinen en distal kısım üretraya açılmaktadır. Mesane boynu erkeklerde prostat bezi ile komşuluk göstermektedir; bu komşuluk mesane tümörlerinde yanlış invazyon algısı oluşturabileceğinden bilinmesi önemlidir. Mesane boynu trigon kas tabakası, detrusör kas ve üretral kasların birleşiminden oluşmaktadır. Bu alanda mesanenin detrusör kas tabakası internal üretral sfinkterinin büyük kısmını meydana getirmektedir.

Mesane boynu posteriora erkeklerde rektum, kadınlarda vajen ile; anterior ve lateralde ise sırasıyla internal obturatuar, levator ani kasları ve pubik kemik ile komşudur.

Mesanenin arteryel kanlanması temel olarak internal iliak arterden köken alan inferior vezikal arterden kaynaklanmaktadır. Bunun yanında obturatuar ve inferior gluteal arterlerden ve kadınlarda vajinal ve uterin arterlerden beslenmektedir. Venöz drenaj venöz pleksusların birleşerek internal iliak vene akması ile; lenfatik drenaj ise internal ve eksternal iliak lenf nodları ile sağlanmaktadır.

Sempatik sinirler T11-L1 sinirlerinden, parasempatik sinirler ise S2-S4 sinirlerinden köken alarak mesanenin sinir ağı pleksusunu oluşturmaktadır. Mesane dolduğunda aktiflenen parasempatik sistem muskularis proprianın kasılmasını ve internal sfinkterin açılmasını sağlamaktadır. Eksternal sfinkterin köken aldığı pelvik kasların istemli gevşemesi ile işeme meydana gelmektedir. Pelvik ve hipogastrik sinirlerden köken alan duyu dalları ise mesanenin ağrı duyusunu taşımaktadır (11).

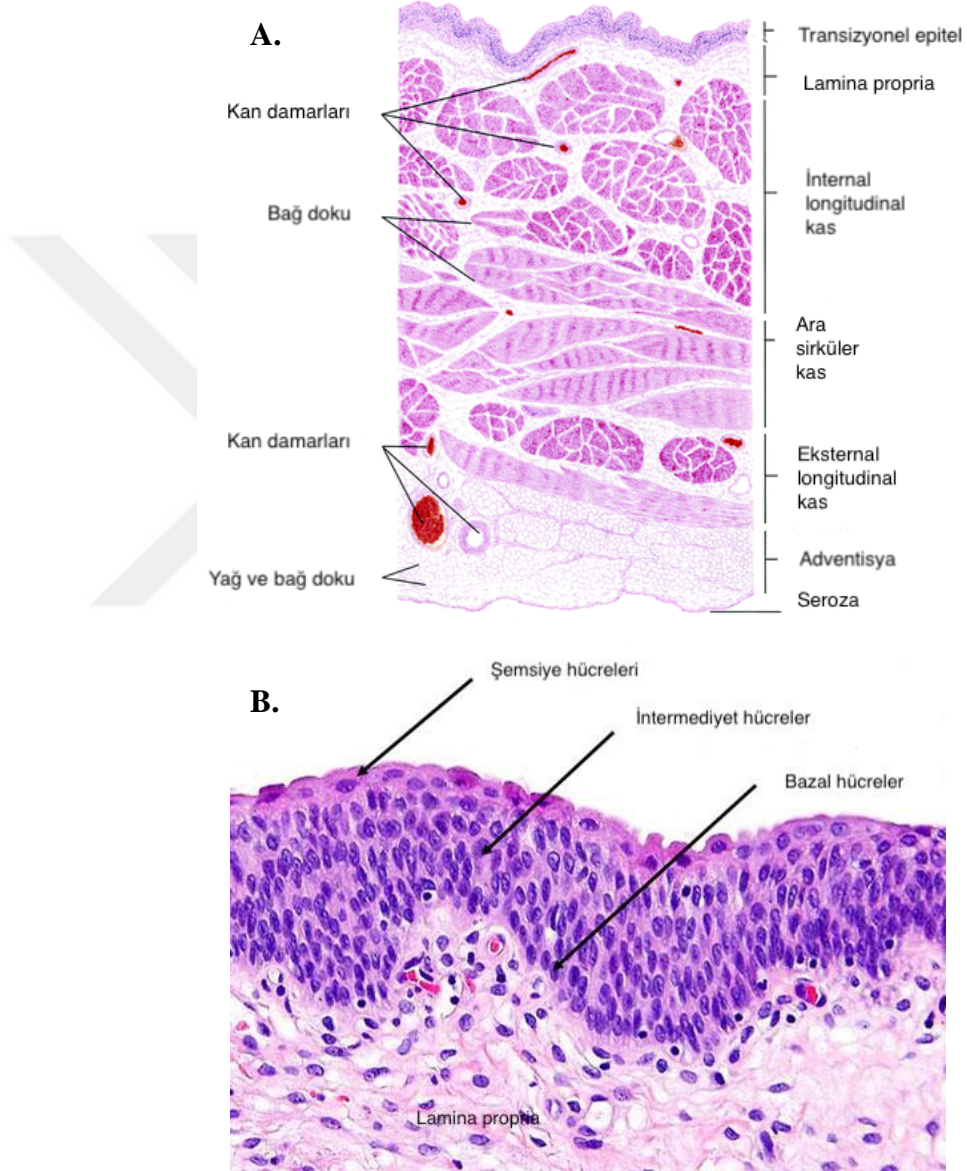


**Şekil 3.** Mesanenin kadın ve erkeklerdeki anatomik organ komşuluklarının gösterimi (11).

### 2.3. Mesane Histolojisi

Mesane, üreter ve renal pelvis ile benzer histolojide olup en içte ürotelyum (transizyonel hücreli epitel) ile örtülüdür. Ürotelyum, mesane boşken altı-yedi kat epitel hücrelerinden oluşurken mesane dolduğunda iki epitel hücresi kalınlığına kadar esneyebilir. En üst epitel tabakası şemsiye hücrelerinden, en alt tabaka bazal hücrelerden, ara tabaka ise poligonal şekilli ara (intermediyet) hücrelerden meydana gelmektedir (11). Şemsiye hücreleri sıklıkla binükleasyon gösterir ve mesanede geçirgen olmayan bir bariyer oluşturur. Epitel tabakası bazal membran ile lamina propriadan ayrılmaktadır. Lamina propria elastik lif, kapiller, sinir uçlarının yanı sıra fibroblast, miyofibroblast, yağ hücreleri ve Cajal hücrelerini içeren ekstraselüler matriksten oluşmaktadır ve muskularis mukoza bu tabakada izlenmektedir. Lamina propria detrüssör kas olarak bilinen muskularis propria ile devamlılık göstermektedir.

Muskularis propria içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler düzenlenme gösteren kaslardan oluşmaktadır. Mesane en dışta adventisya ile devamlıdır. Ayrıca, tavanda abdominal duvarın peritonu olan seroza ile örtülüdür. Bu tabakalar tümör derecelendirmesini belirlediğinden mikroskopik olarak tanınmaları önemlidir (12). Şekil 4’de mesane histolojisi gösterilmektedir.



**Şekil 4.** A) Mesane tabakalarının histolojik görünümünün şematizasyonu (13), B) Transizyonel epitel tabakaları H&E, x400 (12)

## 2.4. Mesane Kanseri Epidemiyolojisi

Mesane kanseri dünyada 7. sıklıkta gözlenen kanserdir ve kanser kaynaklı ölümlerde 12. sırada yer almaktadır (2). Amerika Birleşik Devleti (ABD) verilerine göre 2020 senesinde beklenen yeni vaka sayısı 81.400 (tüm kanserlere göre %4,5); mesane kanseri kaynaklı beklenen ölüm sayısı ise 17.900 (tüm kanserlere göre %3)'dür. ABD 1992-2017 yılları istatistiklerine göre mesane kanseri kaynaklı ölüm hızı sabit seyretmiştir ve özellikle son beş senede insidans hızının azaldığı gözlenmiştir. 5 yıllık yaşam beklentisi %76,9 olarak tespit edilmiştir (14). Türkiye istatistiklerine göre mesane kanseri erkeklerde 4. sıklıkta görülmekte iken her iki cinsiyet birlikte değerlendirildiğinde ilk on kanser arasında yer almamaktadır (3). Dünyada da etnik kökenlere göre ayrıldığında da (Asya kökenli, Afrika kökenli, Latin Amerikan, vb.) mesane kanseri erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 4 kat daha sık gözlenmektedir (14).

Mesane kanseri görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır ve en sık 65-74 yaşları arasında tanı konulmaktadır. Ortalama görülme yaşı 73'tür. Ölümlerin %80'i ise 65 yaştan sonra meydana gelmektedir (14).

## 2.5. Mesane Kanseri Etiyoloji ve Risk Faktörleri

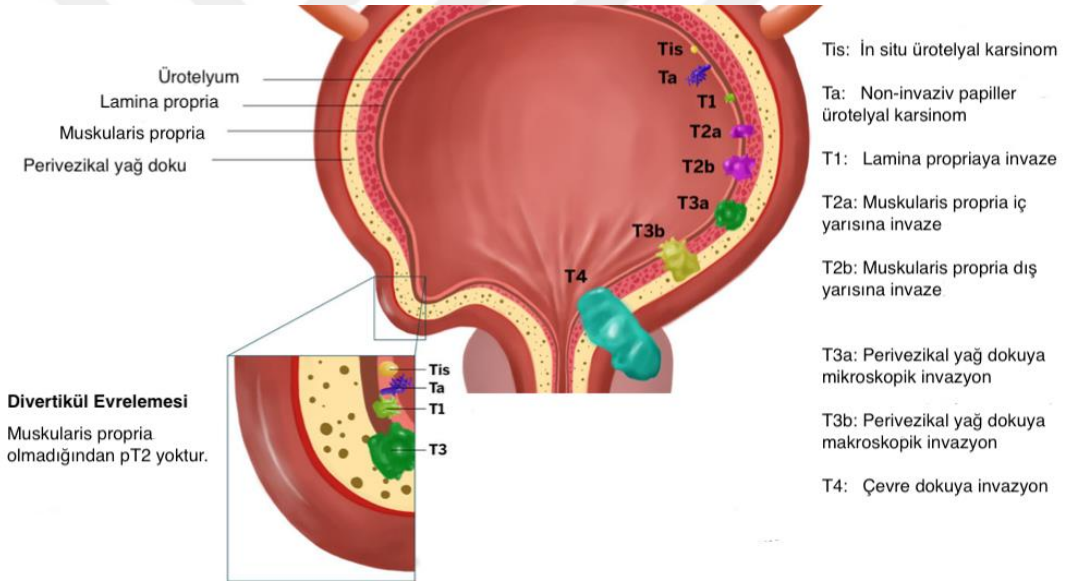
Mesane kanseri gelişiminde çevresel ve enfeksiyöz süreçler önemli rol almaktadır. Bu risk faktörlerinden ürotelyal karsinom gelişimi için en önemli risk faktörü sigara olarak belirlenmiştir. Sigara içerisinde bulunan 60'dan fazla zehirin bir kısmı bu tümörün gelişimini tetiklemektedir. Sigara içen mesane kanseri hastaları daha erken yaşta tanı almakta, daha kötü prognozlu seyretmekte ve rekürrens daha sık gelişmektedir. Çevresel faktörlerden; kimya ve plastik sanayisinde kullanılan anilin boyaları (benzidin,  $\beta$ -naftilamin), alüminyum ve karbon sanayisinde kullanılan polisiklik aromatik hidrokarbon ve diabetes mellitus tedavisinde kullanılan thiazolidinedionların bazı formlarının mesane kanseri riskini artırdığı görülmüştür (15). Chang ve ark. yapmış olduğu çalışmada ağır metal maruziyeti (kadmiyum, nikel, kurşun, vb) mesane kanseri ile ilişkili bulunmuştur (16). Genetik faktörlerin etkisi

genomik çalışmalarla gösterilmeye çalışılmış fakat henüz tam olarak ilişkilendirilememiştir (17).

## 2.6. Mesane Tümörlerinde Prognostik Faktörler

Mesane kanserlerinin prognozunda klinik, morfolojik, genomik farklılıklar rol oynamaktadır.

\**Evre*: Mesane kanserlerinde en önemli prognostik gösterge olması yanı sıra tedaviyi yönlendiren en önemli unsurdur (18). Çoğu kanserde olduğu gibi ileri patolojik T evresi kötü prognoz göstergesi olup rekürrens oranı ve hızı ile ilişkilidir (19) (Şekil 5).



**Şekil 5.** Mesane kanserinde patolojik evrelendirme [Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) Evreleme Kılavuzu, 8. baskı, 2017] (20)

Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlarda invazyon ve ileri T evresi çok görülmektedir fakat sık rekürrens ile seyretmektedirler. Yüksek dereceli ürotelyal karsinomlar ve in situ karsinomlarda kasa invazyon daha sık olur ve hem sık rekürrens hem de hızlı progresyon görülür. Tümörün muskularis propriaya invazyonu (pT2) radikal sistektomi için endikasyon oluşturmaktadır. PT2a-pT2b ayrımının sistektomi materyalinde tanımlanması lenf nodu tutulumu olmayan vakalarda önemli prognostik

farklılığı ortaya koymuştur (18). PT1 tümörlerde klinik seyir invazyon derinliğine göre farklılık gösterdiğinden bu evrenin de belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda bazı ekoller muskularis mukoza invazyonunu bir sınır olarak belirlerken, bazıları 1.5 mm altı ve üstü invazyonları baz alarak pT1a ve pT1b olarak ayırmışlardır. Her iki görüşte de hastalık gidişatını belirleyen anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Uluslararası Kanser Raporlama Kollaborasyon Kurumu (ICCR) her iki raporlama tekniğinin kullanılabileceğini düşünmektedir (21).

\**Varyant*: Mikropapiller, nested, sarkomatoid, plazmasitoid ve küçük hücreli varyant karsinomlar kötü prognozlu seyretmektedirler (18,22). Pür lenfoepitelyoma benzeri ürotelyal karsinomlarda ise prognoz daha iyi olduğu bildirilmiştir (23).

\**Lenfovasküler invazyon*: İleri evre kanserlerde daha sık gözlenen lenfovasküler invazyon sağ kalımla ilişkilidir. ‘Uluslararası Mesane Kanseri Nomogram Konsorsiyumu’ pozitif lenf nodu sayısının eksizye edilen lenf noduna oranını ‘lenf nodu yoğunluğu’ olarak nitelendirmiştir. Bu yoğunluğun artışı hastalısız sağ kalımı olumsuz etkilemektedir ve onkolojik takip için bağımsız prediktör olarak kabul edilmiştir (19).

\**Tümör boyutu ve cerrahi sınır durumu*: Tümör rekürrensi cerrahi sınır pozitifliği olan vakalarda yaklaşık 2 kat fazladır. Tümör boyutunun artışı ve nekrozun bulunması kötü prognostik faktörlerdendir (19).

\**Derece*: Mesane karsinomları derecesine göre temelde düşük dereceli ve yüksek dereceli olarak ikiye ayrılmıştır. Düşük dereceli karsinomlar papiller büyüme paterni göstermekte olup invazyon daha nadir görülmektedir. Yüksek dereceli karsinomlar ise in situ karsinom ve invaziv karsinom olarak görülmektedir. Düşük dereceli ve yüksek dereceli karsinomların gelişiminde moleküler yolların farklı olduğu dikkati çekmiştir. Düşük dereceli karsinomlarda tirozin kinaz reseptör yolağına ait *HRAS*, *FGFR3* ve *PIK3CA* mutasyonları rol oynamaktadır. *HRAS* ve *FGFR3* fonksiyonel olarak eşit etkileri vardır. *FGFR3* mutasyonu sık rekürrense ilişkili bulunmuş olup hastalısız sağ kalımı olumlu etkilemektedir. Diğer yandan *PIK3CA* nokta mutasyonları daha düşük evre, derece ve daha az rekürrense ilişkili bulunmuştur. Yüksek dereceli karsinomların ise hücre döngüsü düzenleyici *p53*, *RB*, *p21* ve *p27* proteinlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda geliştiği

düşünülmektedir. Bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların prognozu kötü etkilediği düşünülmektedir (18).

\*Moleküler yolak: Kanser genom atlas projesi (TCGA)'nin yapmış olduğu 131 yüksek dereceli infiltratif ürotelyal karsinomun dahil edildiği tüm genom okuma çalışmasında ürotelyal karsinomların %93'ünde p53/RB yolaklarında, %72'sinde *PI3K/AKT/mTOR* ve *RTK/RAS* yolaklarında, %89'unda epigenetik değişikliklerin rol aldığı gösterilmiştir. Bu yolakların çoğunun mesane kanserinde rol oynadığı gösterilmiştir (18). Demrauer ve ark. yapmış olduğu çalışmada mesane kanserleri luminal ve bazal tip olarak ikiye ayrılmıştır. Luminal tipte üroplakin ve keratin 20 ekspresyonu; bazal tipte CD44, keratin 5 ve 14 ekspresyonu mevcuttur. Bazal tipte luminal tipe göre ortalama yaşam sürelerinde belirgin azalma izlenmiştir (18). Genetik imzaların rekürrens ve progresyonda etkilerinin olduğu yapılan dizi bazlı ('array based') gen ekspresyon çalışmalarında gösterilmiştir. Lindgren ve ark yapmış olduğu çalışmada tanımlanan 1. bazal benzeri subtip, skuamöz fenotip gözlenmiş olup p63 aktivasyonu, CK5/6 pozitifliği, EGFR, CD44 aktivitesi tanımlanmıştır ve neoadjuvan kemoterapiye iyi yanıt aldıkları gösterilmiştir. 2. luminal subtip ise *FGFR3* mutasyonu, ER aktivasyonu ve ERBB2, PPARgama ekspresyonu mevcut olup tedavi yolları ile ilişkili bulunmuştur. Her iki yolakta neoadjuvan tedaviye dirençli *TP53* gen ekspresyonu saptanmıştır (22). Diğer yandan EGFR aşırı ekspresyonu hastalığın progresyonunu gösterirken, ERBB2 amplifikasyonu agresif davranış, ileri evre ve derece, artmış rekürrens ve progresyon ile ilişkili bulunmuştur (18).

Moleküler yolların tanımlanması erken tanıya yardımcı olabilmektedir. İdrardan yapılan floresan in situ hibridizasyon (FISH) çalışmaları, henüz klinik bir kanser mevcut değilken, kanser varlığı açısından pozitif sonuçlanmıştır. Bu hastaların 29 ay içerisinde kanser geliştirdiği gözlenmiştir; bu durum erken tanı ve tedavinin sağlanabilmesi açısından önemlidir (22).

## **2.7. Mesane Tümörlerinin Sınıflaması**

Mesane kanserleri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasında geliştikleri hücrenin kökenine göre ürotelyal tümörler, skuamöz hücreli neoplaziler, glandüler neoplaziler, urakal karsinomlar, nöroendokrin tümörler, melanositik tümörler,

mezenkimal tümörler, müllerian tip tümörler olarak ayrılmaktadırlar. Ürotelyal kökenli tümörler en sık görülen kategoridir. 2016 DSÖ ürotelyal yolak tümörlerinin sınıflamasında bu tümörlerin çok sayıda morfolojik varyant ve farklı gen haritaları olduğu vurgulanmıştır (24).

### 2.7.1. Ürotelyal tümörler

Ürotelyal tümörler; infiltratif ürotelyal karsinomlar ve non-invaziv ürotelyal lezyonlar olmak üzere iki ana kategoriden oluşmaktadırlar (Tablo 1) (22).

**Tablo 1.** Dünya Sağlık Örgütü 2016 Ürotelyal Tümörler Sınıflaması

Non-invaziv Ürotelyal Lezyonlar	İnfiltratif Ürotelyal Karsinom (İÜK) Varyantları
İn-situ ürotelyal karsinom	Farklı diferansiasyonlu (skuamöz, glandüler, trofoblastik vb)
Non-invaziv düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom (NİDDPÜK)	Nested, büyük nested dahil
Non-invaziv yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom (NİYDPÜK)	Mikrokistik
Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm	Mikropapiller
Ürotelyal papillom	Lenfoepitelyoma benzeri
İnverted ürotelyal papillom	Plazmositoid/ taşlı yüzük hücreli/ difüz
Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon	Sarkomatoid
Ürotelyal displazi	Dev hücreli Yağdan zengin Berrak hücreli Kötü diferansiye tümörler

#### 2.7.1.1. İnfiltratif ürotelyal karsinom

Transizyonel hücreli karsinom olarak da bilinen infiltratif ürotelyal karsinom mesanede en sık görülen kanserdir; morfolojik olarak çeşitli diferansiasyon ve varyantları bulunur (22). Sistektomi materyallerinin %30'undan fazlasında farklı diferansiasyonlar görülmektedir: Skuamöz, glandüler, küçük hücreli, trofoblastik ve Müllerial özellik gösterebilir (25). Daha agresif tümör davranışı ve buna bağlı daha ileri evre hastalık olarak açığa çıkan tümörlerde tedavi algoritmaları değişebileceğinden klinik olarak diferansiasyon ve varyantların belirtilmesi önemsenmektedir (22).

İnfiltratif ürotelyal karsinomlar; belirgin desmoplastik reaksiyon oluşturmaksızın, farklı boyutlarda yuvalar, trabeküller, tabakalar, kordonlar yapan veya tek hücre şeklinde dağılan, pleomorfik ve iri-hiperkromatik nükleuslu, çoğunlukla geniş eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşan, çok sayıda mitoz içeren tümörlerdir.

#### 2.7.1.1.1. Farklı diferansiasyonlu infiltratif ürotelyal karsinom

Bu terim; 'olağan tip' ürotelyal karsinoma diğer varyantların eşlik etmesini tanımlamaktadır ve İÜK'ların en sık görülen varyantıdır (23). Sistektomi materyallerinde İÜK'ların farklı diferansiasyon olma oranı yaklaşık %33'tür. En sık eşlik eden diferansiasyonlar skuamöz, glandüler, küçük hücreli, trofoblastik tiptedir (24). Skuamöz hücreli karsinom veya adenokarsinomdan ayırmda ÜK komponentini görmek, in situ dahi olsa yeterlidir (25).

#### 2.7.1.1.2. Skuamöz diferansiasyon

İnterselüler köprüleşmenin ve/veya keratinizasyonun var olmasıyla tanınan, İÜK'larda bulunan en sık diferansiasyondur. HPV ile ilişkisi az sayıda vakada tespit edildiğinden hastalığı oluşturan etken olarak görülmemektedir (23). Genomik çalışmalarda tanımlanan, skuamöz morfoloji gösteren bazal/skuamöz benzeri moleküler subtipin sistemik tedaviye yanıtının kötü olduğu ve beklenen yaşam

süresinin az olduğu tanımlanmıştır (24). Skuamöz veya skuamoid morfolojili bazal subtipde CK5 immünekspresyonu mevcutken, CK20 ile işaretlenmezler (22).

#### 2.7.1.1.3. Glandüler diferansiasyon

Tümörde, gland formasyonunun görülmesiyle tanınır ve görülen ikinci sıklıktaki diferansiasyondur. Psödoglandüler boşluklar oluşturabilen olağan tip İÜK'dan ayrılmalıdırlar. Bu diferansiasyon enterik tip adenokarsinoma, morfolojik ve immünhistokimyasal özellikler (CDX2, CK20 pozitifliği vb.) açısından benzediğinden raporlamada klinik olarak mesane dışı primer odağın dışlanması önerilmelidir (24).

#### 2.7.1.1.4. Trofoblastik diferansiasyon

Koryokarsinomdan ayrımı yapılamayan, sinsityotrofoblastik dev hücrelere benzeyen dev hücrelerin görülmesiyle bilinen diferansiasyondur. βhCG immünekspresyonu trofoblastik dev hücre olmasa da İÜK'larda görülebilmektedir. Diğer yandan özellikle metastaz yapmış olan vakalarda βhCG serum seviyesi yüksek bulunabilmektedir (22).

#### 2.7.1.1.5. Nested varyant

Sitolojik olarak olağan görünümde ürotelyal hücrelerden oluşan düzensiz yuva ve tübüllerin proliferasyonu, infiltrasyonu ile karakterizedir. Büyük yuvalardan oluşan paterni de mevcut olup sitolojik atipi neredeyse hiç gözlenmez. Mitoz sık görülebilir. Sitolojik özellikleri benign olduğundan özellikle yüzeysel biyopsilerde tanı koymak oldukça zordur ve ileri evrelerde tanı alırlar (22,24). Ayrıca, nefrojenik adenom veya Von Brunn adaları gibi benign lezyonlarla karıştırılabilirler. Artmış p53 ekspresyonu tanıda yardımcı olabilmektedir (23). Moleküler düzeyde *TERT* mutasyonu saptanması nested varyant ÜK tanısını desteklemektedir, ancak mutasyon görülmemesi bu tanıyı dışlamamaktadır (25).

#### 2.7.1.1.6. Mikrokistik varyant

Ürotelyal karsinomların benign özelliklere sahip, sitolojik atipi içermeyen diğer varyantı olup milimetrik kistlerden 2 cm'ye ulaşabilen yuvarlak-oval kistlerden oluşan tümördür (23,25). Sistitis sistika veya glandülaris benzeri benign durumlarla karışabilirler (22,24). Mikrokistik ÜK olağan ÜK ile benzer immünohistokimyasal özellikler (GATA3, p63, CK7, CK20 ekspresyonu) olmasının yanı sıra muc5AC ekspresyonu da göstermektedir. Ancak sistitis glandülarisde de muc5AC ekspresyonu gözlenebildiğinden ayırıcı tanıda yardımcı olmamaktadır (25).

#### 2.7.1.1.7. Mikropapiller varyant

Oldukça pleomorfik görünümde hücrelerin perifere oryante olduğu, ortasında fibrovasküler korların bulunmadığı, lenfovasküler invazyonu taklit edencesine boşluk içinde duran küçük yuva ve kümelerden oluşan tümördür (24). MUC1 ile ters polarizasyon gösterilebilmektedir (23). Mikropapiller karsinomlarda lenfovasküler invazyon ve karsinoma in-situ görülme oranı yüksektir. Gidişatları daha habis olduğundan erken evrede sistektomi operasyonu uygulanan hastalarda daha iyi prognozla seyrettikleri gösterilmiştir (22), bu nedenle bazı otörler tarafından erken dönem sistektomi desteklenmektedir (23,25). Konvansiyonel tip İÜK'lara göre ERBB2 amplifikasyonu mikropapiller varyantta daha sık görülmektedir (22, 23).

#### 2.7.1.1.8. Lenfoepitelyoma benzeri varyant

Morfolojik olarak nazofarenkste gözlenen lenfoepitelyal karsinoma benzemektedir. Mikst T ve B lenfositlerin, histiositlerin, nadiren eozinofil ve nötrofillerin bulunduğu zeminde sinsityal büyüme gösteren, yuva ve kordonlar oluşturan, belirsiz sitoplazmik sınırlara sahip, iri-pleomorfik nükleuslu, belirgin nükeollü hücrelerden oluşan tümördür (23). EBV ile ilişkisi tespit edilmemiştir (22). PD-L1 ekspresyonu gözlenmiş olup immunoterapi bu hastalarda potansiyel bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir (25).

#### 2.7.1.1.9. Plazmositoid/taşlı yüzük hücreli/difüz varyant

Nadir görülen ve agresif seyirli olan bu varyant tek hücre şeklinde dağılan plazmositoid, lenfoid, rabdoid özellikteki, iri-hiperkromatik nükleuslu hücrelerden oluşmaktadır (25). Genellikle ileri evrede tanı almaktadırlar. Bu tümörlerde somatik *CDHI* mutasyonu mevcut olup e-kaderin ekspresyon kaybı izlenmektedir (24). Lenfoid markırlar negatifken, CD138 bu tümörlerde çoğunlukla pozitifdir ve tanısal güçlüğüne neden olabilir (22,25). Lenf nodu metastazı bu olgularda konvansiyonel ÜK'lara göre daha siktir (25).

#### 2.7.1.1.10. Sarkomatoid varyant

Morfolojik olarak sarkomdan ayrımı zor olan tümörlerdir, epitelyal malign hücrelerden köken almakta olup epitelyal-sarkomatoid morfoloji göstermektedirler (22,25). Radyoterapi ve siklofosamid tedavisi risk faktörleri olarak bilinmektedir. Makroskopik olarak büyük, polipoid, etsi kıvamlı, infiltratif sınırlı kitlelerdir. Mikroskopik olarak iğsi, pleomorfik hücrelerden oluşmaktadırlar. Osteosarkom, kondrosarkom, anjiyosarkom vb heterolog komponent eşlik edebilir (22). Ayırıcı tanıda primer sarkom ilk sırada gelmekte olup ayırıcıda immünohistokimyasal olarak epitelyal veya ürotelyal markırların pozitifliği yol göstermektedir (23,25). Sarkomatoid varyant ÜK'da komplet ya da kısmi epitelyal mezenkimal transizyon izlenmektedir ve immünohistokimyasal belirteçlerle (Vimentin, FoxC2, SNAIL, ZEB1) gösterilebilmektedir. Komplet transizyon gösteren vakalar tamamen mezenkimal fenotipe sahip olup daha kötü seyirli dirler. *TERT* mutasyon varlığı da kötü prognostik gösterge olarak bildirilmiştir (25).

#### 2.7.1.1.11. Dev hücreli varyant

Genellikle olağan İÜK'a eşlik eden agresif seyirli varyanttır. Oldukça bizar, pleomorfik iri hücrelerden oluşmaktadır. Tipik veya atipik mitoz, yaygın nekroz

görülebilir. Osteoklast tipi dev hücreden ve trofoblastik diferansiasyondan ayırt edilmelidir (22).

#### 2.7.1.1.12. Yağdan zengin varyant

Lipoblasta benzeyen, nükleusu indente eden, yağ içeren, büyük, bir veya daha çok sitoplazmik vakuole sahip tümör hücrelerinden oluşmaktadır. Literatürde az sayıda vaka bildirilmiştir (22). Kötü seyirli olduğu düşünülen bu tümörlerde ayırıcı tanıda liposarkom, taşlı yüzük hücreli karsinom ve metastatik karsinom akla gelmelidir (25).

#### 2.7.1.1.13. Berrak hücreli (glikojenden zengin) varyant

Berrak hücreli renal hücreli karsinoma benzer berrak sitoplazmalı, glikojen ihtiva eden hücrelerden oluşmaktadır. Polisakkarit içeriği PAS ile pozitif boyanırken diastaz ile boyanma olmamaktadır (22, 23). CA125 pozitifliği bu varyantta gösterilmiş olup müllerian orijini desteklediği düşünülmektedir (23). %50 vakada üroplakin III pozitifliği izlenmekte olup berrak hücreli renal hücreli karsinom veya jinekolojik karsinomlarda gözlenen PAX8 pozitifliği ayırıcı tanıda yardımcı olmaktadır (25).

#### 2.7.1.1.14. Kötü diferansiye tümörler (Osteoklast dev hücre tipini içerenler dahil)

Küçük hücreli, sarkomatoid, dev hücreli, andiferansiye karsinomları içeren tümörlerdir. Osteoklasttan zengin andiferansiye tip, kemiğin dev hücreli kanserine benzeyen, mononükleer malign andiferansiye hücreler ve multinükle osteoklast benzeri dev hücrelerden oluşan bir tümördür. Literatürde çok nadir bildirilmiştir (22).

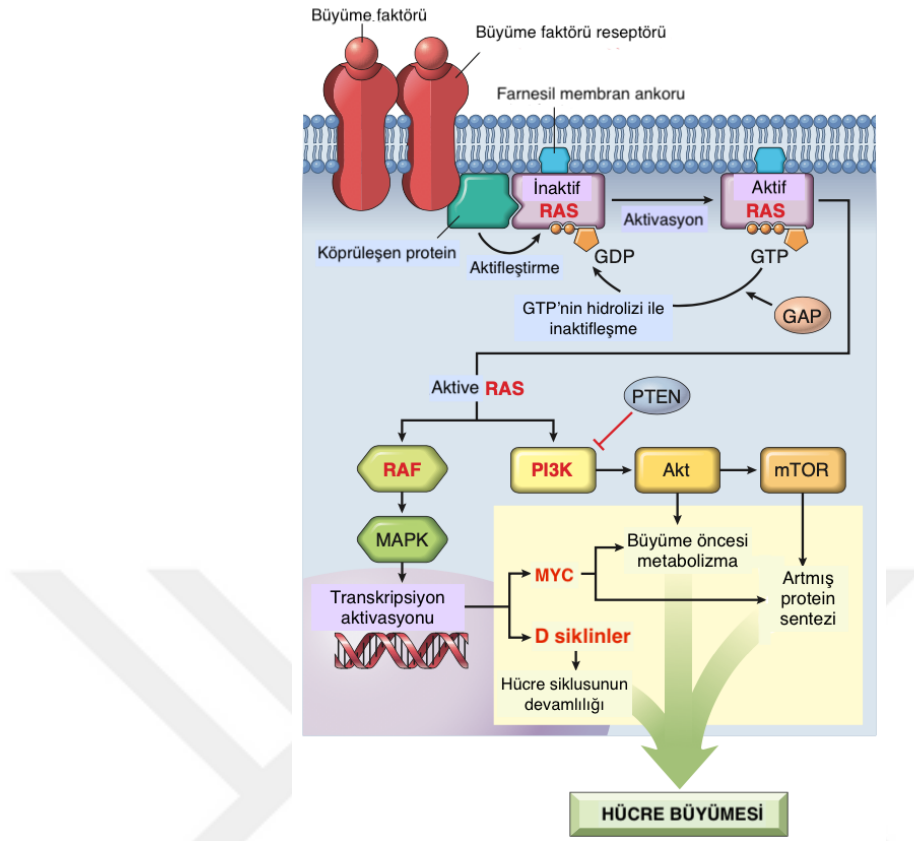
## 2.8. Kanser Gelişiminin Moleküler Temeli

Normal bir hücrenin bölünmesini ve işlevini sürdürmesini sağlayan temel sinyal yolağı mekanizması, hücre yüzey reseptörlerine bağlanan medyatörlerin hücre

içi yolakları aktiveleştirmesi ya da hücre içine sitoplazmik membrandan geçebilen mediyatörlerin nükleus reseptörlerine bağlanması ile başlamaktadır (Şekil 6). Hücre sinyal yolakları; reseptör tirozin kinaz yolağı, G protein ilişkili reseptör yolağı, *JAK/STAT* yolağı, Notch sinyal yolağı, Wnt sinyal yolağı, Hedgehog yolağı, *TGFβ/SMAD* yolağı, *NF-κβ* yolağından oluşmaktadır.

Kinaz ilişkili reseptör yolaklarında intrinsik reseptör protein kinazın aktivasyonu ile kaskat başlatılmaktadır. Genellikle hücre içi hedef moleküllerin fosforilasyonu aktivasyon sağlarken (lipit kinaz ile lipitlerin fosforilasyonu vb) defosforilasyonu döngüyü inaktive etmektedir.

Tirozin kinaz reseptörleri; ekstraselüler ligand bağlayıcı kısım, transmembran heliksi ve jukstamembran düzenleyici bölge, tirozin kinaz kısmı, karboksi ucu barındıran intraselüler kısımdan oluşan integral membran proteinleridir (epidermal büyüme faktörü reseptörü, insülin reseptörü, trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü, vb) (26). Bu reseptörlere büyüme faktörünün bağlanması ile reseptördeki tirozin kalıntıları otofosforilasyona uğrar. Köprü proteinleri vasıtasıyla GDP ilişkili *RAS*'daki GDP fosfat kazanarak GTP'ye dönüşür ve *RAS* aktivasyonu sağlanır. Aktive *RAS* bir taraftan *RAF* ile *MAP* (mitojen aktive protein) kinazı aktiveleştirenken diğer taraftan *PI3K* (fosfoinositid 3 kinaz)-*Akt-mTOR* yolağını aktiveleştirmektedir. Bu yolakların aktivasyonu nükleusa iletilerek transkripsiyon aktivasyonunu ve hücre döngüsünün devamlılığını sağlamaktadır (Şekil 6) (27).



Şekil 6. Reseptör tirozin kinaz yolağı aktivasyon şeması (28).

Çevresel etkenlerin, genetik mutasyon ve polimorfizmlerin etkisiyle kanser gelişimi tetiklenmektedir. Bu mutasyon hücre döngüsündeki basamakları etkilemektedir. Hangi basamağın etkilendiğine göre hücrenin görevlerinde bölünmesini arttıracak ya da ölümünü engelleyecek düzenleyici genler aktifleşmektedir. Bu genler; protoonkogenler, tümör baskılayıcı genler, apoptozis düzenleyici genler, DNA tamir genleridir. Protoonkogenler ‘fonksiyon kazanımı mutasyonu’na, tümör baskılayıcı genler ‘fonksiyon kaybı mutasyonu’na uğrayarak kanser gelişimine neden olmaktadır. Bu mutasyonların sonucunda kanser hücresinde sekiz fonksiyonel yanıt meydana gelmektedir;

- Büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik: onkogen
- Büyüme engelleyici sinyallere duyarsızlık,
- Değişken hücresel metabolizma,
- Apoptozisten kaçınma,
- Sınırsız bölünme kapasitesi,

- Anjiyogenezde devamlılık,
- İnvaze olma ve metastaz yapma kabiliyeti,
- Konağın bağıışıklığından kaçınma.

Onkogenler hücrenin apoptozisten kaçınarak kanser geliştirmesine neden olan genlerdir ve protoonkogenlerin mutasyona uğraması ile gelişirler. Çeşitli tümörlerde farklı çok sayıda sinyal yolağında değişiklikler saptanmıştır. Bu değişikliklerin sonucunda, mutasyona uğrayan protoonkogenlerin aktive olması ve tümör baskılayıcı genlerin inhibe olması ile kanser gelişmektedir.

Tirozin kinaz reseptörünün insanda tanımlanmış 58 tipi bulunmaktadır. Hücrenin büyümesi, haberleşmesi, diferansiasyonu, metabolizması gibi birçok fonksiyonu sağlamaktadır (26). Sinyal yolaklarından tirozin kinaz reseptör yolağı en sık mutasyona uğrayan proteinleri, genleri içermektedir. Bu yolda büyüme faktörleri, reseptörlerine (*EGFR*, *ERBB2*, *IGF*, *PDGF*, vb) bağlanarak *RAS* proteinini aktifleştirmektedir. Aktive *RAS* proteini hücre sitoplazmasında *MAPK* ve *PI3K* yolaklarını tetiklemektedir. *PTEN*, *PI3K* inhibe eden tümör baskılayıcı genidir. *MAPK*, transkripsiyon aktivasyonunu sağlayarak nükleusta *MYC* ve *siklin D*'yi aktifleştirmektedir. *PI3K* ise *Akt* ve *mTOR*'u aktifleştirmektedir. *MYC* ve *Akt* hücre büyüme metabolizmasının düzenlenmesini, *MYC* ve *mTOR* protein sentezinin artmasını, *siklin D* ise hücre döngüsünün devamlılığını sağlamaktadır (28).

Tirozin kinaz reseptör yolağı aktivasyonuna neden olan 4 mekanizma vardır; fonksiyon kazanım mutasyonu, gen amplifikasyonu, kromozomal yeniden düzenlenme, otokrin aktivasyon (26).

**Fonksiyon kazanım mutasyonu:** Normal fizyolojik sinyallerdeki kontrol ve dengeyi sağlayamayan, aşırı sinyal transdüksiyonuna neden olan mutasyondur. Karsinogenezi başlatıp sürdürebilen bu mutasyonlar 'sürücü mutasyon' olarak tanımlanmaktadır (29). Örneğın *EGFR*'yi kodlayan kodon 18-24'de meydana gelen mutasyonlar kinazın hiperaktivasyonuna ve onkojenik özellikler kazanmasına neden olur. Bu mutasyonlar ekstraselüler kısmı/transmembran kısmını/jukstramembranöz kısmı etkileyebilir. Örneğın glioblastomlarda keşfedilen ve *EGFR*'nin ekstraselüler kısmını kodlayan kromozomda meydana gelen üç kayıp (missense) mutasyonu ile hücrede *EGFR* proteininde aşırı ekspresyon ve ligand bağlanmaksızın fosforilasyon gerçekteşmektedir (26).

**Gen amplifikasyonu:** Tirozin reseptör kinazın aşırı ekspresyonu reseptörün konsantrasyonunun (birim alana düşen reseptör sayısı) artışına neden olmaktadır. Bu genin aşırı amplifikasyonu ile gerçekleşebileceği gibi transkripsiyonel/translasyonel mekanizmaların kuvvetlenmesi, onkojenik virüs, fosfataz işlevselliğinin kaybı gibi etkiler ile de olabilir. Gen amplifikasyonu ise genomun belirli bölgesinin kopya sayısının artışını göstermektedir (26).

**Kromozomal yeniden düzenlenme:** İyonizan radyasyon, topoizomeraz zehirlenmesi (KT etkisi), oksidatif stres suçlanan nedenler olarak gösterilse de temel mekanizması henüz tanımlanmayan bu mutasyonda tirozin kinaz reseptörünün kısımlarını kodlayan kromozomda kopmalar ve yeniden bağlanmalar meydana gelmektedir. Bu mutasyona en iyi bilinen örnek kronik miyeloid lösemide tanımlanan kromozom t(9;22) de meydana gelen *BCR-ABL* füzyonudur (26).

**Kinaz kısımlarının duplikasyonu ile yapısal aktivasyon:** Kromozomal yeniden düzenlenmenin etkisi ile gen içerisinde parsiyel duplikasyon meydana gelmekte ve yeni protein izoformlarının gelişmesine neden olmaktadır (26).

**Otokrin aktivasyon:** Hücre-hücre haberleşmesini sağlayan mekanizmalardan biri büyüme faktörleri, sitokinler gibi habercilerin salgılanması ve hedef hücreye bağlanmasıdır. Otokrin hücreler kendi habercilerini kendileri salgılamaktadır. Bu mekanizma klonal ekspansiyona ve tümör gelişmesine neden olabilmektedir. *TGF alfa-EGFR*, *HGF-MET* gibi farklı tirozin kinaz reseptörlerinin otokrin aktivasyonu tanımlanmıştır (26).

Tanımlanan bu mutasyonlar tirozin reseptör kinaz yolağının çok farklı noktalarını etkileyebilmektedir. Yolağın akış yönüne bakarak sıralanınca;

-İlk basamakta büyüme faktörleri yer almaktadır. Büyüme faktörleri, reseptörlerine bağlanarak hücrenin proliferasyonunu sağlamaktadır. Büyüme faktörü basamağındaki mutasyondan gelişmiş bir kanser, büyüme faktörünü taklit eden onkogenler tarafından meydana gelmektedir. Onkogenler reseptöre bağlanarak aşırı ekspresyonu ('overexpression') sağlamaktadır. Bu mutasyona örnek *PDGF-β* zincirinin aktivasyonu ile gelişen astrositom ya da fibroblast büyüme faktörünün aşırı ekspresyonu ile gelişen osteosarkom, mesane karsinomu, meme karsinomu örnek gösterilebilir.

-İkinci adımda yolağın reseptörünü kodlayan onkogenler mutasyona uğrayabilmektedir. Bu mutasyonun sonucunda reseptör büyüme faktörüne ihtiyaç duymaksızın tirozin kinaz aktivasyonunu meydana gelmektedir. Mutasyona uğrayabilecek büyüme faktörü reseptörleri: epitelyal büyüme faktörü reseptör (*EGFR*) ailesinin onkogenleri, *ERBB1-EGFR*, *ERBB2-HER2* (amplifikasyon-meme karsinomu); *FMS* benzeri tirozin kinaz 3 reseptörü onkogeni, *FLT3* (nokta mutasyonu-lösemi); nörotropik faktör için reseptör onkogeni, *RET* (nokta mutasyonu-multipl endokrin neoplazi 2A,B); *PDGF* reseptörü onkogeni, *PDGFR $\beta$*  (aşırı ekspresyon, translokasyon-glioma, lösemi); *KIT* ligand reseptörü onkogeni, *KIT* (nokta mutasyonu-gastrointestinal stromal tümör, seminom); *ALK* reseptörü onkogeni, *ALK* (translokasyon-akciğer adenokarsinom, nokta mutasyonu-nöroblastom)'dır.

-Sinyal ileti yolağı proteinlerini etkileyen protoonkogen mutasyonları: GTP bağlayıcı protein onkogenlerinin nokta mutasyonu, *KRAS* (Kirsten Rat Sarkom) (kolon, akciğer, pankreas tümörleri), *HRAS* (mesane ve böbrek tümörleri), *NRAS* (melanom ve hematolojik maligniteler), *GNAQ* (uveal melanom), *GNAS* (hipofiz adenomu); reseptör ilişkisiz tirozin kinaz onkogeni, *ABL* (translokasyon-kronik miyeloid lösemi, nokta mutasyonu-akut lenfoblastik lösemi); *RAS* sinyal iletimi onkogeni, *BRAF* (nokta mutasyonu,translokasyon-melanom, lösemi, kolon karsinomu); Notch sinyal iletimi onkogeni, *NOTCH1* (nokta mutasyonu, translokasyon, gen yeniden düzenlenmesi-lösemi, lenfoma, meme karsinomu); *JAK/STAT* sinyal iletimi onkogeni, *JAK2* (translokasyon-miyeloproliferatif hastalıklar, akut lenfoblastik lösemi)'dir.

-Nükleer düzenleyici proteinlerden transkripsiyon aktifleştirici olan protoonkogen mutasyonları: *MYC* (translokasyon-Burkitt lenfoma); *NMYC* (amplifikasyon-nöroblastom)'dir.

-Hücre döngüsü düzenleyici siklin protoonkogen mutasyonları: *siklinD1* (*CCND1*) (translokasyon-mantle hücreli lenfoma, multipl miyelom, amplifikasyon-meme ve özefagus kanseri); siklin bağımlı kinaz protoonkogeni *CDK4* (amplifikasyon/nokta mutasyonu-glioblastom, melanom, sarkom)'dür (28).

İnsanlarda meydana gelen çoğu kanserde bahsi geçen bu mutasyonlardan bir veya birkaçı mevcuttur (28).

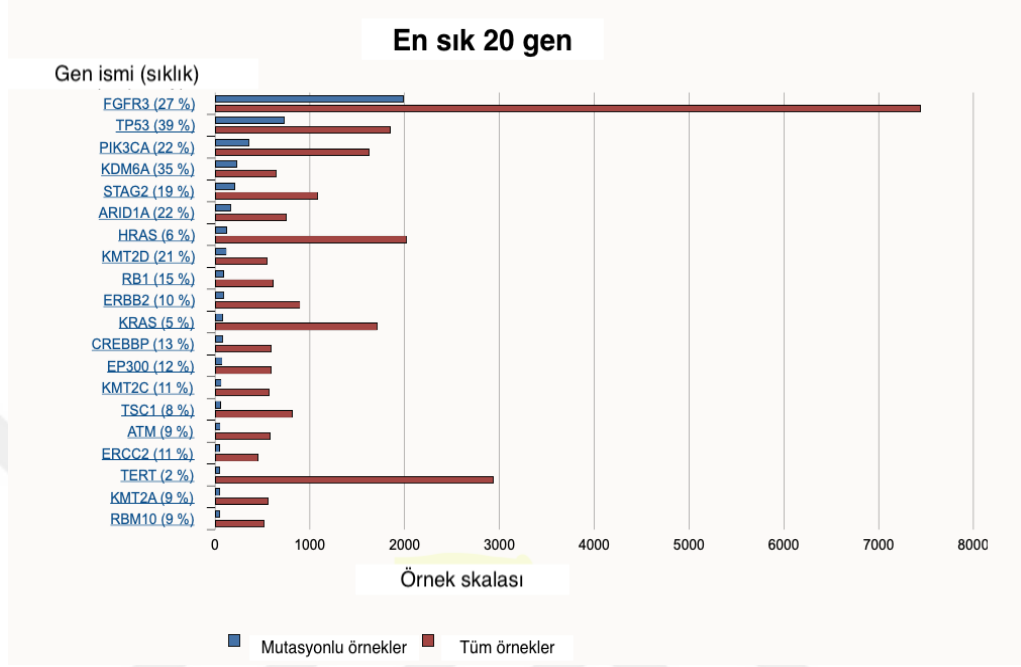
## 2.9. Mesane Kanseri ve Reseptör Tirozin Kinaz Yolağı

Tirozin kinaz reseptörleri kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar (26). MD Anderson Kanser Merkezi'nde yapılan 2000 kanserli hastanın dahil edildiğı çalışmada 46 gendeki mutasyon incelenmiştir. En sık saptanan mutasyonlar sırasıyla *TP53* (%30.8), *PIK3CA* (%12.9), *KRAS* (%11.3), *BRAF* (%7)'dir (6). Kanser Genom Atlas Projesi (TCGA) mesane kanserlerinde 302 mutasyon, 204 segmental kopya sayısı değişikliği ve her bir mesane kanserinde ortalama 22 yeniden düzenlenme olduğunu tespit etmiştir. Hücre döngüsü düzenleme genleri, kinaz sinyal yolakları ve bugüne kadar bilinmeyen dokuz ek gen dahil olmak üzere, tekrarlayan sürücü mutasyonlar toplam 32 gende bulunmuştur.

*FGFR3/RAF/RAS* yolu, hücre döngüsü için önemli olan birkaç geni düzenlemektedir. *FGFR3-TACC3*, invaziv olmayan düşük dereceli mesane tümörlerinde rol oynadığı bilinen bir protein olan *FGFR3*'ü aktive eden oldukça iyi bilinen bir füzyon genidir. Hücre büyümesi ve proliferasyonu gibi karsinogenezdeki süreçleri kontrol eden *PI3K/AKT/mTOR* yolu veya hücre-hücre iletişimindeki önemli bir aktör olan Notch gibi diğer yollar, mesane kanseri gelişiminde mutasyona uğrayan yolaklardandır (21).

Mesane kanserlerinin moleküler sınıflamasında son yıllarda edinilen bilgiler tümör biyolojisi ve hasta prognozu açısından önemli bilgiler kazandırmıştır. Platin bazlı KT'nin hangi hasta grubuna verilebileceğinin seçilmesi de edinilen faydalardan biridir. Bunun yanında hedefe yönelik tedavilerin mümkün olduğu yolaklarda meydana gelen mutasyonların tespiti hastalara hedefe yönelik tedavi şansı doğuracaktır. 97 yüksek dereceli mesane kanserini içeren bir çalışmada tümörlerin %61'inde hedefe yönelik tedavinin uygulanabileceğı *MAPK (BRAF, MEK1 ve MEK2)*, *PI3K (PIK3CA)* benzeri yolaklarda mutasyon saptanmıştır. Uluslararası yapılan yeni nesil sekanslamanın kullanıldığı ortak bir çalışmada 100 metastatik mesane kanserinde *FGFR3* ve *ERBB3* içeren reseptör tirozin kinaz-*RAS* yolağında %39, *PIK3CA* ve *AKT3* içeren *PI3K*-serin/treonin protein kinaz-*mTOR* yolağında %38 oranında mutasyon tespit edilmiştir (30). COSMIC veri setinde de mesane kanserlerinde saptanan en sık 20 mutasyonun geliştiğı genler arasında *PIK3CA* önemli bir yere sahipken *KRAS* da bu genler arasında yer almaktadır (Şekil 7) (31).

Mesane kanserlerinde bu yolakların incelenmesi ve mutasyonların tespit edilmesi hastalar için tedavi şansı doğuracaktır.



Şekil 7. COSMIC veri setinde İÜK olgularında saptanan mutasyon oranları (30).

### 2.9.1. KRAS

Hücre proliferasyonunun, diferansiasyonunun, büyümesinin, migrasyonunun, yaşam döngüsünün kontrolünü sağlayan sinyal ağını aktive eden Rat Sarkom Faktörü (*RAS*) ailesi genleri, 21 kDa ağırlığında, guanozin trifosfat ailesine ait proteinlerini kodlayan protoonkogenlerdir (32). Mitojen aktive protein kinaz (*MAPK*) yolağı aktive mutasyonu olan kanser vakalarının %30'unda gözlenmiş ve bunların %50'sinin *RAS* ailesine ait mutasyonlar olduğu tespit edilmiştir (33). Fonksiyonları neredeyse birbirine denk olan proteinleri kodlayan, homolog sekans özellikte ve çoğu yerde eksprese edilen *RAS* ailesi genleri *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *ERAS*, *MRAS* ve *RRAS*'tır (33). Fonksiyon kazanım mutasyonları çoğu kanserde kodon 12, 13 ve 61 olmak üzere üç noktada yoğunlaşmaktadır. Bu mutasyonlar GTP bağlanmasının kuvvetlenmesine ya da GTPaz aktive edici proteinin engellenmesine neden olarak *RAS* yolağının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (34). Bu mutasyonların hepsi aktive edici olsa da

onkojenik potansiyelleri eşit olmayabilir ve farklı *RAS* mutasyonları kanserlerde değişken yaşam süresi ile seyredebilmektedir. Doku tipleri arasında da her bir mutasyonun sıklığında farklılık olabilmektedir.

*RAS* bağımlı onkogenizin başlayıp devam etmesi için durumun elverişliliğini üç temel faktör arasındaki ilişki ölçmektedir. Bunlar;

-Ekspresyon seviyesi ve aktivasyon durumunu yansıtan *RAS* dozajı. Hangi mutasyonun gerçekleştiği ile ilişkili olarak etkilenen *RAS* oranı %30-90 arasında değişebilmektedir. Aktif durumun dayanıklılığı ise hızlı döngü mutasyonu ya da GAP duyarsız döngü olmasına bağlı değişebilir. Dokuya, mutasyona ve izoformlara bağlı olarak *RAS* aktivasyon derecesi 100 kat değişkenlik gösterebilmektedir. Bu aktivasyonun yüksek olması hücre ölümü ile sonuçlanırken düşük olması onkogeni sağlayacak gücü sağlamamaktadır. Optimum derecedeki aktivasyon tümörögenezi başlatabilmektedir.

-Her bir *RAS* izoformu ve onların mutasyonu ile ilişkili sinyal spesifitesi. İzofom ilişkili sinyallerin, bu izoformların spesifik efektör yolları tercih eden farklı intraselüler yerleşimleri ve farklı biyokimyasal özellikleri sonucunda belirlendiği düşünülmektedir. Örneğin *RAS-RAF* yolağında *KRAS* daha çok *BRAF* için seçici iken *CRAF HRAS* ilişkili sinyal yolağında etkindir.

-Genetik, epigenetik, proteomik haritaların çeşitlilik gösterdiği hücre ve doku içeriği. Hücreler ve dokular arasındaki heterojenite onkogenin hücredeki sürücü alttıpe bağlılığını etkileyerek farklı proliferatif potansiyel ile sonuçlanmasına neden olur (34).

*RAS* mutasyonunun, tümör farklılığı gözetmeksizin, tüm kanserlerin dahil edildiği 4 geniş serili çalışmanın (COSMIC, TCGA, ICGC, BioPortal) meta-analizi sonucunda %19 oranında gözlemlendiği tespit edilmiştir. *RAS* izoformlarından *KRAS* 29 çeşit kanserden 19'unda mutasyona uğrayan ve *RAS* ilişkili mutasyonların %75'inden sorumlu izoformdur. *NRAS* ve *HRAS* daha küçük bir grup kanserde mutasyona uğramaktadır. İzofom ilişkili kanserlerden çoğu *KRAS* ilişkili iken örneğin melanomlarda *NRAS*, tiroit de ise her üç izoform rol oynamaktadır.

Her bir izoformda 19 farklı aktivasyon, kodon 12, 13, 61'deki tek bir baz değişikliği ile meydana gelebilmekte ve bu oluşacak proteinin aminoasit değişikliği ile sonuçlanmaktadır (Örneğin G12V: 12. kodonda glutamin yerine valin geçişi). En sık

gelişen beş mutasyon G12D, G12V, G12C, G13D ve Q61R'dir ve RAS ilişkili mutasyonların %70'inde mevcuttur (35).

*KRAS* insan genom haritasında 12p12.1'de lokalize en sık mutasyona uğrayan izoform olsa da *HRAS* ve *NRAS*'da sık mutasyona uğrayan proteinlerdir (33). Hedefe yönelik tedavi araştırmalarında farnesil transferaz inhibitörü (FTI) 20 yıl önce klinik araştırmalarda başarısız olmuştur, ancak, yapılan çalışmalarda özellikle *hRAS* ilişkili tümörlerde başarı sağlamaktadır ve faz 2 çalışmalarını geçmektedir. Her ne kadar daha çok *HRAS* ilişkili kanserlerde başarı sağlanmış olsa da diğer kanser tiplerinde de etkinliği gösterilmiştir ve gelişmeler *KRAS* direncini kırdığını ve panRAS inhibitörü olarak kullanılabileceğini göstermektedir (35).

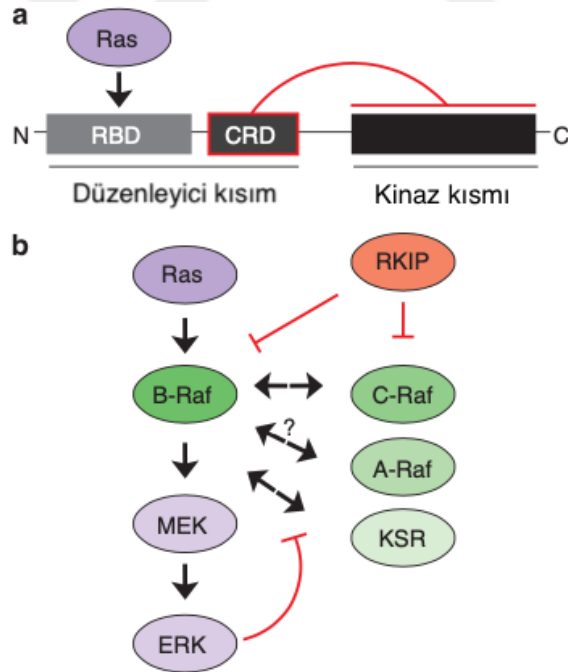
Reddy ve ark ve Taparowsky ve ark kodon 12'deki *HRAS* mutasyonunu mesane kanserinde ilk kez tanımlamışlardır (33). *RAS* mutasyonu yapılan çalışmalarda mesanede %0 ile %45 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir (32). İnvaziv olmayan papiller ürotelyal tümörler *RAS*, *FGFR3*, *PI3K* onkogenlerindeki fonksiyon kazandıran mutasyonların ve kromozom 9'daki delesyonların sonucunda oluşmakta iken (32,34), kasa invaziv mesane kanserleri daha çok tümör baskılayıcı genlerin (*TP53*, *RB*, *PTEN*) fonksiyonlarını kaybettiği mutasyonlar sonucunda gelişmektedir (32). Yapılan deneysel çalışmalarda *KRAS* geninin ürotelyal hiperplazi ve yüzeysel papiller tümör gelişimini etkilediği tespit edilmiştir. Bu nedenle *KRAS* yolağının mesane kanseri gelişimine erken dönemde etkilediği düşünülmüştür (34). Ancak, ileri evre mesane kanserlerinde daha az oranda da olsa *KRAS* mutasyonu izlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *KRAS* mutasyonunun evre ve dereceyi etkilemediği gösterilmiş olmakla birlikte (34), diğer bir çalışmada özellikle invaziv olmayan mesane kanserlerinde *KRAS* mutasyonunun kanser ile ilişkili yaşam süresini belirgin derecede azalttığı görülmüştür ve kasa invaziv olan tümörlerde invaziv olmayanlara göre daha sık mutasyona rastlanmıştır (32).

### **2.9.2. BRAF**

*RAF-MEK-ERK* sinyal yolağı *RAS* ile aktive olan ve büyüme faktörü, sitokin ve hormonlara yanıt olarak hücre büyümesini, proliferasyonunu, diferansiasyonunu sağlayan reseptör tirozin kinazın sitoplazmik kaskadıdır. *RAS* ve *RAF*'ın onkojenik

formlara transformasyon göstermesi keşiflerine neden olmuştur. *RAF*-1 olarak da bilinen *CRAF*'ın katalitik ünitesinin retroviral gag proteini ile füzyona uğraması ve *CRAF*'ın serin-treonin kinazının yapısal aktivasyonu ile sonuçlandığı onkojen yakalama deneyinde *RAF* ailesinin ilk üyesi olarak tanımlanmıştır. Bu deneyden dört yıl sonra *BRAF* benzer şekilde keşfedilmiştir (36).

*RAF* aktivasyon modeli N terminal uçta düzenleyici kısım ve C terminal uçta kinaz kısmı olmak üzere iki bölümden meydana gelmektedir. Düzenleyici kısımda yer alan *RAS* bağlayıcı alana (RBD) *RAS*'ın bağlanması ile sisteinden zengin alan kinaz kısmından ayrılır ve kaskadın aktivasyonuna neden olur (Şekil 8A) (36). *RAF* proteinin *RAS* bağlayıcı kısmının *RAS-GTP* ile etkileşime geçmesi *RAF*'ı fosforile ederek serin treonin kinazı uyardır. Bu uyarı ile öncelikle *MEK* (mitojen ekstraselüler kinaz) fosforile olmakta ve *ERK* (ekstraselüler sinyal yolağı kinaz)'ın fosforilasyonunu sağlamaktadır. Aktive *ERK* proliferatif sinyalleri nükleusa geçerek iletmektedir (33). *RAS-ERK* yolağın sessizleştirilmesi ise *ERK*'in negatif feedback etkisi ile ya da Raf kinaz inhibitör proteininin (*RKIP*) *RAF*'ı inhibe etmesi yoluyla sağlanmaktadır. *RKIP* aktivasyonu çoğu kanserde kayıptır (Şekil 8B) (36).



Şekil 8. *RAF*'ın yapısı ve *RAS/RAF/MEK/ERK* ile ilişkisi (35).

A) *RAF* şematik şekli. Her *RAF* proteini düzenleyici ve kinaz kısımlarına sahiptir. Sessiz olan hücrelerde kısımlar arasındaki ilişki hücrenin katalitik aktivasyonunu engellemektedir. Sisteinden zengin kısım (CRD) bu inhibisyon için gereklidir. *RAS* bağlayıcı kısma (RBD) *RAS*'ın bağlanması ile bu inhibisyon sona ermektedir. *ARAF* ve *CRAF* tam aktivasyon için bu basamak dışında ek adımlara ihtiyaç duymaktadır.

B) *ERK* yolağının düzenlenmesi. *RAF* kinazlar homo/heterodimerizasyon ile aktifleşebilmektedir. Dimerizasyon *RAS* ile aktive olmaktadır ve sadece *RAF* ile değil psödokinaz olan *KSR* ile de farklı kombinasyonlarda gelişebilmektedir. *ERK*'in zıt etkileşimi negatif feedback ve dimerizasyonu engellemektedir. *RKIP* inhibitör bir proteindir ve kanserlerde sıklıkla ekspres olmamaktadır.

İnsanda üç *RAF* izoformu tanımlanmıştır; *ARAF*, *BRAF*, *CRAF* (*c-Raf-1*). *ARAF* ve *CRAF* proteinlerinin tamamen aktive olabilmeleri için kinazın N terminal ucunda daha fazla serin-treonin fosforilasyonuna ihtiyaç duyarken *BRAF*'ın bazal kinaz aktivitesi çok daha yüksektir (37) ve *MEK* fosforilasyonunu daha kuvvetli sağlamaktadır (33). Yapılan gen ablasyon deneylerinde çoğu sistemde *MEK-ERK* yolağı aktivasyonu için *BRAF* temel gereksinim olarak tespit edilmiştir (36).

*RAS-ERK* sinyal yolağının aktivasyonu kanserlerin yaklaşık %15'inde tespit edilmiştir (37). *RAF* proteini kanser gelişimini genomik instabiliteyi bozarak, kendi kendine yeterli sinyal üretimini, apoptozise duyarlılığın kaybını, sınırsız replikasyon özelliği kazanımını, anjiyogenezin devamlılığını, doku invazyon ve metastazını sağlaması gibi birçok yoldan etkileyebilmektedir. Genomik instabilite çoğu kanserin gelişimine neden olan bir özelliktir. *CRAF*, genomik instabiliteye neden olan sık rastlanan bir mutant olmamakla birlikte mesane kanserlerinde *CRAF* amplifikasyon ve delesyonlarının tümör progresyonunu ve genel yaşam süresini olumsuz etkilediği görülmüştür (36).

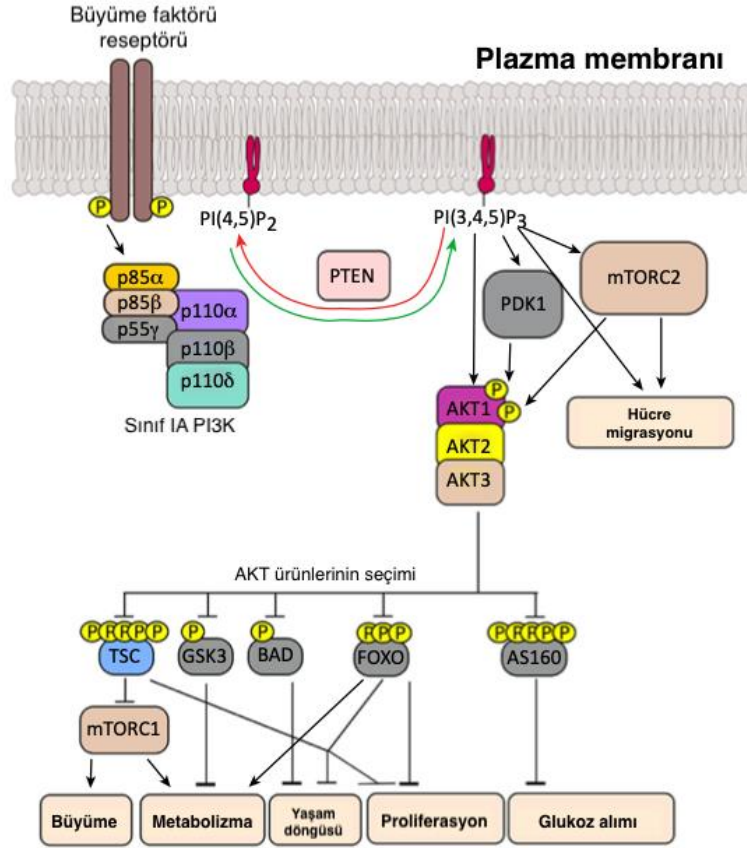
Bu yolda görevli *BRAF* geninin somatik mutasyonu başta melanom olmak üzere kolorektal karsinomlar, over ve tiroit karsinomları, akciğer adenokarsinomu gibi birçok kanserde gözlenmiştir (33,38). *RAS-RAF-MAP* kinaz, *MEK-ERK-MAP* kinaz yolaklarının aktivasyonunun farklı seviyelerde mutasyon geliştirebileceği ve bu kanserlerde mutasyonların farklı oranlarda aktifleştirici etkisinin olduğu düşünülmüştür (38).

*BRAF* geni ilişkili sekans analizlerinde, çoğunluğu kinaz kısmında olmak üzere 30 farklı ‘missense’ mutasyonu tanımlanmıştır. *BRAF* proteinin en sık mutasyona uğrayan bölgeler *DFG* ve *APE* motiflerinin bulunduğu ya da bitişiğindeki 10-30 amino asit bölgesinde tespit edilmiştir (37,38). Bu mutasyonların %90’ından fazlası *BRAFV600E* olarak da bilinen 599’uncu kodonda (V599) glutamin yerine valinin kodlanması ile sonuçlanırken diğer sık görülen lokalizasyonlar E585, F594, G595, L596’dır. 599’uncu bölgede meydana gelen mutasyon *RAS’dan* bağımsız olarak *ERK* aktivasyonunu uyararak kinaz aktivitesini belirgin olarak yükseltir (37). Yapılan çalışmalarda *RAS* ve *BRAF* onkogenlerinin aynı tümörlerde mutasyona uğrayabildiği gözlenmiştir. Bu durum *RAS* ve *RAF’in* onkojenik yollarının benzer olduğunu ve *RAS’in BRAF’in* aktivasyonuna neden olabildiğini düşündürmektedir (37). Davies ve ark 545 kanser vakasına ait hücre hattında *RAF* mutasyonu yanı sıra *RAS* mutasyonları da bakılmış ve %13’ünde tespit edilmiştir. *RAS* mutasyonu olan vakaların üçünde eş zamanlı *RAF* mutasyonu da izlenmiştir, ancak bu *RAF* mutasyonları V599 haricindeki lokalizasyonlara ait mutasyonlardır. Bu durum V599 kodonuna ait mutasyonların *RAS’dan* bağımsız olduğunun göstergesidir (38).

### 2.9.3. PIK3CA

Sinyal iletileri olarak görev yapan fosfoinositid kinazlar (*PIK*) fosfoinositidin inositol halkasını fosfatlayan lipit kinazlardır. Karbonhidratın fosfatladığı kısma göre üç formu mevcuttur: fosfoinositid 3-kinaz, fosfoinositid 4-kinaz, fosfoinositid 5-kinaz. Fosfoinositid 3-kinaz (*PI3K*)’ın IA sınıfında bulunan 3 katalitik subunit (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\gamma$ ), 5 düzenleyici subunit (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p85 $\gamma$ , p50 $\alpha$ , p55 $\alpha$ ) ile heterodimer oluşturmaktadır (39). Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3 kinaz, katalitik subunit alfa (*PIK3CA*) 85 kDa ağırlığında düzenleyici kısmı ve 110 kDa ağırlığında katalitik kısmı, 3q26.32 kromozom tarafından kodlanan serin/treonin kinazdır. Reseptör tirozin kinaz iki ana sinyal yolağını uyarır: *RAS-RAF* ve *PI3K* (4). *PI3K* aktivitesi oldukça kısıtlı olup geçici ve lokalize fosfatidilinositol trifosfat (*PIP3*)’ın oluşumunu sağlamaktadır. Sinyal yolağının negatif ‘feedback’ etkisi ve lipit fosfatazların aktivitesi sinyali sonlandırır. Tümör baskılayıcı etkisi olan *PTEN* en önemli lipit fosfatazlarıdır ve *PIP3’i PI(4,5)P2’*a geri dönüştürür (40).

*PIP3*, serin/treonin kinazların (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3* gibi) tutunmasına destek olmaktadır (39). *AKT* proteinleri sitoplazmaya tutunduklarında protein bağımlı kinaz 1 (*PDK1*) tarafından fosfatlanarak aktifleşmektedir (4). *AKT*; *mTOR*, *bad*, *TSC*, *GSK3* gibi birçok proteini etkileyerek hücrel migrasyonu, büyümeyi, metabolizmayı, proliferasyonu vb fonksiyonların sürdürülmesinde rol almaktadır (Şekil 9) (40).

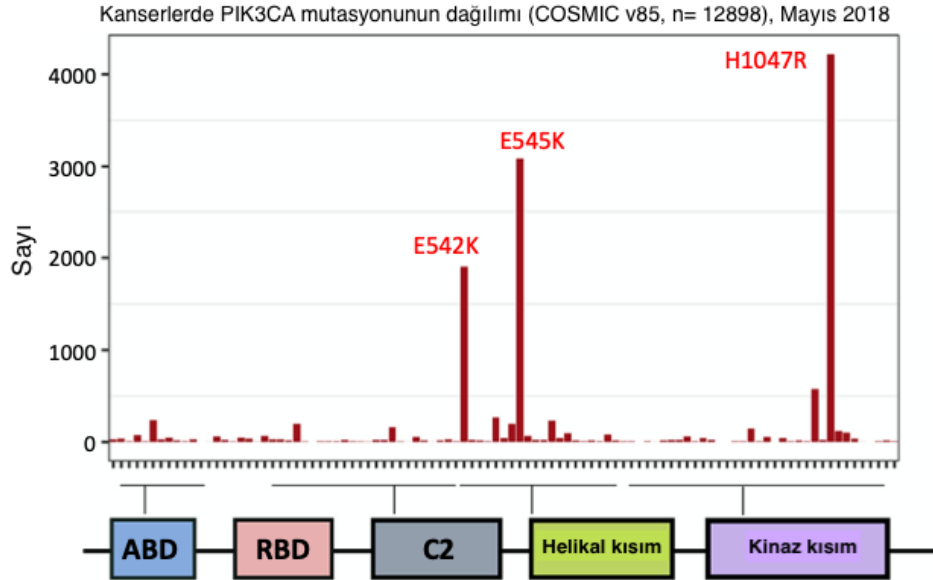


Şekil 9. *PI3K* sinyal yolağı kaskadı (40).

Kinaz aktivitesinin viral onkojenlerle ilişkili olduğu gösterildiğinde, *PI3K*'ın özellikle *PIK3CA* tarafından kodlanan (41) p110α subunitinin kanserojen etkisi önemsenmeye başlanmıştır (39). Avian ve murin retrovirüslerin hücrel *PIK3CA* ve *AKT* genlerinin onkojenik türevlerini kodlamasının keşfi *PIK3CA* yolağının kanserojen etkisini desteklemiştir (39). İlk defa kolon kanserlerinde tanımlanan mutasyon (38) meme kanseri (>%30), endometrium kanseri (>%30), mesane kanseri (>%20), baş boyun skuamöz hücreli karsinomları (>%15) başta olmak üzere birçok

kanserde tespit edilmiştir (40). Kanserlerde, p110 izoformlarında da gen amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu meydana gelebilmektedir. P110a en sık mutasyona uğrayan izoform olup *RAS* bağlayıcı kısım hariç tüm proteini içerecek şekilde mutasyona uğramaktadır. *PIK3CA* mutasyonlarının %80'inden fazlası üç noktada yoğunlaşmaktadır: helikal kısımda glutamatı (E) kodlayan 542. ve 545. kodon ile C terminal uçtaki kinaz kısmında histidin (H) kodlayan 1047. kodon. Bu 'hotspot'/yoğun bölgeler enzimatik aktivasyonda ve biyolojik cevabın gelişiminde en fazla etkiye sahiptirler (Şekil 10) (40).

Kanserlerde *PI3K* sinyal yolağında, *PTEN* ve *LKB1* gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve/veya delesyonu, *AKT1*, *AKT2*, *PDK1*, *PIK3CA*, *PIK3R1* gibi protoonkogenlerin aktivasyonu ve/veya amplifikasyonu gibi birçok genomik değişiklik tanımlanmıştır. *ERBB* reseptörlerinin uyarımındaki artış da yolağı aktive edebilmektedir (42). Fosfoinositid 3 kinaz/protein kinaz B (*PIK3/AKT*) sinyal yolağı kanserlerde regülasyonu en sık bozulan yolaklardan ve mesanenin karsinogenezinde etkin bir rol üstlendiği düşünülmektedir (4).



Şekil 10. *PIK3CA* geninde mutasyona uğrayan 'hotspot'/yoğun bölgeler (40).

## 2.10.Mesane Kanserinde Tanımlanmış Moleküler Yolaklar

Mesane kanseri moleküler ve klinikopatolojik olarak heterojen bir tümördür. Geniş genom ekspresyon ve moleküler profil çalışmalarında mesane kanserleri spesifik moleküler özellikleri, prognozları ve tedavilere yanıtları açısından kategorize edilmişlerdir (43).

Moleküler haritaları belirlenirken mesane kanserlerinde düşük ve yüksek dereceli kanserleri ayırmak için temelde iki yol belirlenmiştir. Düşük dereceli grupta invaziv olmayan düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom (NİDDPÜK) mevcut olup bu tümörün gelişiminde; hücre büyümesini, proliferasyonunu ve diferansiasyonunu sağlayan *MAPK* ve *PI3K* sinyal yollarındaki *FGFR3* ve *HRAS*'da mutasyonlarının etkin olduğu görülmüştür (44). *HRAS* erken dönemde tespit edilen moleküler değişikliklerdendir. *RAS* proteinin ilişkili olduğu yolağın reseptörü *FGFR3*'tür. *HRAS* ve *FGFR3*'te meydana gelen mutasyonlar benzer sonuçlara neden olmaktadır. Her iki mutasyon invaziv olmayan ürotelyal karsinomların yaklaşık %82'sinde belirlenmiştir. *PI3K* yolağı *PIK3CA* mutasyonu ile aktifleşmektedir. ÜK'larda bu mutasyon %25-48 oranında mevcut olup bu tümörlerin de çoğu NİDDPÜK'lardır (44).

Yüksek dereceli grup ise İSK, NİYDPÜK, İÜK içermekte olup gelişimlerinde hücre siklusunda G1/S kontrol noktasında görevli *p53* ve *RB* proteinlerindeki mutasyonların neden olduğu tespit edilmiştir (44).

Kasa invazyon gösteren mesane kanserleri gen ekspresyonlarına göre moleküler alttiplere ayrıştırılmıştır. Bu moleküler alttipler klinik seyir, histoloji ve tedaviye yanıt ile ilişkili bulunmuştur (45). Moleküler sınıflama Kanser Genom Atlas Projesi Konsorsiyum'u (TCGA), Lund üniversitesi, MD Anderson Kanser Merkezi ve Kuzey Carolina üniversitesi başta olmak üzere farklı kurumlar tarafından yapılmıştır. Bu moleküler sınıflama sistemlerinde terminoloji değişik olsa da her kurum benzer alttipler tanımlamıştır; -Luminal tümörler, -Bazal/skuamöz tümörler ve -Nöronal/küçük hücreli tümörler. Luminal tümörler *GATA3* ve üroplakin gibi ürotelyal diferansiasyonu gösteren genleri yüksek oranda eksprese ederken, bazal/skuamöz tümörler yüksek moleküler ağırlıklı keratin (hmwck) ve *p63* gibi bazal-skuamöz diferansiasyon göstergesi olan genleri eksprese etmektedir. Luminal tümörlerin çoğu NİDDPÜK ile ilişkili olup *CDKN2A* kaybı ve *FGFR3*'ün mutasyonunu

göstermektedirler. Diğer yandan bazal/skuamöz tümörlerde yüksek oranda *p53* mutasyonu mevcuttur. Nöronal tümörler morfolojik olarak olağan ÜK benzemektedir. Bu gruptaki tümörler luminal veya bazal/skuamöz markırları içermemektedir ve *SOX2*, *TUBB2B* gibi nöroendokrin genlerin ekspresyonu görülmektedir (45).

Sınıflama sistemlerine göre bu alttipler de farklı kategorilere ayrıştırılmıştır. TCGA'nın yapmış olduğu sınıflamada luminal tümörler biyolojik özelliklerine göre luminal-infiltratif, luminal, luminal-papiller olarak üç grupta sınıflandırılmıştır. Luminal infiltratif grup kuvvetli stromal ve inflamatuvar sinyalleri içerirken luminal sınıf sadece stromal yanıt sahiptir. Luminal-papiller tümörler stromal veya inflamatuvar yanıt içermemektedir. Lund üniversitesi ise luminal tümörleri hücre siklus döngüsüne göre ürotelyal benzeri ve genetik olarak kararsız gruplara ayırmaktadır. Bu gruplar immünohistokimyasal olarak farklı paternlere sahiptirler; ürotelyal benzeri grupta *siklinD1* ve *RBI* ekspresyonu, *p16* kaybı mevcutken genetik olarak kararsız grupta tam tersi söz konusudur. Ürotelyal benzeri grupta *FGFR3* mutasyonu (en sık ekzon 7 veya ekzon 9'da nokta mutasyonu) da görülmektedir (45).

Bazal/skuamöz tümörler Kuzey Carolina üniversitesinin sınıflamasında Claudin ekspresyonu, *EGFR* amplifikasyonuna göre iki gruba ayrılmıştır. Lund üniversitesinin sınıflamasında bazal/skuamöz grup, inflamatuvar sinyallere göre bazal/skuamöz-infiltratif, bazal/skuamöz ve *ZEB2* ekspresyonu gösterenleri mezenkimal benzeri olmak üzere üç grupta sınıflanmıştır (45).

ÜK moleküler sınıflamasında farklı kurumlarda temelde aynı gruplar ve yollar baza alınmıştır. Bu sınıflar prognoz, tedaviye yanıt ve klinik seyir açısından önemli farklılıklar göstermektedirler. TCGA'nın sınıflamasında luminal-papiller grup tümörler en iyi prognozlu, nöronal benzeri grup en kötü prognozlidir. Benzer şekilde Lund üniversitesinin sınıflamasında ÜroA grubu en iyi prognozlu, ÜroB ve küçük hücreli/nöroendokrin grup en kötü prognozlu seyretmektedir (45). Luminal grupta yüksek oranda görülen *FGFR3* mutasyonu da iyi prognozla ilişkilidir (30). Kötü prognoz göstergesi olan multifokalite, eşlik eden İSK, invazyon derinliği ve lenfovasküler invazyon genetik olarak kararsız ve skuamöz hücreli karsinom benzeri gruplarda daha sık gözlenmiştir (21).

İleri evre mesane kanserli hastalarda yaklaşık 30 yıldır uygulanan platinum bazlı kemoterapilere yanıt her hastada aynı olmamaktadır. Kemoterapiden (KT) fayda

sağlamayan hastalar toksik yan etkilere sahip bu ilaçları gereksiz yere almaktadırlar. Moleküler sınıflamaya göre KT'den yarar sağlayan grup daha net belirlenebilirse gereksiz ilaç alımı da önlenmiş olacaktır. Örneğin luminal tip kanserler neoadjuvan kemoterapiden (NAK) fayda görmezken bazal/skuamöz tip kanserler NAK yanıt vermektedirler (43). Tümörün gelişmesinde etkin mutasyonlar DNA hasarına bağlı oluşur ise ya da *p53* mutasyonunun görüldüğü genomik olarak stabil olmayan grupta ise KT'den daha çok fayda görebileceği düşünülmüştür (30). Çok merkezli bir çalışmada da bazal tipteki tümörler NAK'den en çok fayda gören grup olarak bulunmuştur. Moleküler sınıflamaya göre tedavi etkinliğinin belirlenmesinde ilerlemeler kaydedilmiş olsa da Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (ISUP) henüz NAK'nin moleküler alt sınıflara göre şekillenmemesi gerektiğine karar vermiştir (45).

Bazı İÜK varyantlarının transkripsiyonel fenotiplerinin moleküler sınıflara uyum sağladığı gösterilmiştir. Nested varyant ÜK ürotelyal benzeri/luminal alttipe, mikropapiller varyant luminal sınıflandırılmamış alttipe, lenfoepitelyoma benzeri bazal benzeri alttipe, plazmositoid varyant ürotelyal benzeri alttipe, sarkomatoid varyant ve skuamöz diferansiasyonlu ÜK bazal/skuamöz alttipe uyumlu olarak izlenmiştir (25).

Somatik mutasyon profil tespiti ve gen ekspresyonunun kullanıldığı kasa invaziv mesane kanserlerinin moleküler sınıflamasında ayrı düşünceler olsa da temelde luminal ve bazal alttiplere ayrılabilceği düşünülmüştür. 2016'da yapılan konsensüs çalışmasında bazal-skuamöz benzeri grubun (CK5+, CK14+, GATA3-, FOXA1-) varlığı hakkında ortak görüş sağlanmıştır (30).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2018.04.02.838) ve Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından verilen 2018/94 no'lu etik kurul onayı ile yürütülmüştür.

#### 3.1. Olgu Seçimi

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Bölümünde 2015-2019 yılları arasında tanı almış infiltratif ürotelyal karsinom olguları (n:51) tarandı.

➤ Dahil edilme kriterleri;

- 1-İnfiltratif ürotelyal karsinom tanısının histopatolojik incelemede doğrulanması,
- 2-Yeterli klinik bilginin bulunması,
- 3-Analiz için yeterli tümöral dokunun bulunması,
- 4-Kas (muskularis propria) invazyonunun olması (Evre pT2 ve üzeri),
- 5-Farklı diferansiasyon gösteren ve göstermeyen grupların eşit sayıda olması, olarak belirlendi. Bu kriterleri sağlamayan veya blokları arşivde bulunmayan vakalar çalışmanın dışında tutuldu.

#### 3.2. Klinik Verilerin Toplanması, Morfolojik Değerlendirme ve Tümör Alanı Seçimi

Dahil edilme kriterlerine göre 24 olgu çalışmaya alındı. Olguların klinik ve demografik verileri hastane bilgi işletim sistemi, patoloji raporları ve klinik dosyalarından derlendi.

Hematoksilen&Eozin boyalı lamalar histopatolojik özellikleri (diferansiasyon varlığı, tümör evresi, lenfovasküler invazyon, nekroz varlığı vb) Dünya Sağlık Örgütü 2016 sınıflaması ve AJCC kanser evreleme kılavuzu 8. baskısı baz alınarak tekrar değerlendirildi. Mikroskopik incelemede moleküler çalışmanın tümöral DNA yükünün efektif olabilmesi için, desmoplastik stroma, inflamatuvar infiltrat yoğunluğu az olan ve nekroz içermeyen invaziv tümör alanları işaretlendi. Arşiv bloklarından bu

alanlar bistüri yardımı ile diseke edildi, ependorf tüplerinde muhafaza edildi (Şekil 11).



**Şekil 11.** Parafin bloklardan tümör alanlarının bistüri yardımı ile makrodiseksiyonu.

### **3.3. Moleküler Yöntem**

Her olgunun materyali DNA izolasyonu ve moleküler çalışma için sırasıyla aşağıdaki işlemlere tabi tutuldu;

#### **➤ Deparafinizasyon:**

- 1-Parafinize dokunun 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınması ve 1 ml ksilen eklenmesi, vorteks ile 10 saniye titreştirilmesi,
- 2-İki dakika oda sıcaklığında santrifüjlendikten sonra süpernatantın tüp içerisinden oluşan pıhtıya dokunmaksızın uzaklaştırılması,
- 3-Kalan ksilenin uzaklaştırılması için 1 ml %96-100'lik etanol ile vorteks yapılması, oda sıcaklığında 2 dakika santrifüjlenmesi,
- 4-Süpernatantın alkolün hepsi ayrıştırılacak şekilde pıhtıya dokunmaksızın uzaklaştırılması,
- 5-Tüpün ağzı 37°C de 10 dakika açık bırakılarak kalan etanolün buharlaştırılması ile deparafinizasyon neticelendirildi.

➤ DNA ekstraksiyonu:

Ekstraksiyon işlemi QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Almanya) ile yapılmıştır.

1-Tüp içerisindeki pellete 180  $\mu$ l Buffer ATL, 20  $\mu$ l Proteinaz K eklenmesi ve vortekslenmesi,

2-56°C de 1 saat boyunca veya pellet tamamen eriyene kadar inkübasyon,

3-Formaldehitin etkisinin geri döndürülmesi için 90°C de 1 saat inkübasyona devam edilmesi (Şekil 12) (1 saatten uzun süren işlemlerde DNA fazla parçalanacağından sürenin aşılmasına dikkat edilmiştir.),

4-Tüp duvarında ve kapağında kalan damlaların toparlanması için santrifüjleme yapılması,

5-200  $\mu$ l Buffer ATL ve 200  $\mu$ l %96-100'lük etanol eklenmesi ve vortekslenmesi,

6-Elde edilen lizatın QIAamp MinElute kolonuna (2 ml'lik koleksiyon tüpü içerisinde) alınması (Şekil 13),

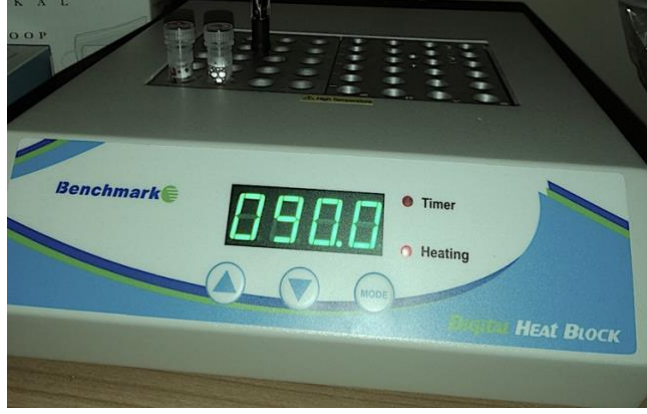
7-6000 x gm (8000rpm)'de bir dakika süresince santrifüjlenmesi,

8-Kolona sırasıyla 500  $\mu$ l Buffer AW1 ve AW2'nin alınarak 6000 x gm (8000rpm)'de santrifüjlemenin birer dakika tekrarlanması,

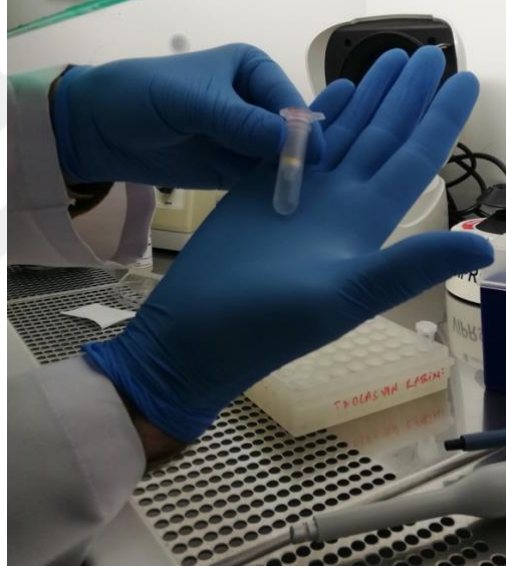
9-20000 x gm (14000rpm) üç dakika santrifüjlemenin devam ettirilerek membranın tamamen kurumasının sağlanması,

10- QIAamp MinElute kolonunun yeni bir tüpe alınması ve 20-100  $\mu$ l Buffer ATE eklenmesi,

11-DNA alanının arttırılması için oda sıcaklığında 1-5 dakika süresince inkübasyon yapılması ve bir dakika boyunca 20000 x gm (14000rpm) de santrifüjleme yapılması ile DNA ekstraksiyonu sağlandı.



**Şekil 12.** Ekstraksiyon esnasında formaldehit etkisinin geri kazanılmasını sağlayan 90°C de inkübasyon.



**Şekil 13.** Ekstraksiyon ürününün QIAamp MinElute kolonuna alınması.

➤ PCR İşlemi:

DNA izolasyonu sağlanan olguların DNA değerleri Colibri Nanodrop cihazında ölçüldü (Şekil 14). Her materyalden yeterli DNA elde edildi. PCR işlemi *KRAS/BRAF/PIK3CA* Array (RANDOX) kitinin Multipleks PCR protokolü ile gerçekleştirildi.

1-Kullanılacak her reaksiyon içeriği oda sıcaklığına getirildi,

2-‘Template’ DNA, TE Buffer’da pH 8.0’de 20 ng/µl olacak şekilde hazırlandı,

3-*KRAS/BRAF/PIK3CA* PCR Master Miks (10  $\mu$ l) ve Primer Miksi (5  $\mu$ l) ‘Template’ DNA (5  $\mu$ l) ile mikrosantrifüj tüpüne alındı.

4-İyi bir karışım elde etmek için vorteks işlemi uygulandı, birikimin sağlanması için santrifüjlendi,

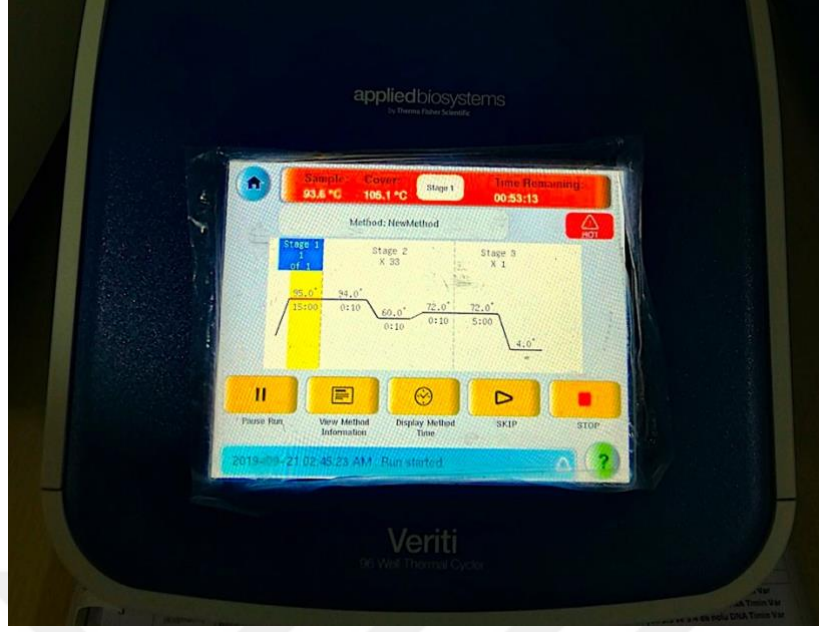
5-Tüpler, ilk denaturasyonun sağlanması için 15 dakika boyunca 95°C de termal döngüye yerleştirildi ve inkübasyon sağlandı,

6-PCR amplifikasyonu 10 saniye 94°C de denaturasyon, 10 saniye 60°C de primerin bağlanması, 10 saniye 72°C de uzama işlemini içeren 33 döngü ile yapıldı,

7-Son uzama 5 dakika 72°C de sağlandı (Şekil 15).



Şekil 14. DNA ekstraksiyonu sonrası DNA miktarlarının ölçülmesi.

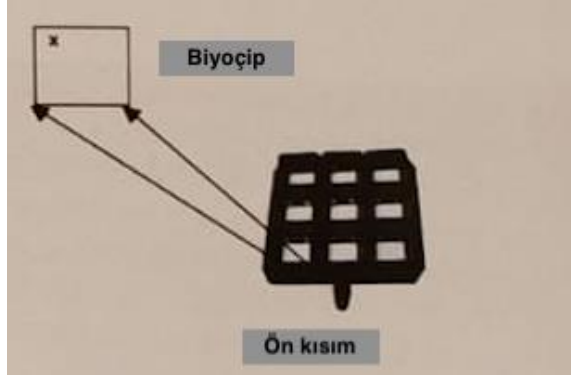


**Şekil 15.** PCR işlemi döngü basamaklarının süre ve ısı değerlerinin cihaz üzerinde gösterimi.

➤ Mikroarray Hibridizasyonu:

PCR ürünlerinin hibridizasyonu, görüntülemesi ve sonuç eldesi için Evidence Investigator (RANDOX) cihazının EV3799A/B *KRAS/BRAF/PIK3CA* Array kiti kullanıldı.

Hibridizasyon 60°C de, konjugasyon 37°C de gerçekleştiğinden iki adet ısı sağlayıcı 'Evidence Investigator thermoshaker' gerekli sıcaklıklara kalibre edildi. İşleme başlamadan önce 'Hibridizasyon Buffer EV889', 'Primer Wash Buffer' ve 'Sekonder Wash Buffer' 60°C ye; '*KRAS/BRAF/PIK3CA* Conjugate', 'Wash Buffer', biyoçipler ve PCR ürünleri oda sıcaklığına getirildi, PCR ürünleri biyoçiplere pipet yardımı ile alındı (Şekil 16) ve sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.



**Şekil 16.** PCR ürünleri pipet yardımı ile biyoçiplere şekilde gösterilen alandan damlatılarak nakledilmesi.

1-PCR ürünleri 95°C de 5 dakika süresince termal döngüde denatüre edildi ve buz üstüne yerleştirildi.

2-‘Hibridizasyon Buffer EV889’ 60°C lik inkübatörden alınarak her biyoçipe 245 µl eklendi, denatürasyonu sağlanmış PCR ürününden her biyoçipe 7 µl ilave edildi. Hibridizasyon esnasında ürünlerin buharlaşmasını engellemek için taşıyıcılar biyoçipler tamamen kapanacak şekilde sızdırmaz folyo ile örtüldü.

3-Taşıyıcılar 60°C, 370 rpm’de 30 dakika inkübe edildi.

4-İnkübasyon bittikten sonra folyo dikkatlice kaldırılarak hibridizasyon reaksiyonu atıldı.

5-Sırasıyla ‘Primer Wash Buffer’ ve ‘Sekonder Wash Buffer’ 60°C lik inkübatörden alınarak biyoçiplere 250 µl eklendi ve 60°C, 370 rpm’de 2 dakika inkübe edildi, reaksiyonlar işlem sonunda atıldı.

6-Hızlıca ‘Wash Buffer’ (oda sıcaklığına getirilmiş) ile biyoçip başına 250 µl ekleyerek üç hızlı yıkama işlemi yapıldı.

7-Oda sıcaklığındaki ‘KRAS/BRAF/PIK3CA Conjugate’ her biyoçipe 250 µl ekleyerek 37 °C sıcaklıkta 370 rpm’de 30 dakika inkübe edildi, işlem sonunda reaksiyon atıldı.

8-‘Wash Buffer’ ile beş hızlı yıkama işlemi yapıldı, ‘Wash Buffer’ eklenerek (en fazla 30 dakika sürecek şekilde) ve karanlık bir ortama alınarak okuma işlemi için sıraya konuldu.

9-Sinyal reaktifi (LUM/PX) konmadan hemen önce ‘Wash Buffer’ döküldü, 250 µl sinyal reaktifi eklendi ve ışıktan korumak için üzeri kapatıldı.

10-İki dakika (+/- 10 saniye) bekletildikten sonra ‘Evidence Investigator’ın okuyucu haznesine konuldu, mutasyon analizi cihazın önceden tanımlanmış yazılımı ile sağlandı. Tablo 2’de analiz edilen genler, hedef kodonları ve baz değişimleri gösterilmiştir.

**Tablo 2.** ‘Randox Evidence Investigator’ ile analiz edilen *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyon kodonları ve aminoasit değişimleri

<i>Gen</i>	<i>Hedef kodon</i>	<i>Baz değişikliği</i>
<i>BRAF</i>	V600E	GTG>GAG
<i>KRAS</i>	G12A	GGT>GCT
	G12R	GGT>CGT
	G12D	GGT>GAT
	G12C	GGT>TGT
	G12S	GGT>AGT
	G12V	GGT>GTT
	G13D	GGC>GAC
	G13C	GGC>TGC
	G13R	GGC>CGC
	Q61K	CAA>AAA
	Q61L	CAA>CTA
	Q61R	CAA>CGA
	Q61H (1)	CAA>CAC
	Q61H (2)	CAA>CAT
<i>PIK3CA</i>	A146T	GCA>ACA
	A146P	GCA>CCA
	E542K	GAA>AAA
	E545K	GAG>AAG
	H1047R	CAT>CGT

### 3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki tüm verilerin uygun tanımlayıcı istatistikleri (ortalama, standart sapma, medyan, standart hata, minimum, maksimum, yüzde) hesaplandı. Nicel değişkenlerin normallik ve grup varyanslarının homojenlik varsayımları için sırasıyla Shapiro Wilk ve Levene testleri kullanıldı. Nicel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmasında bağımsız örneklem t testinden (Independent samples t test) yararlanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler Pearson ki-kare (chi-square), Fisher Freeman Halton (post hoc Bonferroni testi), Fisher exact testleriyle incelendi. Değişkenler arasındaki ilişkileri incelemek için değişkenlerin türlerine göre kontenjans (contingency, rc) katsayısı, nokta iki serili (point biserial, rp) ve Kendall tau b (rk) korelasyon katsayıları hesaplandı. Gruplar arası sağkalım hızlarını karşılaştırmak ve sağkalım süresini etkileyen faktörleri incelemek için Kaplan Meier sağkalım analizi ve Log rank testi uygulandı. İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 22 programı ve özel syntaxler kullanıldı.  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1.Klinik ve Demografik Bulgular

Çalışmamıza 22 erkek (%91,7), 2 kadın (%8,3) hasta olmak üzere 24 olgu dahil edildi. Erkek hasta popülasyonu belirgin olarak yüksekti (E/K:11/1). Hasta yaşları 56-88 arasında olup, ortalama yaş  $70,2\pm 9,1$  idi. Hastaların 14'ünde sigara içme öyküsü mevcuttu (ortalama 55 paket/yıl). Onkoloji dosyalarına ulaşılabilen hastaların 14'ü kemoterapi almıştı (2-6 kür arasında değişen). Beş hasta gemitabin+sisplatin tedavisini neoadjuvan olarak, bir hasta hem neoadjuvan hem de adjuvan olarak, beş hasta ise adjuvan olarak almıştı, adjuvan tedavi alan hastaların ikisinde gemitabin+sisplatin kürlerinden sonra paklitaksel tedavisi de uygulanmıştı. Bir hasta neoadjuvan gemitabin+sisplatin ile adjuvan paklitaksel tedavisi almıştı. Adjuvan tedavi alan hastaların biri gemitabin+karboplatin tedavisi görmüşken bir hastanın tedavi protokolüne ulaşılamadı. Kemoterapi almayan hastaların üçü radyoterapi almış, beş hasta tedavi almamış, ikisi ise takip dışı kalmıştı. Ortalama takip süresi 14,2 ay (Min-Maks:1-39) olan olguların 18'i vefat etmişti. Olguların klinik ve demografik verileri Tablo 3'de gösterildi.

**Tablo 3.** İnfiltratif Mesane Karsinomu Olgularının Klinik ve Demografik Özellikleri

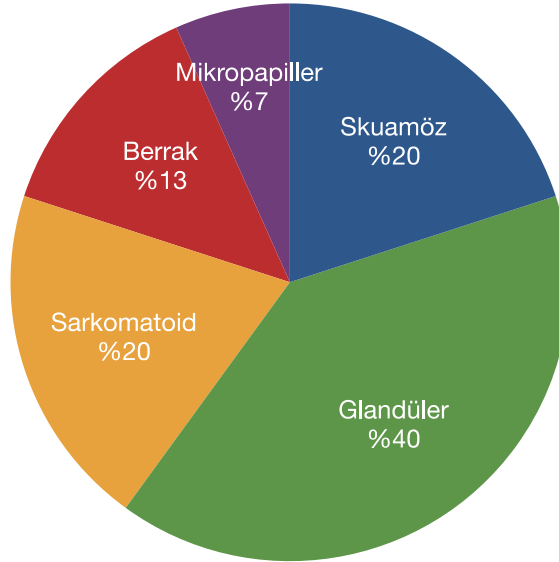
		<i>Sayı (n)</i>	<i>Oran (%)</i>
<i>Cinsiyet</i>	Erkek	22	91,7
	Kadın	2	8,3
<i>Yaş</i>	<60	4	16,6
	≥60	20	83,3
<i>Sigara Öyküsü</i>	Mevcut	14	58,3
	Yok	3	12,5
	Bilinmiyor	7	29,1

<i>Kemoterapi Öyküsü</i>	Mevcut	14	58,3
	Yok	10	41,7
<i>Mortalite</i>	Var	18	75
	Yok	6	25

#### 4.2.Histopatolojik ve Moleküler Özellikler

Değerlendirilen materyallerin altısı sistoprostatektomi, diğerleri transüretal rezeksiyon materyaliydi. İnfiltratif ürotelyal karsinom tanısı alan olguların 12'si farklı diferansiyasyon gösteren, 12'si göstermeyen grupta yer aldı. Bazı tümörlerde birden fazla diferansiyasyon gözlenmekle birlikte en sık saptanan diferansiyasyon glandüler yöndeydi (n:6) (Şekil 17). Olguların %50'sinde lenfovasküler invazyon, %41,7'sinde perinöral invazyon, %33,3'ünde in situ karsinom, %54,2'sinde nekroz saptandı. AJCC kanser evreleme kılavuzu 8. baskısına göre tümör evreleri sırasıyla pT2 (n:19), pT3 (n:4), pT4 (n:1) idi. Histopatolojik özellikler Tablo 4'de gösterildi.

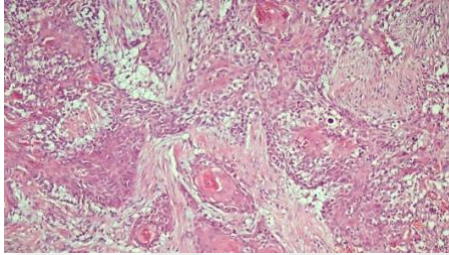
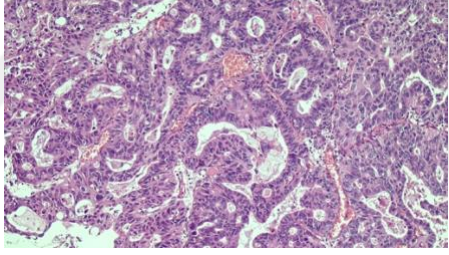
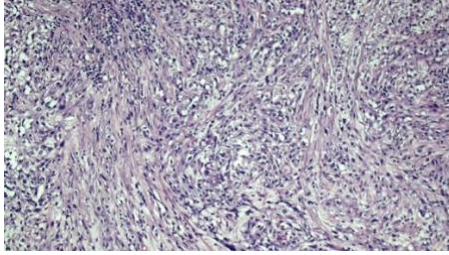
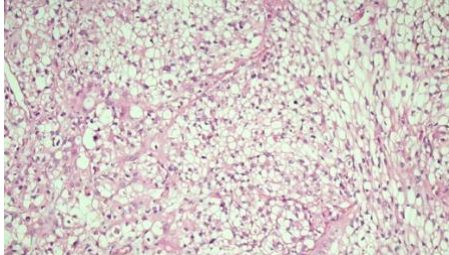
● Skuamöz ● Glandüler ● Sarkomatoid  
● Berrak ● Mikropapiller

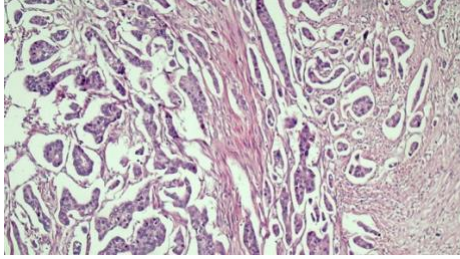


**Diferansiyasyon Tipleri ve Yüzdeleri**

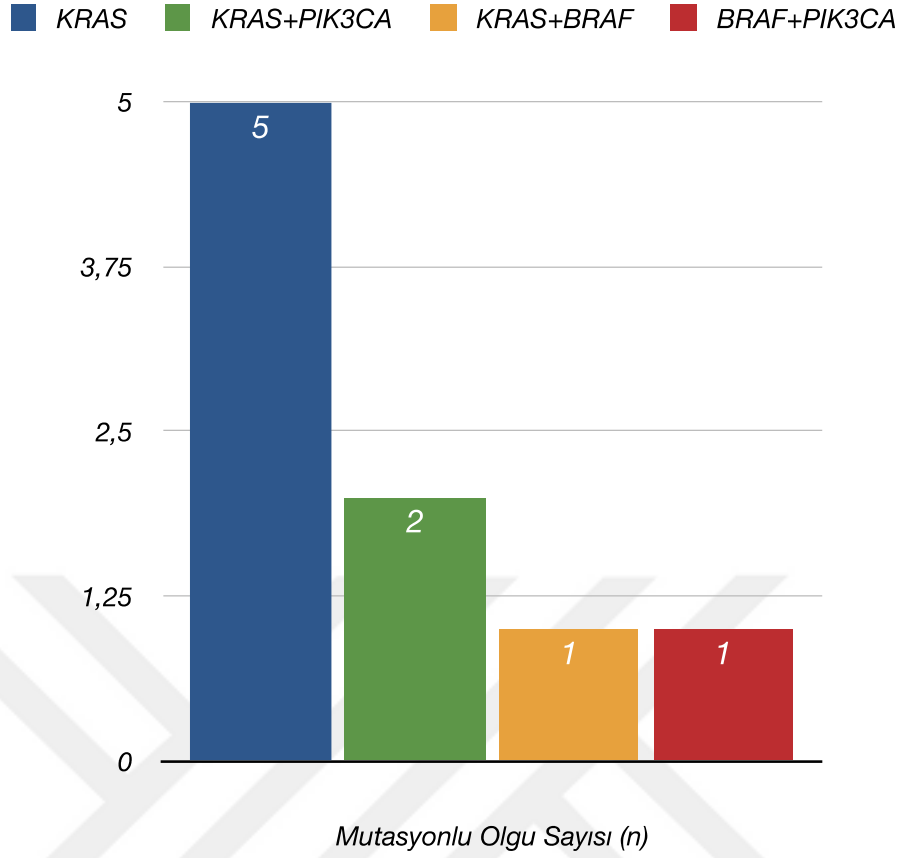
**Şekil 17.** İnfiltratif Ürotelyal Karsinom olgularında gözlenen diferansiyasyon tipleri ve sıklıkları.

**Tablo 4.** İnfiltratif Mesane Karsinomu Olgularının Histopatolojik Özellikleri

		Sayı (n)	Oran (%)
<i>Diferansiasyon tipi</i>	Skvamöz	3	12,5
			
	Glandüler	6	25
			
	Sarkomatoid	3	12,5
			
	Berrak	2	8,3
			

	Mikropapiller	1	4,2
			
	Yok	12	50
<i>Lenfovasküler invazyon</i>	Mevcut	12	50
	Yok	12	50
<i>İn-situ komponent</i>	Mevcut	8	33,3
	Yok	16	66,7
<i>Perinöral İnvazyon</i>	Mevcut	10	41,7
	Yok	14	58,3
<i>Nekroz</i>	Mevcut	13	54,2
	Yok	11	45,8
<i>Patolojik Evre</i>	pT2	19	79,2
	pT3	4	16,6
	pT4	1	4,2

Yapılan mutasyon analizinde bazılarında birden fazla olmak üzere dokuz olguda mutasyon saptanmıştır. En sık gözlenen mutasyon *KRAS*'da %33,3 oranında (n:8) izlenirken, *PIK3CA* mutasyonu %12,5 olguda (n:3), *BRAF* mutasyonu %8,3 olguda (n:2) saptandı. *PIK3CA* mutasyonu olan olguların ikisinde eş zamanlı *KRAS* mutasyonu, birisinde ise *BRAF* mutasyonu mevcuttu. Benzer şekilde *BRAF* mutasyonu olan ikinci vakada eş zamanlı *KRAS* mutasyonu görüldü (Şekil 18). *KRAS* geninde saptanan mutasyona kodonlar G12D, G12S, G13D, A146T, Q61R, A146P iken *PIK3CA*'nın E542K, E545K, H1047R, *BRAF*'da ise V600E idi (Tablo 5).



**Şekil 18.** İnfiltratif Ürotelyal Karsinomlarında tespit edilen mutasyonlu olguların dağılımı.

**Tablo 5.** Olgu bazında tespit edilen mutasyonlar, diferansiyasyon durumları ve hedef kodonları

<i>Olgu</i>	<i>Diferansiyasyon</i>	<i>Gen</i>	<i>Hedef kodon</i>
1	Skuamöz, Glandüler	<i>BRAF</i>	V600E
		<i>KRAS</i>	G12S
2	Glandüler	<i>KRAS</i>	G12S
		<i>PIK3CA</i>	E545K
3	Sarkomatoid	<i>KRAS</i>	G12S, G12D
		<i>PIK3CA</i>	E542K
4	Glandüler	<i>KRAS</i>	G13D, A146T
5	Glandüler	<i>KRAS</i>	G12D, Q61R

6	-	<i>KRAS</i>	A146P, G13D
7	-	<i>BRAF</i>	V600E
		<i>PIK3CA</i>	H1047R
8	-	<i>KRAS</i>	G12S, G12D
9	-	<i>KRAS</i>	G12D

### 4.3.İstatistiksel Bulgular

Diferansiyasyon gösteren ve göstermeyen gruplar arasında lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, in situ karsinom ve nekroz varlığı açısından anlamlı bir fark saptanmadı. İki grubun tümör evreleri birbiri ile örtüşmekteydi, istatistiksel bir farklılık saptanmadı. Mutasyon görülme sıklıkları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 6 ve 7).

**Tablo 6.** Diferansiyasyon Gösteren ve Göstermeyen Grupların Histopatolojik Parametrelerinin İstatistiksel Analizi

		<i>Diferansiyasyon gösteren</i>		<i>Diferansiyasyon göstermeyen</i>		p*
		n	%	n	%	
<i>Yaş</i>	≤60	3	25,0	1	8,3	0,590 <sup>&amp;</sup>
	>60	9	75,0	11	91,7	
<i>Sigara Öyküsü</i>	Mevcut	6	50,0	8	66,7	0,267 <sup>\$</sup>
	Yok	3	25,0	0	0	
	Bilinmiyor	3	25,0	4	33,3	
<i>Lenfovasküler İnvazyon</i>	Mevcut	6	50,0	6	50,0	0,999 <sup>#</sup>
	Yok	6	50,0	6	50,0	
<i>Perinöral İnvazyon</i>	Mevcut	4	33,3	6	50,0	0,408 <sup>#</sup>
	Yok	8	66,7	6	50,0	
<i>İnsitu Komponent</i>	Mevcut	2	16,7	6	50,0	0,193 <sup>&amp;</sup>
	Yok	10	83,3	6	50,0	

<i>Nekroz</i>	Mevcut	7	58,3	6	50,0	0,682 <sup>#</sup>
	Yok	5	41,7	6	50,0	
<i>Tümör Evresi</i>	pT2	10	83,3	9	75	0,999 <sup>\$</sup>
	pT3	2	16,7	2	16,7	
	pT4	0	0	1	8,3	

\*: exact p değeri, &: Fisher Exact test, \$: Fisher Freeman Halton testi, #: Pearson ki-kare testi

**Tablo 7.** Diferansiyasyon Gösteren ve Göstermeyen Grupların Mutasyon Durumlarının İstatistiksel Analizi

		<i>Diferansiyasyon gösteren</i>		<i>Diferansiyasyon göstermeyen</i>		p*
		n	%	n	%	
<i>KRAS</i>	Pozitif	5	41,7	3	25,0	0,667 <sup>&amp;</sup>
	Negatif	7	58,3	9	75,0	
<i>BRAF</i>	Pozitif	1	8,3	1	8,3	0,999 <sup>&amp;</sup>
	Negatif	11	91,7	11	91,7	
<i>PIK3CA</i>	Pozitif	2	16,7	1	8,3	0,999 <sup>&amp;</sup>
	Negatif	10	83,3	11	91,7	

\*: exact p değeri, &: Fisher Exact test

Grup ayrımı yapılmaksızın *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* mutasyonlarının histopatolojik özellikler ile ilişkisinde anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 8-10).

**Tablo 8.** *KRAS* Mutasyonunun Histopatolojik Özellikler ile İstatistiksel Analizi

	<i>KRAS Mutasyonu</i>					p*
	var		yok			
	n	%	n	%		

<i>Lenfovasküler</i>	Mevcut	4	16,7	8	33,3	0,999
<i>İnvazyon</i>	Yok	4	16,7	8	33,3	
<i>Perinöral İnvazyon</i>	Mevcut	3	12,5	7	29,1	0,999
	Yok	5	20,9	9	37,5	
<i>İn situ komponent</i>	Mevcut	3	12,5	5	20,9	0,999
	Yok	5	20,9	11	45,8	
<i>Nekroz</i>	Mevcut	4	16,7	9	37,5	0,999
	Yok	4	16,7	7	29,1	
<i>Evre</i>	pT2	6	25,0	13	54,2	
	pT3	2	8,3	2	8,3	p=0,795
	pT4	0	0	1	4,2	

\*: exact p değeri

**Tablo 9.** *BRAF* Mutasyonunun Histopatolojik Özellikler ile İstatistiksel Analizi

		<i>BRAF</i> Mutasyonu				
		var		yok		
		n	%	n	%	p*
<i>Lenfovasküler</i>	Mevcut	1	4,2	11	45,8	0,999
<i>İnvazyon</i>	Yok	1	4,2	11	45,8	
<i>Perinöral İnvazyon</i>	Mevcut	1	4,2	9	37,5	0,999
	Yok	1	4,2	13	54,1	
<i>İn situ komponent</i>	Mevcut	0	0	8	33,3	0,536
	Yok	2	8,3	14	58,4	

<i>Nekroz</i>	Mevcut	1	4,2	12	50	0,999
	Yok	1	4,2	10	41,6	
<i>Evre</i>	pT2	2	8,3	17	70,8	p=0,460
	pT3	0	0	4	16,7	
	pT4	0	0	1	4,2	

\*: exact p değeri

**Tablo 10.** *PIK3CA* Mutasyonunun Histopatolojik Özellikler ile İstatistiksel Analizi

		<i>PIK3CA</i> Mutasyonu				p*
		var		yok		
		n	%	n	%	
<i>Lenfovasküler İnvazyon</i>	Mevcut	0	0	12	50	0,217
	Yok	3	12,5	9	37,5	
<i>Perinöral İnvazyon</i>	Mevcut	2	8,3	8	33,3	0,188
	Yok	1	4,2	13	54,2	
<i>İn situ komponent</i>	Mevcut	0	0	8	33,3	0,526
	Yok	3	12,5	13	54,2	
<i>Nekroz</i>	Mevcut	0	0	13	54,2	0,082
	Yok	3	12,5	8	33,3	
<i>Evre</i>	pT2	2	8,3	17	70,8	p=0,621
	pT3	1	4,2	3	12,5	
	pT4	0	0	1	4,2	

\*: exact p değeri

Diferansiyasyon gösteren grupta medyan sağ kalım süresi 6 ay (Standart hata=4,6) iken diferansiyasyon göstermeyen grupta 17 ay (Standart hata=5,3) idi.

Ancak gruplara göre sağ kalım süreleri arasında anlamlı düzeyde fark yoktu (Log Rank test  $\chi^2=2,754$   $p=0,097$ ). Kemoterapi alan ve almayan hastalarda sağ kalım süreleri arasında fark saptanmadı. *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* mutasyonu olan hastaların sağ kalımları olmayanlara göre benzerdi, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 11). Kemoterapi alan hastalarda mutasyon varlığının sağkalımda anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlemlendi (Tablo 12).

**Tablo 11.** Sağkalım Sürelerine Ait İstatistiksel Analiz Sonuçları

				Sağkalım Süresi Medyan Değeri			Log Rank Test İstatistiği	p*
		n	Tahmini	Standart Hata	%95 Güven Aralığı			
					Alt Sınır	Üst Sınır		
<i>Diferansiasyon</i>	Var	12	6,0	4,6	0	15,1	2,754	0,097
	Yok	12	17,0	5,3	6,6	27,4		
	Genel	24	13,0	2,8	7,5	18,5		
<i>Kemoterapi</i>	Var	14	13,0	3,4	6,4	19,6	0,457	0,499
	Yok	10	12,0	4,7	2,7	21,3		
	Genel	24	13,0	2,8	7,5	18,5		
<i>KRAS Mutasyonu</i>	Var	8	13,0	3,6	5,9	20,1	0,050	0,823
	Yok	16	12,0	6,0	0,2	23,8		
	Genel	24	13,0	2,8	7,5	18,5		
<i>BRAF Mutasyonu</i>	Var	2	4,0	-	-	-	0,654	0,419
	Yok	22	13,0	3,8	5,6	20,4		
	Genel	24	13,0	2,8	7,5	18,5		
<i>PIK3CA Mutasyonu</i>	Var	3	17,0	9,0	0	34,6	0,484	0,487
	Yok	21	13,0	3,7	5,8	20,2		
	Genel	24	13,0	2,8	7,5	18,5		

\*: exact p değeri

**Tablo 12.** Kemoterapi Alan Hastalarda Mutasyon Varlığının Sağkalım Süresine Etkisinin İstatistiksel Analizi

				<i>Sağkalım Süresi Medyan Değeri</i>			<i>Log Rank Test</i>	<i>p*</i>
		<i>n</i>	<i>Tahmini</i>	<i>Standart Hata</i>	<i>%95 Güven Aralığı</i>			
							<i>Alt Sınır</i>	<i>Üst Sınır</i>
<i>KRAS Mutasyonu</i>	Var	5	13,0	2,2	8,7	17,3	0,553	0,457
	Yok	9	17,0	14,9	0	46,2		
	Genel	14	13,0	3,4	6,4	19,6		
<i>BRAF Mutasyonu</i>	Var	1	-	-	-	-	-	-
	Yok	13	13	4,1	-	-		
	Genel	14	13	4,1	-	-		
<i>PIK3CA Mutasyonu</i>	Var	3	17,0	9,0	0	34,6	0,266	0,606
	Yok	11	13,0	5,1	3,0	23,0		
	Genel	14	13,0	3,4	6,4	19,6		

\*: exact p değeri

## 5. TARTIŞMA

Dünyada ve ülkemizde önemli bir kanser yükü oluşturan mesane ürotelyal karsinomunda erken tanı, tarama, rekürrens kontrolü ve prognoza yönelik biobelirteç, immünassay gibi farklı non-invaziv yöntemlerin araştırılması süregelmektedir (46). Moleküler analiz çalışmaları son yıllarda tanı algoritmalarında yer almaya başlamıştır. Tümörlerin moleküler karakterlerinin tespiti, hedefe yönelik tedavi algoritmalarının oluşturulmasında ve uygun hasta seçiminde yol göstericidir. Kandath ve ark 3281 tümörü içeren 12 farklı kanser tipinde yaptıkları araştırmada 127 gendeki mutasyon araştırılmış ve bir tümörde birden fazla mutasyon sık izlenmiştir. Her bir kanser tipinde sık görülen sürücü mutasyonlar bulunsa da her hasta için kanser tipindeki sürücü mutasyonların tipi ve buldukları klona göre dağılımları çeşitlidir. Bundan dolayı her bir hasta için klonal yapının bilinmesi optimum bir tedavi için gerekli olarak önerilmiştir (47). İleri evre mesane kanserlerinde henüz hedefe yönelik tedaviler rutin olarak uygulanmamakta ve geleneksel kemo-radyoterapiler ana tedavileri oluşturmaktadır. Reseptör tirozin kinaz (RTK) yolağı tümörlerde en sık mutasyona uğrayan yolaklardandır. RTK inhibitörlerinin tedavi olarak kullanılması yeni tedavi yöntemlerinde umut ışığı olmuştur (7). FDA, RTK aktivasyonunu engelleyen başta akciğer kanserlerinde kullanılan setuksimab, kolon kanserlerinde kullanılan panitumumab, meme kanserlerinde kullanılan trastuzumab olmak üzere birçok monoklonal antikorun tedavide kullanılmasını onaylamıştır (26). RTK yolağında meydana gelen mutasyonların mesane kanserlerinde de tanımlanması tedavi yönetimine etkisinin araştırılması için önemlidir.

Son senelerde mesane kanserleri moleküler yolaklarına göre sınıflandırılmaya çalışılmaktadır. Bu yönde yapılan çalışmalarda mesane kanserleri temelde iki yolağa ayrılmıştır: Luminal tip ve Bazal tip. Luminal tümörlerin çoğunun NİDDPÜK ile ilişkili olduğu, bazal tipin ise yüksek dereceli ürotelyal karsinomları içerdiği gösterilmiştir (45). Lindgren ve ark yapmış olduğu 144 olgudaki mutasyon analizinde mesane kanserleri benzer iki intrinsik moleküler subtipe ayrılmıştır. MS1 olarak adlandırılan grupta Ta evresindeki tümörler ağırlıklı olarak bulunurken MS2 grubunda T2 ve üzeri evresindeki tümörler izlenmiştir. Bu gruplar arasındaki mutasyon analiz farkında MS1 grubunda *FGFR3* ve *PIK3CA* mutasyonları sık izlenirken MS2

grubunda *TP53* mutasyonu, RB kaybı görülmüştür. *KRAS* nokta mutasyonu her iki grupta eşit saptanmıştır (48). Bizim çalışmamızda moleküler subtipler bilinmemekle birlikte dahil edilen olgular, ileri evre mesane kanserleri olduğundan bazal/skuamöz alttıpe uygun bir mutasyon profili oluşturmaları beklenmektedir.

Ekzojen karsinojenlere (sigara, UV radyasyon) maruziyet sonucunda açığa çıkan tümörlerde daha fazla somatik mutasyon çeşitliliği tespit edilmiştir (49). Mesane tümörü etiyojisinde sigara en önemli etken olarak gösterilen, moleküler olarak oldukça heterojen genomik değişkenlik gösteren (47,50) ve akciğer kanserleri (sigara), melanomdan (UV radyasyon) sonra en fazla somatik mutasyon sıklığına sahip tümördür (49,51). Farklı kuruluşlar tarafından yapılan tüm genom sekanslama çalışmalarında çok fazla sayıda gende mutasyon izlenmiştir. Örneğin TCGA 412 kasa invaziv mesane kanserinde 58 farklı gende mutasyon tanımlanmıştır. Tanımlanan mutasyonların içerisinde RTK yolağına ait genlerde de mutasyonlar gösterilmiştir (51). *PI3K* yolağı mutasyonu mesane kanserlerinde sık tanımlanmıştır. ÜK'larda bu mutasyon %25-48 oranında mevcut olup tümörlerin çoğu NİDDPÜK ile ilişkilidir (45) ve *PI3K* yolağı mutasyonlarının luminal tip mesane kanserlerinde daha sık olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda *PIK3CA* mutasyonu %12,5 oranında gözlenmiştir. Bu oran literatürde tanımlanan orana göre düşüktür. Kompier ve ark 257 mesane kanseri [pTa (n: 166), pT1 (n:57), pT2-4 (n:34)] hastasında *FGFR3*, *RAS* ve *PIK3CA* mutasyonlarını değerlendirmiş; *PIK3CA* %24 hastada mutasyona izlenmiştir (7). Agell ve ark, çoğunda kasa invaziv mesane kanserinin eşlik ettiği prostat kanseri olan 20 hastada yapmış olduğu mutasyon analizinde mesane kanserlerinin bir tanesinde *PIK3CA* (E545K) (%5), bir tanesinde *KRAS* (G12V) (%5) mutasyonu izlenmiştir (52). Calderaro ve ark yapmış olduğu mutasyon analizinde ise pTa evresindeki tümörlerde *PIK3CA* mutasyonu %40 oranında gözlenirken pT2-pT4 evresindeki tümörlerde %5 oranında saptanmıştır (4). Benzer şekilde 218 vakanın dahil edildiği bir analizde evre ilerledikçe *PIK3CA* mutasyon görülme oranı azalmıştır [Ta (%22,2), T1 (%16,6), ≥T2 (%9,3)] (52). Millis ve ark yapmış olduğu çalışmada da ileri evre mesane kanserlerinde *PIK3CA* mutasyonu %16,8 oranında gözlenmiştir (1). Literatürle uyumlu olarak olgularımızın ileri evre mesane kanserlerinden oluşması *PIK3CA* mutasyonunun düşük oranda gözlenmesini izah etmektedir. İnvaziv olmayan mesane kanserlerinin takiplerinde rekürrenslerinde invazyon saptanan vakalarda

yapılan araştırmada %14,5 oranında *PIK3CA* mutasyonu görölmüş, rekürrens ve primer vakalar arasında istatistiksel fark gözlenmemiştir (54). Hastaların rekürrenslerinde mutasyon profilinin değişmemesi hedefe yönelik tedavilerden fayda görebileceğinin göstergesi olarak kabul edilebilir. Ayrıca ilk tümör tanısında mutasyon saptanan hastaların takiplerinde likit biyopsilerden mutasyon analizine bakılarak non-invaziv yöntemlerle nüks tespit edilebilir.

*PIK3CA* mutasyonlarının %80'inden fazlası üç noktada yoğunlaşmaktadır: helikal kısımda glutamatı (E) kodlayan 542. ve 545. kodon ile C terminal uçtaki kinaz kısmında histidin (H) kodlayan 1047. kodon. Bu 'hotspot'/yoğun bölgeler enzimatik aktivasyonda ve biyolojik cevabın gelişiminde en fazla etkiye sahiptirler (40). İleri evre İÜK'larda yapmış olduğumuz çalışmada üç vakada *PIK3CA* mutasyonu saptanmış olup bunların ikisi helikal kısımda (E542K, E545K), biri kinaz kısımda (H1047R) gözlenmiştir.

Sjödahl ve ark yapmış olduğu çalışmada mutasyon profili yanı sıra tümörlerin moleküler sınıfları da değerlendirilmiştir. Moleküler sınıfı ÜroA olan iki vakada *PIK3CA* H1047R ve H1047L kodonlarında (kinaz kısım) mutasyon primer tümörde mevcutken rekürrenslerinde mutasyon saptanmamıştır ve bu rekürrenslerin moleküler sınıfları da sırasıyla bazal/skuamöz tipe ve ÜroB tipe dönüşmüştür. *PIK3CA* mutasyonu E545K kodonunda (helikal kısım) izlenen bir vakada ise primer tümör genomik olarak stabil olmayan grupta iken rekürrensinde bazal/skuamöz tipe dönüşmüştür ve *PIK3CA* mutasyonu E545K kodonunda görölmeye devam etmiştir (54). Protein ekspresyon düzeyinde sınıflandırılan moleküler sınıf ve genomik mutasyonlar rekürrenslerde değişim gösterebilmektedir. *PIK3CA* mutasyonlarında gözlenen bu farklı davranış helikal kısım ve kinaz kısım ayırımına bağlı oluşmuş olabilir. Çalışmamızda saptanan *PIK3CA* mutasyonlarının ikisi helikal kısımda (E545K, E542K) yer almakta idi. İleri evre mesane kanserlerini içeren çalışmamızda *PIK3CA* geninin helikal kısmının daha fazla vakada eşlik ediyor olması Sjödahl ve ark yapmış olduğu çalışmanın verileri ile değerlendirildiğinde ileri evre mesane kanserlerinde sebat eden *PIK3CA* mutasyonlarının helikal kısım kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Ancak, Sjödahl ve ark yapmış oldukları 145 ÜK dahil ettikleri diğer çalışmalarında düşük dereceli ÜK'da helikal kısım mutasyonu kinaz kısım oranla dört kat fazla gözlenirken (n:12 vs n:3) yüksek dereceli vakalarda bu oran

neredeşse birbirine eşittir. (n:5 vs n:4) (53). Mesane kanserlerinde *PIK3CA* mutasyonunun evre ilerledikçe azalması helikal kısım mutasyonlarının azalmasına bağlı olarak geliştiği şekilde yorumlanabilir. *PIK3CA* geninin helikal kısmının rekürrenslerdeki sebatkar seyri ile düşük ve yüksek dereceli tümörlerde gözlenen oransal değişim arasında çelişki izlenmektedir. Mesane tümörlerinde gözlenen heterojen genomik yapıyı destekleyen bu durum tedavi algoritmalarının geliştirilmesinde ve rekürrenslerin takibinde önerilen likit biyopsi yöntemlerinin (55,56,57) uygulanabilirliğinde engel teşkil edebilir. Bu konuda *PIK3CA* geninin klonlarını içeren düşük-yüksek dereceli mesane kanserlerinin rekürrenslerinin de dahil edildiği geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

Platt ve ark 92 ürotelyal karsinom içeren çalışmasında *PIK3CA* mutasyonu %27 oranında tespit edilmiştir. Bu mutasyonların çoğu 'hot spot' bölge olarak tanımlanan, proteinin helikal kısmını işaretleyen 542. ve 545. kodonlarında (E542K, E545K) ve üçüncü sıklıkta kinaz kısmını işaretleyen H1047R'de gerçekleşmiştir (42). Literatürde Millis ve ark ile Kompier ve ark yapmış olduğu mutasyon analizlerinde de helikal kısım mesane kanserlerinde en çok mutasyona uğrayan bölge olarak belirlenmiştir (1,7). Mesane dışı kanserlerin dahil edildiği *PIK3CA* mutasyon analizinde kinaz kısmını kodlayan gende (H1047R) daha sık mutasyon izlenmiştir (42), mesane kanserlerinde ise helikal kısım mutasyonları daha sık gözlenmektedir (58). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak mesane kanserlerinde *PIK3CA* geninin helikal kısmı işaretleyen kodonlarında mutasyon daha sık görülmüştür. Bu durum mesane kanserlerinde görülen *PIK3CA* mutasyonlarının diğer kanserlerden farklı olduğunu göstermektedir.

*PI3K*, *RAS* ile aktive olan bir yolaktır. *RAS* mutasyonlarında hem *MAPK* hem de *PI3K* yolağı aktifleşmektedir. Platt ve ark mesane kanserlerini araştırdıkları çalışmasında 11 hastada *RAS* mutasyonu izlenmiştir. Bu hastaların yedisinde eş zamanlı *PIK3CA* mutasyonu gözlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. *PI3K* proteininde p110 $\alpha$  subuniti p85 ile inhibisyona uğrayarak işlevselliği düzenlenir. Yapısal olarak p110 $\alpha$  helikal kısmı ile p85'in N-terminal SH2 kısmı ilişkili olup bu düzenlemeyi sağlamaktadır. *PI3K* helikal kısmının (E542K, E545K) ve kinaz kısmının (H1047R) fonksiyon kazanım mutasyonlarının p85 ve *RAS* etkileşimlerine göre farklı şekillerde geliştiği gösterilmiştir. Helikal kısım

mutasyonları *RAS* ilişkili aktivasyona uğrarken kinaz kısmı *RAS* bağlanması olmaksızın p85 ile transformasyona uğramaktadır (42). Bizim çalışmamızda da Platt ve ark benzer şekilde *KRAS* mutasyonu olan hastaların ikisinde *PIK3CA* mutasyonu mevcuttu ve bu mutasyonlar *RAS* bağımlı helikal kısımda (E542K, E545K) yer almaktaydı. Mesane kanserlerinde gözlenen *PIK3CA* mutasyonu çoğunlukla *RAS* bağımlı alanda gözleendiğinden ve *RAS* mutasyonu ile birliktelik söz konusu olduğundan hedefe yönelik tedavi planlamasında tek odağa yönelik yapılan (*PIK3CA* inhibisyonu vb) tedavi girişimleri başarılı olmayabilir. Gerek edinilmiş somatik mutasyonlar gerekse sinyal yolağındaki aktivasyonlar nedeniyle hedefe yönelik tedavilere direnç tanımlanmaya başlanmıştır (26). Örneğin; multipl myelom hastalarında denenen *FGFR3* inhibitörleri *RAS* mutasyonu eşlik eden hastalarda etkisiz kalmıştır. Benzer şekilde akciğer ve kolon kanserlerinde *EGFR* inhibitörleri RTK yolağına meydana gelen diğer mutasyonların varlığında tedavi etkinliği sağlamamıştır (7). *PI3K/AKT* yolağı *PIK3CA* haricinde birçok protein ile regüle olmaktadır ve mesane kanserlerinde de bu yolağa ait *PTEN* kaybı, *AKT* aktivasyonu gibi birçok mekanizma araştırılmaktadır (4) ve mesane kanserlerinde ileri evre ve derece ile ilişkilendirilmektedir (1). Bizim çalışmamız mesane kanserlerinde *PIK3CA* mutasyonunun rol oynadığını ve *PI3K/AKT* yolağına yönelik yapılacak tedavilerden fayda sağlanabileceğini desteklemektedir. Ancak, mesane kanserlerinde gözlenen heterojen moleküler değişiklikler tedavi yönetiminde en uygun tedaviyi sağlayabilmek için çoklu inhibitör kullanılmasını gerektirecektir.

*RAS* ailesinde gelişen mutasyonlar kanserlerin gelişmesinde büyük bir role sahiptir. Akciğer, kolon, tiroit kanserleri başta olmak üzere birçok kanserde önemi vurgulanmış ve *RAS* mutasyonuna yönelik tedavi algoritmaları geliştirilmiştir. Bizim çalışmamızda da İÜK'da kodon 12, 13, 61 ve 146 tarafından kodlanan *RAS* ailesine ait *KRAS* mutasyon sıklığı araştırılmış ve %33,3 oranında saptanmıştır. Calderaro ve ark yapmış olduğu 128 mesane kanserinin dahil edildiği çalışmada *KRAS* mutasyonu sadece %4,6 oranında (4) gözlenirken Millis ve ark yaptığı çalışmada benzer bir oranda mutasyon saptanmıştır (%3,7) (1). Sjödahl ve ark 218 mesane kanserinde değerlendirdikleri mutasyon profilinde de kodon 12, 13 ve 61'de yer alan *RAS* mutasyonu %5 oranında saptanmıştır. *HRAS* en sık mutasyona uğrayan tipken, *KRAS* mutasyonu sadece 4 vakada görülmüştür (53). Diğer yandan Smal ve ark 249 mesane

kanseri hastasının dahil edildiği çalışmada *KRAS* mutasyonu invaziv olmayan tümörlerde %2,4 iken invaziv tümörlerde %4,9 oranında saptanmıştır (32). İnvaziv tümörlerde izlenen *KRAS* mutasyonu artışı Ouerhani ve ark yapmış olduğu çalışmada da gözlenmiştir (34). Literatürde gözlenen *KRAS* mutasyon oranları bizim çalışmamızda saptanana göre düşüktür. İleri evre mesane kanserlerinin çalışmaya dahil edilmiş olması bu farkın nedeni olabilir. Ancak, etnik köken farklılığına bağlı genetik yapıdaki varyasyonlar ya da Türkiye'nin bazı bölgelerinde sanayileşmenin yoğun olması da gözlenen yüksek oranın nedeni olarak düşünülebilir. Diğer yandan çalışmaya dahil edilen glandüler diferansiyasyon gösteren vakalarda yüksek oranda saptanan *KRAS* mutasyonu bu farkı izah edebilir. Diğer yandan intratümöral heterojenite ve bakılan kodon farklılıkları bu çelişkiyi açıklayabilir. İleride Türkiye'de bu konu üzerine geniş serilerde çalışmaların yapılması bu konuyu aydınlatılabilir.

*RAF*, mitojen aktive protein kinazı aktive eden ve *MAPK* yolağında etkin serin treonin kinazdır. Mutasyona uğrayan *BRAF* kinazın yapısal aktivasyonuna 1799. nükleotitte meydana gelen transversiyon (V600E) neden olmaktadır (59). *BRAF* mutasyonu melanom başta olmak üzere kolon, tiroit kanseri (60) vb kanserlerde sık gözlenmekte ve hedefe yönelik tedaviler yine melanom başta olmak üzere *BRAF* mutasyonu olan hastalarda başarıyla uygulanmaktadır. Ancak hücre içi mekanizmalardaki karmaşık etkileşim *BRAF* inhibitörlerinde de ters etki oluşturarak *BRAF* mutasyonu gözlenmeyen hücrelerde *MEK-ERK* yolağını aktifleştirerek proliferasyonun artmasına neden olabilmektedir (36). *BRAF* mutasyonu mesane kanserlerinde literatürde çok düşük oranda tanımlanmıştır. Millis ve ark yaptığı 120 mesane kanserinin dahil edildiği çalışmada %0,8 oranında görülmüştür (1). Necchi ve ark yapmış olduğu geniş serili (n:1984) çalışmada ise %0,4 oranında tespit edilmiştir. Bu çalışmada *BRAF* mutasyonu ve *FGFR3* mutasyonu birlikteliği değerlendirilmiş ve mutasyonel olarak birbirlerini dışlayan natürde ('mutually exclusive') bir profil saptanmıştır. Bu durum vakaların *BRAF* inhibitörlerinden fayda görebileceğini düşündürmüştür (61). Zaravinos ve ark ÜK ile normal mesane mukozasında yaptığı kıyaslamada *BRAF* mutasyonunda anlamlı fark gözlenmemiştir (62). Benzer şekilde Karlou ve ark 91 mesane kanserinde ekzon 15 (*BRAF*) değerlendirdikleri, Sjødahl ve ark 145 mesane kanserinde ekzon 11 ve 15 (*BRAF*) değerlendirdikleri çalışmalarda da mutasyon görülmemiştir (53,63). Boulalas ve ark ekzon 11, 14 ve 15'i incelemiş

oldukları 30 olgudan oluşan çalışmada iki vakada (%6,6) *BRAF* mutasyonu (V600E, V600L) saptanmıştır (59), benzer şekilde Ross ve ark çalışmasında 35 vakanın ikisinde *BRAF* mutasyonu izlenmiştir (64). Longo ve ark ileri evre mesane kanserli 50 olgu içeren serilerinde ise %24 oranında *BRAF* mutasyonu görülmüş olup bu oran literatüre kıyasla çok yüksektir (65). Bizim çalışmamızda da *BRAF* mutasyonu %8,3 oranında gözlenmiş olup bu vakalar sırasıyla *KRAS* (G12S) mutasyonu olan, glandüler ve skuamöz diferansiasyon gösteren olgu ile *PIK3CA* (H1047R) mutasyonu olan bir olgudur. Longo ve ark, Boulalas ve ark sonuçları ile bizim sonuçlarımız literatüre kıyasla yüksektir; bu çalışmalarda vaka sayısının kısıtlı olması oransal olarak yüksek görünmesinin nedeni olabilir. Literatürdeki veriler ışığında *BRAF* inhibitörlerinin mesane kanserlerinde etkinliğinin olmayacağını düşünssek de farklı toplumlarda farklı mutasyone gen haritaları olabileceğinden daha geniş serili çalışmaların bu konudaki çelişkili durumu aydınlatılabileceğini söyleyebiliriz.

*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* mutasyon varlığını klinik, demografik, histopatolojik parametreler ile kıyasladığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamış olup sağ kalım üzerine yapılan analizde anlamlı sonuç izlenmemiştir. Kompier ve ark yapmış olduğu çalışmada da *PIK3CA* ve *RAS* mutasyonları farklı evrelerdeki hastalarda hastalısız sağ kalım veya progresyonla ilişkili bulunmamıştır (7). Smal ve ark yapmış olduğu çalışmada *KRAS* mutasyonu yaş, evre, sigara içiciliği açısından kıyaslanılmış anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Ancak metastaz varlığı ve tümörün solid büyüme paterni göstermesi *KRAS* mutasyonu olan vakalarda daha sık gözlenmiştir. *KRAS* mutasyonunun varlığı agresif gidişatla ilişkilendirilmiş ve mutasyonun kanser ilişkili yaşam süresini olumsuz etkilediği görülmüştür (32). Bizim çalışmamızda *KRAS* mutasyonu yaşam süresini etkileyen bir parametre olarak gözlenmemiştir. Bu durum çalışmamızın kısıtlı vaka sayısı ile yapılmış olmasından kaynaklanmış olabilir. Kasa invaziv olmayan mesane kanserlerinde *PIK3CA* ve *KRAS* mutasyonlarının, yaş, sigara içiciliği, evre, ortalama yaşam süresi ile ilişkisi değerlendirildiğinde etkisinin olmadığı gösterilmiştir (66). TCGA'nın yapmış olduğu analizde sigaranın mesane kanserlerinde mutasyon spektrumunu etkilemediği görülmüştür. Ancak, kolon kanserlerindeki benzer şekilde GpG adası metilatör fenotipi ile sigara içiciliği ilişkili saptanmıştır. Sigaradaki akrolein, aromatik aminler gibi kimyasalların karsinojen etkisi bilinse de mesane kanseri gelişimini nasıl

tetikledikleri henüz net değildir. Ürotelyal hücrelerde sigara içiminin *NF-κB*, *PI3K-AKT*, *MAPK* sinyal yollarını aktifleştirerek karsinojen etki oluşturduğu saptanmıştır (49). Bizim çalışmamızda da sigara içen hastalarda *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* mutasyonlarının görülme sıklığı arasında anlamlı bir ilişki izlenmemiştir.

Bizim çalışmamızın aksine Ward ve ark 956 mesane kanserinde yapmış oldukları analizde *RAS* mutasyonu olan hastalarda yaşam süresinin daha uzun olduğu savunulmuştur. Bu farklı veriye *RAS* mutasyonunun söz konusu çalışmada üç tipinin (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*) birlikte değerlendirilmesi neden olmuş olabilir. Aynı çalışmada *PIK3CA* mutasyonu genel sağ kalımı etkilemezken kasa invaziv mesane kanseri olan hasta grubunda sisplatin bazlı neoadjuvan kemoterapiye iyi yanıt ile ilişkilendirilmiştir (67). Mesane kanserlerinde bazı mutasyonlar kemoterapi rejimlerine cevap ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin, NAK alan 50 mesane kanseri hastasında *ERCC2* mutasyonu KT yanıt iyi olan hastaların %18'inde mevcutken yanıt alınmayan hastalarda mutasyon izlenmemiştir. Adjuvan tedavi alan hastaların değerlendirildiği çalışmada ise *ATM*, *ERCC2*, *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları rekürrensiz sağkalım ile ilişkili saptanmıştır (49). Bizim çalışmamızda *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* mutasyonu olan hasta grubunda KT'ye yanıtta mutasyonu olmayan hastalara göre fark gözlenmemiştir ve prediktif bir değer kazandırmamıştır.

ÜK'lar histopatolojik özelliklerine göre konvansiyonel ÜK, diferansiyasyon gösteren ÜK veya ÜK varyantları olarak sınıflandırılabilirler. 2016 DSÖ ürogenital kanserlerin sınıflamasında bu kategorizasyonun tanısal, tedavi ve prognostik açıdan önemi vurgulanmıştır (24). Günümüzde özelleşmiş tedavi yaklaşımı için yeterince veri olmadığından diferansiyasyon gösterebilir ya da göstermez çoğu ÜK benzer şekilde tedavi edilmektedir. Oysa ÜK varyantları farklı fenotip ve kliniğe sahip nadir görülen tümörlerdir ve bu alanda klinik tedavileri yönlendirebilecek yeterli çalışma yoktur (30). En sık gözlenen ve kötü seyirli varyantlardan mikropapiller varyant ÜK'da neoadjuvan KT'nin yaşam süresini iyileştirmediği, sadece evreyi düşürdüğü gözlenmiştir. Benzer şekilde plazmasitoid varyant ÜK'da da neoadjuvan KT'nin sistektomiye üstünlüğü gösterilememiştir. Sarkomatoid varyant da kötü seyirli bir tümör olup KT veya RT tedavide çok etkin değildir (30). ÜK diferansiyasyon gösteren gruplarında yaptığımız *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* mutasyon analizinde sarkomatoid diferansiyasyon gösteren bir olguda *KRAS* ve *PIK3CA*; glandüler diferansiyasyon

gösteren iki olguda *KRAS*, bir olguda *KRAS* ve *PIK3CA*; glandüler ve skuamöz diferansiasyon gösteren bir olguda *BRAF* ve *KRAS* mutasyonu izlenmiştir. Aynı tümörde gözlenen iki farklı mutasyonun olması tümör içinde heterojen genomik değişikliklerin varlığını akla getirmektedir. Histolojik varyantların eşlik ettiği tümörlerde genomik heterojenitenin olup olmadığı yeni nesil sekanslama yöntemi ile gösterilebilir. Bizim çalışmamızda diferansiasyon gösteren ve göstermeyen gruplar arasında mutasyon görülme sıklığında farklılık izlenmemiştir. Bizim serimiz çok kısıtlı vaka sayısı içermesine rağmen dikkatimizi çeken bir husus glandüler diferansiasyon gösteren altı vakanın dördünde *KRAS* mutasyonunun gözlenmiş olmasıdır. Glandüler diferansiasyon gösteren İÜK morfolojik ve immünohistokimyasal (CDX2, CK20 pozitifliği) olarak kolon adenokarsinomlarına benzerlik göstermektedir (68). Kolon adenokarsinomlarında *KRAS* mutasyonu yüksek oranda görülen sık tanımlanmış mutasyonlardandır (69,70). *KRAS* mutasyonunun glandüler diferansiasyon vakalarında yüksek oranda saptanmış olması kolorektal karsinomlar ile protein ekspresyon düzeyi ve morfolojik benzerlikleri yanı sıra genomik olarak da aynı zemine sahip olduklarını göstermektedir. Farklı diferansiasyonların teker teker ele alındığı ve daha geniş vaka serisinin dahil edildiği çalışmaların yapılması ÜK varyantlarının moleküler yollarının daha iyi anlaşılmasına ve bu hastaların geliştirilmekte olan hedefe yönelik tedavilerden fayda sağlamasına yardımcı olacaktır.

İÜK'larda günümüzde uygulanan tedavinin temelini kombine kemoterapi rejimleri oluşturmaktadır ve sitotoksitesi nispeten daha az olan gemsitabin, sisplatin tedavisi en sık uygulanan rejimdir. Sisplatin alamayan hastalarda ise ikincil sırada yer alan, 3. jenerasyon vinka alkaloidi olan vinflunin uygulanmaktadır (30). Ancak bu tedaviler sistemik uygulanır ve yüksek toksik etkilidir. İlk tedaviye direnç kazanan olgularda ikincil tedaviler ortalama sağ kalıma çok katkı sağlamamaktadır ve ortalama sağkalım 6-9 ay ile sınırlı kalmaktadır (71). ÜK'larda preklinik aşamada araştırılmakta olan hedefe yönelik tedaviler ümitlendirici sonuçlar vermiştir. Günümüzde FDA, 20 farklı protein kinazı hedef alan toplamda 52 hedefe yönelik terapötik için onay vermiş olup mesane kanserlerinde sık gözlenen *FGFR3* mutasyonuna yönelik etkinlik sağlayan erdafitinib bu ajanlardan birisidir (72). İleri evre mesane kanseri hastalarının dahil edildiği geniş serili bir çalışmada %93 hastada hedefe yönelik tedavi seçeneği bulunan en az bir gende mutasyon saptanmıştır. En sık saptanan mutasyonlar *FGFR3*,

*PIK3CA* ve *ERBB2* genlerindedir (49). *EGFR*, *PI3K/mTOR/AKT*, anjiyogenez yollarının inhibisyonunu sağlayan ilaçlarda yapılan faz II ve III çalışmalarında bazı olumlu sonuçlar gözlenmiş olsa da henüz etkin bir tedavi sağlanamamıştır (58). Hücre büyümesi, protein sentezi, anjiyogenez gibi birçok noktada görevi olan *mTOR*, *PI3K-PTEN-AKT* yolağında görevli bir serin treonin kinazdır. Everolimus bu proteine karşı geliştirilmiş bir ajan olup mesane kanserlerinde de uygulanabileceği düşünülmektedir (73). ÜK'da yapılan klinik araştırmalarda everolimusun etkisi çok görülmemiş olsa da spesifik mutasyonu içeren, birinci basamak KT yanıtı kötü olan seçili hastalarda uygulanması tavsiye edilmektedir (49). Iyer ve ark *PI3K/AKT* yolağına ait fonksiyonel özellikleri tanımlayabilmek için mesane kanseri vakalarına ait hücre hatlarına *AKT* inhibitörü olan MK2206 uygulamıştır. *PIK3CA* ve *AKT1* mutasyonu olan vakalar oldukça sensitifken *FGFR3* ve *HRAS* mutasyonu gösteren vakalar daha az duyarlı, *TSC-1* değişikliği olan hücre hatları ise dirençli olarak saptanmıştır. *PI3K/mTOR* yolağı mutasyonları mesane kanserlerinde sık gözleniyor olsa da altta yatan genetik değişikliğin seçici hedefe yönelik tedavi uygulamalarında tedaviye yanıtı belirleyeceği düşünülmektedir (50). Seront ve ark faz II çalışmasında 20 ileri evre, KT dirençli mesane kanseri hastasına uygulamış oldukları *PI3K-mTOR* inhibitörü tedavisinde üç olguda tam olmayan cevap (bir hasta kısmi cevap, iki hastada stabil seyir) almışlardır ve spesifik mutasyonları gösteren olgularda hastalığın seyrini olumlu etkileyebileceği düşünülmüştür (71). RTK yollarında izlenen birden fazla mutasyon varlığında bu tedavilerin etkisiz kalacağı da düşünülmektedir (7). Örneğin; *EGFR/HER2* tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib *EGFR*, *HER2* pozitif ileri evre mesane kanserlerinde denenmiştir, ancak etkin bir sonuç alınamamıştır (74). Benzer şekilde mikropapiller varyant ÜK ile ilişkilendirilen *HER2* aşırı ekspresyonuna yönelik yapılan trastuzumab tedavilerinden de etkin sonuç alınamamıştır (23). Edinilmiş ilaç dirençlerinin 'gate keeper' mutasyonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (72). Ancak, inhibitörün sadece reseptör düzeyinde bir inhibisyon oluşturması ve yolağın ileri basamaklarında gelişen sürücü mutasyonlara etkisiz olması da neden olarak gösterilebilir. Bu tezi destekleyen bir çalışma Wang ve ark tarafından yürütülmüş ve *FGFR* inhibisyonu sağladıkları ürotelyal karsinom hücre dizilerindeki temel direncin *PI3K* yolağından kaynaklandığını tespit etmişlerdir. *FGFR3* mutasyonu izlenen ÜK olgularının *FGFR* ve *PI3K* inhibitörleri ile tedavi edilmelerinin bunu engelleyeceğini savunmuşlardır

(75). Bizim çalışmamızda RTK yolağına ait farklı basamaklarda meydana gelen mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonların bulunduğu tümörlerde *EGFR*, *ERBB2* vb reseptörlerin protein ekspresyon düzeylerinin araştırılması bu konuya ışık tutabilir.

Sonuçta özellikle ileri evre mesane kanserlerinin heterojen mutasyon profillerini tespit etmek hedefe yönelik tedavi şansını oluşturmaktadır. Bizim çalışmamızda da *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* mutasyonları ele alınmış olup farklı oranlarda mutasyon tespit edilmiştir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları;

- \*Ekonomik nedenlerden ötürü olgu sayısının kısıtlı olması,
- \*Yalnızca yüksek evredeki tümörlerin çalışmaya dahil edilmiş olması,
- \*Olguların rekürrenslerinin çalışmaya dahil edilmemiş olması,
- \*Tümör içi heterojenitenin bulunması,
- \**BRAF* ve *PIK3CA* genlerinin tüm gen mutasyonlarının dedekte edilmemesi,
- \*Saptanan mutasyonların Sanger dizileme veya PCR ile doğrulanmamış olması olarak tanımlanabilir.

## 6. SONUÇLAR

-Mesane kanserleri ülkemizde sık gözlenen (3) ve %90'ından fazlasını ÜK'un oluşturduğu tümörlerdir (68).

-Mesane kanserleri, etiolojisinde sigaranın önemli bir yere sahip olduğu, akciğer kanserleri ve melanomdan sonra en yüksek somatik mutasyon çeşitliliği olan tümörlerdir (49).

-Çalışmamız *PIK3CA* mutasyonunun ileri evre mesane kanserlerinde düşük oranda gözlenmekte olduğunu desteklemiştir.

-Literatürde *PIK3CA* mutasyonunun yüksek dereceli mesane kanserlerinde helikal kısmın oransal olarak azaldığı görülmüştür (53). Ancak, rekürrens gelişen vakalarda helikal kısım mutasyonlarının devamlı olduğu dikkati çekmiştir (54). Sonuçta olgularımızda gözlenen helikal kısım baskınlığı da göz önüne alındığında helikal kısım mutasyonlarının ileri evre mesane kanserlerinde ve rekürrenslerde rol oynadığını düşündürmüştür.

-Mesane kanserlerinde diğer organ tümörlerinden farklı olarak *PIK3CA* helikal kısım mutasyonu kinaz kısma oranla daha sık görülmektedir. Çalışmamızın verileri de bu farklılığı desteklemektedir.

-*PI3K*, *RAS* ile aktive olan bir yolaktır. Literatürde bizim çalışmamıza benzer şekilde mesane kanserlerinde *RAS* ve *PIK3CA* mutasyonlarının birlikteliği gözlenmiştir (42). Bu durum hedefe yönelik tedavi etkinliğinin sağlanabilmesi için çoklu ilaç kullanımının gerekebileceğini göstermektedir.

-*KRAS* mutasyonu bizim serimizde belirgin derecede yüksek oranda bulunmuş olup bu farklılık etnik farklılığa bağlı gelişmiş olabilir. Diğer yandan çalışmaya dahil edilen glandüler diferansiasyon gösteren vakalarda, yüksek oranda saptanan *KRAS* mutasyonu bu farkı izah edebilir.

-İÜK'da *BRAF* mutasyonu literatürde çoğunlukla düşük oranlarda tanımlanmıştır. Bizim serimizde literatüre kıyasla daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Kısıtlı vaka sayısının dahil edilmiş olmasına bağlı oransal olarak yüksek görülmesine neden olmuş olabilir.

-*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* mutasyon varlığını klinik, demografik, histopatolojik parametreler ile kıyasladığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamış olup sağ kalım üzerine yapılan analizde anlamlı sonuç izlenmemiştir.

-*KRAS* mutasyonu glandüler diferansiyasyon gösteren İÜK olgularında yüksek oranda gözlenmiş olup kolorektal karsinomlar ile morfolojik, immünohistokimyasal benzerlikleri yanı sıra aynı moleküler zemini paylaştıklarını düşündürmüştür.

-Mesane kanserlerinde KT yanıtın değerlendirilmesinde bazı mutasyonlar (*ATM*, *ERCC2*, *BRCA1* vb) prediktif bir değer göstermiştir (49). Bizim çalışmamızda *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarında prediktif bir değer saptanmamıştır.

-İleri evre mesane kanseri hastalarında geleneksel KT rejimlerinden fayda görülmediği takdirde yeni nesil sekanslama yöntemleri ile mevcut mutasyon profilinin ortaya çıkarılması ve hedefe yönelik tedavilerin uygulanması hastalar için bir umut ışığı olmaktadır. Ancak düşük-yüksek dereceli mesane kanserlerinin rekürrenslerinin de dahil edildiği geniş serili mutasyon analiz çalışmalarına ve tedavi bazlı klinik araştırmalara gereksinim devam etmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1-Millis SZ, Bryant D, Basu G, Bender R, Vranic S, Gatalica Z et al. Molecular profiling of infiltrating urothelial carcinoma of bladder and nonbladder origin. Clin Genitourin Cancer. 2015;13(1):37-49. Pubmed PMID: 25178641.

2-Jemal A, Siegel R, Miller KD. Cancer Statistics Center [Internet]. American Cancer Society; c2018. [Erişim tarihi: 21.04.2020] Erişim adresi:

[https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?\\_ga=2.131826251.574548716.1590501501-762823458.1506604215#!/](https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.131826251.574548716.1590501501-762823458.1506604215#!/)

3-Türkiye Kanser İstatistikleri 2015 [İnternet]. Ankara: Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı; c2017. [Erişim tarihi 15.04.2020] Erişim adresi:

[https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR\\_uzuuun.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR_uzuuun.pdf)

4-Calderaro J, Rebouissou S, de Koning L, Masmoudi A, Hérault A, Dubois T, et al. PI3K/AKT pathway activation in bladder carcinogenesis. Int J Cancer. 2014;134(8):1776-84. Pubmed PMID: 24122582.

5-Juanpere N, Agell L, Lorenzo M, de Muga S, López-Vilaró L, Murillo R, et al. Mutations in FGFR3 and PIK3CA, singly or combined with RAS and AKT1, are associated with AKT but not with MAPK pathway activation in urothelial bladder cancer. Hum Pathol. 2012;43(10):1573-82. Pubmed PMID: 22417847.

6-Meric-Bernstam F, Brusco L, Shaw K, Horombe C, Kopetz S, Davies MA, et al. Feasibility of Large-Scale Genomic Testing to Facilitate Enrollment Onto Genomically Matched Clinical Trials. J Clin Oncol. 2015;33(25):2753-62. Pubmed PMID: 26014291.

7-Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MN, van Rhijn BW, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. PLoS One. 2010;5(11):13821. Pubmed PMID: 21072204.

8- Rehman S, Ahmed D. Embryology, Kidney, Bladder, and Ureter. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; c2020. [Erişim tarihi 30.10.2020]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547747/>

- 9-Yu JS, Kim KW, Lee HJ, Lee YJ, Yoon CS, Kim MJ. Urachal remnant diseases: spectrum of CT and US findings. *Radiographics*. 2001;21(2):451-61. Pubmed PMID: 11259707.
- 10-Devi VS, editor. Urogenital system. In: Inderbir Singh's Human Embriology. 11th ed. New Delhi: The Health Sciences Publisher; 2018. p.265-289.
- 11-Reuter VE, Al-Ahmadie H, Tickoo SK. Urinary bladder, ureter and renal pelvis. In: Mills SE, editor. *Histology for pathologists*. 4th ed. Philedelphia: Wolters Cluwer; 2012. p. 971-986.
- 12-Bolla SR, Odeluga N, Jetti R. Histology, Bladder. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; c2020. [Erişim tarihi 30.10.2020]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540963/>
- 13-Bladder. Radiology Key [Internet]. General Radiology, 2016. [Erişim tarihi 18.12.2020] Erişim adresi: <https://radiologykey.com/bladder-3/>
- 14-Cancer Stat Facts: Bladder Cancer [Internet]. SEER, 2018. [Erişim tarihi: 17.04.2020] Erişim adresi: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>
- 15-Miyazaki J, Nishiyama H. Epidemiology of urothelial carcinoma. *Int J Urol*. 2017;24(10):730-4. Pubmed PMID: 28543959.
- 16-Chang CH, Liu CS, Liu HJ, Huang CP, Huang CY, Hsu HT, et al. Association between levels of urinary heavy metals and increased risk of urothelial carcinoma. *Int J Urol*. 2016;23(3):233-9. Pubmed PMID: 26663353.
- 17-Alfred Witjes J, Lebret T, Compérat EM, Cowan NC, De Santis M, Bruins HM, et al. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2017;71(3):462-75. Pubmed PMID: 27375033.
- 18-Solomon JP, Hansel DE. Prognostic factors in urothelial carcinoma of the bladder: histologic and molecular correlates. *Adv Anat Pathol*. 2015;22(2):102-12. Pubmed PMID: 25664945.
- 19-Hernández-Fernández C, Herranz-Amo F, Moralejo-Gárate M, Subirá-Ríos D, Caño-Velasco J, Barbas-Bernardos G. Infiltrating bladder cancer: prognostic factors, follow-up and treatment of relapses. *Actas Urol Esp*. 2017;41(6):352-8. Pubmed PMID: 27561847.

- 20-Magers MJ, Lopez-Beltran A, Montironi R, Williamson SR, Kaimakliotis HZ, Cheng L. Staging of bladder cancer. *Histopathology*. 2019;74(1):112-34. Pubmed PMID: 30565300.
- 21-Comp rat E, Varinot J. Immunochemical and molecular assessment of urothelial neoplasms and aspects of the 2016 World Health Organization classification. *Histopathology*. 2016;69(5):717-26. Pubmed PMID: 27353436.
- 22-Grignon DJ, Al-Ahmadie H, Algaba F, Amin MB, Comperat E, Dyrskjot L, et al. Tumours of the urinary tract. In: Moch H, Humprey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. WHO classification of tumours of the urogenital system and male genital organs. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016. p. 77-135.
- 23-Solomon JP, Lowenthal BM, Kader AK, Parsons JK, Flaig TW, Siefker-Radtke AO, et al. Challenges in the Diagnosis of Urothelial Carcinoma Variants: Can Emerging Molecular Data Complement Pathology Review? *Urology*. 2017; 102:7-16. Pubmed PMID: 27769917.
- 24-Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):106-19. Pubmed PMID: 26996659.
- 25-Alderson M, Grivas P, Milowsky MI, Wobker SE. Histologic Variants of Urothelial Carcinoma: Morphology, Molecular Features and Clinical Implications. *Bl Cancer*. 2020;6:107-22.
- 26-Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):58. Pubmed PMID: 29455648.
- 27- Mitchell RN. The Cell as a Unit of Health and Disease. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. p. 1-30.
- 28-Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. p. 266-340.
- 29-Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24. Pubmed PMID: 19360079.

- 30-Alifrangis C, McGovern U, Freeman A, Powles T, Linch M. Molecular and histopathology directed therapy for advanced bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2019;16(8):465-83. Pubmed PMID: 31289379.
- 31- Cancer Browser. [Internet]. London: Catalogue of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC); c2020. [Erişim tarihi 27.08.2020] Erişim adresi: [https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?wgs=off&sn=urinary\\_tract&ss=bladder&hn=carcinoma&sh=transitional\\_cell\\_carcinoma&in=t&src=tissue&all\\_data=n](https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?wgs=off&sn=urinary_tract&ss=bladder&hn=carcinoma&sh=transitional_cell_carcinoma&in=t&src=tissue&all_data=n)
- 32-Smal M, Rolevich AI, Nabebina T, Krasny S, Goncharova R. The opposite association of HRAS and KRAS mutations with clinical variables of bladder cancer. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015; 19(5):638.
- 33-Nandan MO, Yang VW. An Update on the Biology of RAS/RAF Mutations in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2011;7(2):113-120. Pubmed PMID: 21625338.
- 34-Ouerhani S, Bougatef K, Soltani I, Elgaaied AB, Abbes S, Menif S. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation in bladder cancer, chronic myeloid leukemia and colorectal cancer. *Mol Biol Rep*. 2013;40(6):4109-14. Pubmed PMID: 23640097.
- 35-Prior IA, Hood FE, Hartley JL. The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res*. 2020;80(14):2969-74. Pubmed PMID: 32209560.
- 36-Maurer G, Tarkowski B, Baccarini M. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene*. 2011;30(32):3477-88. Pubmed PMID: 21577205.
- 37-Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116(6):855-67. Pubmed PMID: 15035987.
- 38-Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54. Pubmed PMID: 12068308.
- 39-Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010; 347:21-41. Pubmed PMID: 20535651.
- 40-Madsen RR, Vanhaesebroeck B, Semple RK. Cancer-Associated PIK3CA Mutations in Overgrowth Disorders. *Trends Mol Med*. 2018;24(10):856-70. Pubmed PMID: 30197175.

- 41-Ross RL, Askham JM, Knowles MA. PIK3CA mutation spectrum in urothelial carcinoma reflects cell context-dependent signaling and phenotypic outputs. *Oncogene*. 2013;32(6):768-76. Pubmed PMID: 22430209.
- 42-Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, Gregory WM, Harnden P, Knowles MA. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):6008-17. Pubmed PMID: 19789314.
- 43-Akhtar M, Al-Bozom IA, Ben Gashir M, Taha NM. Intrinsic Molecular Subclassification of Urothelial Carcinoma of the Bladder: Are We Finally there? *Adv Anat Pathol*. 2019;26(4):251-6. Pubmed PMID: 31188799.
- 44-Solomon JP, Hansel DE. The Emerging Molecular Landscape of Urothelial Carcinoma. *Surg Pathol Clin*. 2016;9(3):391-404. Pubmed PMID: 27523968.
- 45-Warrick JI, Knowles MA, Yves A, van der Kwast T, Grignon DJ, Kristiansen G, et al. Report From the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference On Molecular Pathology Of Urogenital Cancers. II. Molecular Pathology of Bladder Cancer: Progress and Challenges. *Am J Surg Pathol*. 2020;44(7):30-46. Pubmed PMID: 32091435.
- 46-Önal B, Han Ü, Yilmaz S, Köybasioglu F, Altuğ U. The use of urinary nuclear matrix protein 22 (NMP22) as a diagnostic adjunct to urine cytology for monitoring of recurrent bladder cancer--institutional experience and review. *Diagn Cytopathol*. 2015;43(4):307-14. Pubmed PMID: 25488052.
- 47-Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502(7471):333-9. Pubmed PMID: 24132290.
- 48-Lindgren D, Frigyesi A, Gudjonsson S, Sjö Dahl G, Hallden C, Chebil G, et al. Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome. *Cancer Res*. 2010;70(9):3463-72. Pubmed PMID: 20406976.
- 49-Glaser AP, Fantini D, Shilatifard A, Schaeffer EM, Meeks JJ. The evolving genomic landscape of urothelial carcinoma. *Nat Rev Urol*. 2017;14(4):215-29. Pubmed PMID: 28169993.

- 50-Iyer G, Al-Ahmadie H, Schultz N, Hanrahan AJ, Ostrovnaya I, Balar AV, et al. Prevalence and co-occurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(25):3133-40. Pubmed PMID: 23897969.
- 51-Sharma J, Deb B, Kumar P. Developments in the area of bladder cancer genomics and its importance in the treatment selection. *Journal of Molecular Oncology Research*. 2018;2(3):58-62.
- 52-Agell L, Hernández S, Salido M, de Muga S, Juanpere N, Arumí-Uria M, et al. PI3K signaling pathway is activated by PIK3CA mRNA overexpression and copy gain in prostate tumors, but PIK3CA, BRAF, KRAS and AKT1 mutations are infrequent events. *Mod Pathol*. 2011;24(3):443-52. Pubmed PMID: 21113138.
- 53-Sjödahl G, Lauss M, Gudjonsson S, Liedberg F, Halldén C, Chebil G, Månsson W, Höglund M, Lindgren D. A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. *PLoS One*. 2011 Apr 14;6(4):e18583. doi: 10.1371/journal.pone.0018583. PMID: 21533174; PMCID: PMC3077383.
- 54-Sjödahl G, Eriksson P, Patschan O, Marzouka NA, Jakobsson L, Bernardo C, et al. Molecular changes during progression from nonmuscle invasive to advanced urothelial carcinoma. *Int J Cancer*. 2020;146(9):2636-47. Pubmed PMID: 31609466.
- 55-Ward DG, Bryan RT. Liquid biopsies for bladder cancer. *Transl Androl Urol*. 2017;6(2):331-5. Pubmed PMID: 28540249.
- 56-Christensen E, Birkenkamp-Demtröder K, Nordentoft I, Høyer S, van der Keur K, van Kessel K, et al. Liquid Biopsy Analysis of FGFR3 and PIK3CA Hotspot Mutations for Disease Surveillance in Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2017;71(6):961-9. Pubmed PMID: 28069289.
- 57-Birkenkamp-Demtröder K, Christensen E, Nordentoft I, Knudsen M, Taber A, Høyer S, et al. Monitoring Treatment Response and Metastatic Relapse in Advanced Bladder Cancer by Liquid Biopsy Analysis. *Eur Urol*. 2018;73(4):535-40. Pubmed PMID: 28958829.
- 58-Abbosh PH, McConkey DJ, Plimack ER. Targeting Signaling Transduction Pathways in Bladder Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2015;17(12):58. Pubmed PMID: 26472299.

- 59-Boulalas I, Zaravinos A, Delakas D, Spandidos DA. Mutational analysis of the BRAF gene in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Biol Markers*. 2009;24(1):17-21. Pubmed PMID: 19404918.
- 60- Şahpaz A, Önal B, Yeşilyurt A, Han Ü, Delibaşı T. BRAF(V600E) Mutation, RET/PTC1 and PAX8-PPAR Gamma Rearrangements in Follicular Epithelium Derived Thyroid Lesions - Institutional Experience and Literature Review. *Balkan Med J*. 2015;32(2):156-66. Pubmed PMID: 26167339.
- 61-Necchi A, Madison R, Pal SK, Ross JS, Agarwal N, Sonpavde G, et al. Comprehensive Genomic Profiling of Upper-tract and Bladder Urothelial Carcinoma. *Eur Urol Focus*. 2020;2405-4569(20):30214-5. Pubmed PMID: 32861617.
- 62-Zaravinos A, Chatziioannou M, Lambrou GI, Boulalas I, Delakas D, Spandidos DA. Implication of RAF and RKIP genes in urinary bladder cancer. *Pathol Oncol Res*. 2011;17(2):181-90. Pubmed PMID: 20853079.
- 63-Karlou M, Saetta AA, Korkolopoulou P, Levidou G, Papanastasiou P, Boltetsou E, et al. Activation of extracellular regulated kinases (ERK1/2) predicts poor prognosis in urothelial bladder carcinoma and is not associated with B-Raf gene mutations. *Pathology*. 2009;41(4):327-34. Pubmed PMID: 19404844.
- 64-Ross JS, Wang K, Al-Rohil RN, Nazeer T, Sheehan CE, Otto GA, et al. Advanced urothelial carcinoma: next-generation sequencing reveals diverse genomic alterations and targets of therapy. *Mod Pathol*. 2014;27(2):271-80. Pubmed PMID: 23887298.
- 65-Longo T, McGinley KF, Freedman JA, Etienne W, Wu Y, Sibley A, et al. Targeted Exome Sequencing of the Cancer Genome in Patients with Very High-risk Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2016;70(5):714-7. Pubmed PMID: 27520487.
- 66-Critelli R, Fasanelli F, Oderda M, Polidoro S, Assumma MB, Viberti C, et al. Detection of multiple mutations in urinary exfoliated cells from male bladder cancer patients at diagnosis and during follow-up. *Oncotarget*. 2016;7(41):67435-48. Pubmed PMID: 27611947.
- 67-Ward DG, Gordon NS, Boucher RH, Pirrie SJ, Baxter L, Ott S, et al. Targeted deep sequencing of urothelial bladder cancers and associated urinary DNA: a 23-gene panel with utility for non-invasive diagnosis and risk stratification. *BJU Int*. 2019;124(3):532-44. Pubmed PMID: 31077629.

- 68-Akgul M, MacLennan GT, Cheng L. The applicability and utility of immunohistochemical biomarkers in bladder pathology. *Hum Pathol.* 2020;98:32-55. Pubmed PMID: 32035992.
- 69-Liu Y, Sethi NS, Hinoue T, Schneider BG, Cherniack AD, Sanchez-Vega F, et al. Comparative Molecular Analysis of Gastrointestinal Adenocarcinomas. *Cancer Cell.* 2018;33(4):721-35. Pubmed PMID: 29622466.
- 70-Scott A, Goffredo P, Ginader T, Hrabe J, Gribovskaja-Rupp I, Kapadia MR, et al. The Impact of KRAS Mutation on the Presentation and Prognosis of Non-Metastatic Colon Cancer: an Analysis from the National Cancer Database. *J Gastrointest Surg.* 2020;24(6):1402-10. Pubmed PMID: 32128676.
- 71-Seront E, Rottey S, Filleul B, Glorieux P, Goeminne JC, Verschaeve V, et al. Phase II study of dual phosphoinositol-3-kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor BEZ235 in patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *BJU Int.* 2016;118(3):408-15. Pubmed PMID: 26779597.
- 72-Roskoski R Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol Res.* 2020;152:104609. Pubmed PMID: 31862477.
- 73-Milowsky MI, Iyer G, Regazzi AM, Al-Ahmadie H, Gerst SR, Ostrovnaya I, et al. Phase II study of everolimus in metastatic urothelial cancer. *BJU Int.* 2013;112(4):462-70. Pubmed PMID: 23551593.
- 74-Powles T, Huddart RA, Elliott T, Sarker SJ, Ackerman C, Jones R, et al. Phase III, Double-Blind, Randomized Trial That Compared Maintenance Lapatinib Versus Placebo After First-Line Chemotherapy in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 1/2-Positive Metastatic Bladder Cancer. *J Clin Oncol.* 2017;35(1):48-55. Pubmed PMID: 28034079.
- 75-Wang L, Šuštić T, Leite de Oliveira R, Liefstink C, Halonen P, van de Ven M, et al. A Functional Genetic Screen Identifies the Phosphoinositide 3-kinase Pathway as a Determinant of Resistance to Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitors in FGFR Mutant Urothelial Cell Carcinoma. *Eur Urol.* 2017;71(6):858-62. Pubmed PMID: 28108151.