



T.C.

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MESANE KANSERİNİN TANISINDA SERUM VE İDRAR
S100A8/A9 DÜZEYLERİ İLE SERUM S100A8 VE S100A9
DÜZEYLERİNİN ÖNEMİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜR YAŞAR

DANIŞMAN: PROF. DR. TULAY AKÇAY

İSTANBUL - 2015

TEŞEKKÜR

Asistanlığım sırasında bana daima destek çıkan, bilime dair bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, değerli danışman hocam Prof. Dr. Tülay Akçay'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca bana katkısı olan baőtta anabilim dalı baőtkanımız Prof. Dr. Dildar Konukoğlu'na ve krsmzn diğer ğretim yelerine,

Bu alıőma sırasında hastaların temini ile klinik açıdan bilgilendirme ve yönlendirmeleri için Prof. Dr. Can bek'e,

teşekkür ederim.

KISALTMALAR

AJCC	: American Joint Committee on Cancer
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
BTA	: Bladder Tumor Antigen (Mesane Tümör Antijeni)
CA125	: Carbohydrate Antigen 125 (Karbonhidrat Antijen 125)
CEA	: Carcinoembryonic Antigen (Karsinoembriyonik Antijen)
DAMP	: Damage-associated Molecular Pattern (Hasar-ilişkili Moleküler Patern)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EGF	: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
hCFHrp	: Human Complement Factor H-related Protein (İnsan Kompleman Faktör H-ilişkili Protein)
HRP	: Horseradish Peroksidaz
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MRP	: Myeloid-Related Protein (Myeloid-İlişkili Protein)
NMP22	: Nükleer Matriks Protein 22
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
RAGE	: Receptor for Advanced Glycation Endproducts (İleri Glikasyon Son Ürünleri için Reseptör)

- ROC** : Receiver Operating Characteristic
- SPSS** : Statistical Package for the Social Sciences
- TLR4** : Toll-like Reseptör 4
- TMB** : Tetrametilbenzidin
- TURBT** : Transurethral Resection of Bladder Tumor (Mesane Tümörünün Transüretral Rezeksiyonu)



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	II
KISALTMALAR	III
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar	VIII
ŞEKİLLER	IX
1. ÖZET	1
2. İNGİLİZCE ÖZET	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Mesane Kanseri	5
4.1.1. Mesane Kanserinin Patolojisi	6
4.1.2. Mesane Kanserinde Evreleme ve Derecelendirme	7
4.1.3. Mesane Kanserinde Tanı	9
4.1.4. Mesane Tümörü Antijeni (Bladder Tumor Antigen, BTA)	10
4.2. S100 Proteinleri	10
4.2.1. S100A8, S100A9 ve S100A8/A9 Kompleksi (Kalprotektin)	11
4.2.2. S100A8, S100A9, Kalprotektin ve Kanser	13
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
5.1. Gereçler	15
5.2. Yöntemler	15
5.2.1. Örneklerin Hazırlanması	16
5.2.2. İdrar Kreatininin Düzeyleri	16

5.2.3. İdrar BTA Düzeyleri	17
5.2.4. Serum S100A8 Düzeyleri.....	19
5.2.5. Serum S100A9 Düzeyleri	21
5.2.6. Serum ve İdrar S100A8/A9 (Kalprotektin) Düzeyleri	23
5.2.7. Histopatolojik Değerlendirme.....	24
5.2.8. İstatistiksel Analiz	25
6. BULGULAR.....	26
6.1. Cinsiyet ve sigara kullanımının ölçülen parametrelerin üzerine olası etkilerinin değerlendirilmesi	26
6.2. Kontrol grubu içerisinde korelasyonlar	28
6.3. Ölçülen parametrelerin tüm çalışma gruplarında değerlendirilmesi.....	30
6.4. Hasta gruplarında korelasyonlar	32
6.5. Tüm çalışma grupları dahilinde korelasyonlar.....	33
6.6. ROC eğrileri ve tanısal duyarlılık/özgüllük karşılaştırmaları	35
7. TARTIŞMA	40
8. KAYNAKLAR.....	46
9. ÖZGEÇMİŞ	54



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 45485

TABLolar

Tablo 1A. Kontrol grubunda kadın ve erkeklerin serum S100A8, S100A9 ve kalprotektin düzeyleri	26
Tablo 1B. Kontrol grubunda kadın ve erkeklerin idrar kalprotektin ve BTA değerleri ile kalprotektin/kreatinin ve BTA/kreatinin oranları.....	27
Tablo 2A. Kontrol grubunda sigara kullanan ve kullanmayanların serum S100A8, S100A9 ve kalprotektin düzeyleri.....	27
Tablo 2B. Kontrol grubunda sigara kullanan ve kullanmayanların idrar kalprotektin ve BTA değerleri ile kalprotektin/kreatinin ve BTA/kreatinin oranları.....	28
Tablo 3. Kontrol grubunda ölçülen parametreler arası korelasyon değerlendirmeleri.....	29
Tablo 4A. Kontrol gruplarında ve hasta alt gruplarında serum S100A8, S100A9 ve kalprotektin düzeyleri	30
Tablo 4B. Kontrol grubunda ve hasta alt gruplarında idrar kalprotektin ve BTA değerleri ile kalprotektin/kreatinin ve BTA/kreatinin oranları.....	31
Tablo 5. Hasta gruplarında ölçülen parametreler arası korelasyon değerlendirmeleri.....	33
Tablo 6. Tüm katılımcılar dahilinde ölçülen parametreler arası korelasyon değerlendirmeleri.....	34

ŞEKİLLER

Şekil 1. Mesane kanserinde evreleme	7
Şekil 2. S100A8'in moleküler yapısı	11
Şekil 3. S100A9'un moleküler yapısı	12
Şekil 4. Kalprotektinin moleküler yapısı	13
Şekil 5. Kreatinin standart eğrisi	17
Şekil 6. BTA standart eğrisi	19
Şekil 7. S100A8 standart eğrisi	21
Şekil 8. S100A9 standart eğrisi	22
Şekil 9. S100A8/A9 (Kalprotektin) standart eğrisi	24
Şekil 10. Ölçülen parametrelerin tüm hastaları sağlıklılarından ayırabilme yeteneklerini karşılaştıran ROC eğrisi	35
Şekil 11. Ölçülen parametrelerin tüm invaziv olguları (T1-4) non-invaziv (Ta) olgulardan ayırabilme yeteneklerini karşılaştıran ROC eğrisi	36
Şekil 12. Ölçülen parametrelerin kasa invaziv olguları (T2-4) non-invaziv (Ta) ve bağ dokusuna invaziv (T1) olgulardan ayırabilme yeteneklerini karşılaştıran ROC eğrisi	37
Şekil 13. Ölçülen parametrelerin yüksek dereceli olguları düşük derecelilerden ayırabilme yeteneklerini karşılaştıran ROC eğrisi	38

1. ÖZET

Giriş: S100 proteinlerinden S100A8, S100A9 ve bunların oluşturduğu heterodimer kompleks olan kalprotektin, inflamatuvar yollarda yer aldığı kadar tümör oluşumu ve gelişiminde de rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle birçok kanserde araştırılmıştır, fakat mesane kanserinde bu konuda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda S100A8 ve S100A9'un düzeylerini serumda, kalprotektinin düzeylerini de serum ve idrarda belirleyip mesane kanserinin tanı ve takibinde kullanılan bir belirteç olan idrar BTA düzeyleri ile karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda sağlıklı kontroller (n=48) ve mesane kanserli hastalar (n=73) olmak üzere iki ana grup oluşturuldu. Hasta grubu, tümörlerin evre ve derecelerine göre alt gruplara da ayrıldı. Sağlıklı kontroller ile hastaların idrar BTA düzeyleri, serum S100A8 ile S100A9 düzeyleri ile serum ve idrar kalprotektin düzeyleri ticari ELISA kitleri ile belirlendi.

Bulgular: Serum S100A8 ve S100A9 düzeyleri hasta ve kontrollerde anlamlı fark göstermezken serum ve idrar kalprotektin düzeyleri ile idrar BTA düzeyleri hastalarda kontrollere göre anlamlı yüksekti ($p<0,001$). Serum kalprotektin düzeylerinde hasta alt gruplarında herhangi bir anlamlı fark bulunmazken idrar BTA düzeyleri ise hem yüksek dereceli tümörleri düşük dereceli tümörlerden ($p<0,05$), hem de tüm invaziv olguları (T1-4) noninvaziv olgulardan (Ta) ayırabilmekteydi ($p<0,05$). Buna karşın idrar kalprotektin düzeyleri de kasa invaziv olgularda (T2-4) diğer evrelere (Ta ve T1) göre anlamlı yüksekti ($p<0,05$).

Sonuç: İdrar kalprotektin düzeyleri mesane kanserinin tanısında, kasa invazyon belirteci olarak idrar BTA düzeylerini desteklemek amacıyla kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Mesane kanseri, S100A8, S100A9, kalprotektin, BTA

2. İNGİLİZCE ÖZET

Introduction: Members of the S100 protein family, S100A8, S100A9 and their heterodimer complex known as calprotectin are thought to be involved not only in inflammatory pathways but also in tumorigenesis and cancer progression. Therefore, they have been widely studied in various types of cancer; however, there is limited knowledge about their role in bladder cancer. In this study, our aim was to determine the levels of S100A8 and S100A9 in the sera, and calprotectin levels in the sera and urines of bladder cancer patients and compare it to urinary BTA, a tumor marker that can be used in the diagnosis of bladder cancer.

Materials and Methods: The study was comprised of two major groups: 48 healthy controls and 73 patients with bladder cancer. The patient group was also divided into subgroups according to tumor stage and grade. Urine BTA levels, serum S100A8 and S100A9 levels, and serum and urine calprotectin levels in healthy controls and patients were determined using commercially available ELISA kits.

Results: While serum S100A8 and S100A9 levels did not differ between the controls and patients significantly, serum and urine calprotectin levels and urine BTA levels were significantly elevated in patients compared to controls ($p<0.001$). Serum calprotectin levels did not differ significantly among the patient subgroups; on the other hand, urine BTA levels could both discriminate high grade tumors from low grades ($p<0.05$) and all invasive tumors (T1-4) from non-invasive stage (Ta) ($p<0.05$). However, urine calprotectin levels were significantly elevated in muscle-invasive tumors (T2-4) compared to other stages (Ta and T1) ($p<0.05$).

Conclusion: Urine calprotectin levels can be used to assist BTA in the diagnosis of bladder cancer as a marker for muscle invasion.

Keywords: Bladder cancer, S100A8, S100A9, calprotectin, BTA

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri, sık görülen kanserler arasındadır. Erkeklerde kadınlara göre daha yaygın görülmektedir. Sigara kullanımı ve çeşitli karsinojenlere mesleki maruziyet ile ilişkili bulunan mesane kanseri, yüksek nüks ve mortalite oranları ile seyretmektedir (1). Bu nedenle tanısı, tedavisi ve takibinde birçok yöntem geliştirilmiş ve günümüzde de hala geliştirilmektedir. Çoğu kanser türünde olduğu gibi, mesane kanserinin de tanısı ve takibinde kullanılan birtakım tümör belirteçleri bulunmaktadır. Bu belirteçlerden biri mesane tümör antijenidir (BTA). Bu belirteç, mesane kanserli hastaların idrarında artış göstermektedir ve bu kanserin tanısı ve takibinde kullanımı, FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylıdır. Mesane kanserine yönelik diğer tümör belirteçlerinde olduğu gibi, BTA'nın da bu kansere özgüllüğü sitolojiden daha düşüktür, bu yüzden hastaların takibinde sitolojinin yerini alamamaktadır, ancak yüksek duyarlıklılı, noninvaziv bir test olduğu için mesane kanserinin tanısı ve takibinde kullanılabilir (2).

S100 proteinleri, kalsiyum bağlama özelliği gösteren, en az yirmi üyesi bulunan bir protein ailesidir. Kimi zaman tek başına, kimi zaman da birbirleriyle kompleks yapmış biçimde bulunan bu proteinlerin, enzim aktivitesinin düzenlenmesi, protein fosforilasyonu, kalsiyum homeostazi, hücre iskeleti bileşenleri ve transkripsiyonel faktörlerin düzenlenmesi gibi birçok hücre içi ve dışı fonksiyonları olduğu bildirilmektedir. Fizyolojik etkilerinin yanı sıra, bu proteinler inflamatuvar yollarda da yer almaktadır ve bu yüzden birçok inflamatuvar hastalıkta ekspresyon düzeyleri artmaktadır. Ayrıca, S100 proteinleri tümör oluşumunda ve ilerlemesinde de rol oynamaktadır, dolayısıyla birçok kanserde araştırılmış ve hala araştırılmaktadır (3).

Bu protein ailesinin üyelerinden S100A8, S100A9 ve bu iki proteinin oluşturduğu S100A8/A9 kompleksinin (kalprotektin), bazı kanserlerde ekspresyonunun arttığı ve düzeylerinin, hasta serumlarında yükseldiği saptanmıştır. Bu proteinlerin mesane kanserinde de önemini araştıran çalışmalar mevcuttur. Yakın zamanda yapılan bazı çalışmalarda, mesane tümörlerinden alınan biyopsi örneklerinde bu proteinlerin ekspresyonu artış göstermektedir; ayrıca bu artış, hastalığın evresi ve derecesi ile ilişkili bulunmuştur (4, 5). Ancak bu tür çalışmalar çok sınırlı sayıda ve hiçbiri mesane kanserinde kullanılan başka bir tümör belirteci ile bu proteinlerin tanısallık performansını karşılaştırmamıştır.

Çalışmamızda, mesane kanserli hastaların BTA düzeylerini idrarda, S100A8 ile S100A9 düzeylerini serumda ve kalprotektin düzeylerini serum ile idrarda ELISA yöntemiyle

saptayarak bu hastalardaki önemini araştırmayı (hastaların klinik evre, histolojik derece, lokal invazyon gibi klinik göstergelerinin değerlendirilmesi ve elde edilen bulguların anlamlılığının tartışılması) amaçladık.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Mesane Kanseri

Mesane kanseri, idrar yollarının en sık görülen malignitesidir (6). Dünya genelinde erkeklerde en sık görülen kanserler arasında yedinci, kadınlarda ise onyedinci sırada yer almaktadır (1). Ayrıca tüm dünyada en sık görülen kanserler arasında 11. sırada yer almakta olup, toplumda yaklaşık 6/100.000 gibi bir sıklıkta izlenmektedir (7). Bu kanser, kanser ile ilişkili ölümlerin nedenleri arasında da 14. sırayı almaktadır (7).

Bu hastalık, ileri yaşlarda daha sık görülmektedir. 40 yaşın altında nadir görülmekle birlikte mesane kanserine çoğunlukla 55 yaş ve üzeri kişilerde rastlanır (8). Bununla beraber, erkekler kadınlara göre 3 ila 4 kat daha fazla risk altındadır (7). Batı toplumlarında, özellikle beyaz ırkta, bir erkeğin yaşamı boyunca mesane kanseri tanısı almasının olasılığı yaklaşık 25'te 1'dir. Buna karşılık her 80 kadından yalnızca biri yaşamı boyunca mesane kanseri olmaktadır (1). Ölüm oranlarına bakılırsa, mesane kanseri erkeklerde kanser ile ilişkili ölümlerin yaklaşık %3'ünü, kadınlarda ise %1,5'ini oluşturmaktadır. Bu kanser, yaşlılarda daha mortal seyretmektedir. Çünkü genel olarak gençlerde daha düşük evreli tümörler görülür (9).

Mesane kanseri birçok maddeye maruziyet ile ilişkili bulunmuştur. Bu anlamda sigara kullanımı, bilinen en önemli risk faktörüdür (10). Mesane kanser olgularının çoğunluğu sigara kullanımı ile ilişkili bulunmuş, sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre mesane kanserine yakalanma olasılıkları 2 ila 4 kat artmıştır (11). Bunun nedeni sigarada bulunan beta naftilamin gibi aromatik aminlerin vücuttan renal yolla atılması ve tüm üriner sisteme, özellikle de mesaneye, karsinojenik etki göstermesidir (12). Sigaraya ek olarak, benzidin, 4-aminobifenil, 4-kloro-o-toluidin gibi aromatik aminlere ve polisiklik hidrokarbonlara mesleki maruziyet de yine mesane kanseri için önemli bir risk faktörüdür. Bu tür maruziyet ile özellikle boya, metal ve petrol işçiliğinde sık karşılaşılmaktadır (12). Bunlar dışında klinikte kemoterapide kullanılan siklofosfamid ve pelvik bölgeye radyoterapi uygulanması (prostat kanserinde) da mesane kanserine neden olabilir (13). Ayrıca, özellikle daha az gelişmiş ülkelerde görülen, mesanenin *Schistosoma hematobium* tarafından kronik enfeksiyonu da yine kanseri tetikleyebilmektedir (14).

4.1.1. Mesane Kanserinin Patolojisi

Karsinojen maddeler hedef hücrenin genetik materyalinde birtakım değişimlere neden olurlar ve bu şekilde tümör oluştururlar. Genetik değişikliklerin pek çok mekanizması olsa da kanser oluşumu için en önemli değişimler onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonudur (15). Onkogenler, büyüme için gerekli olan protoonkogenlerden kaynaklanırlar. Protoonkogenler malign transformasyona uğrayıp onkogenlere dönüştüğünde, hücre normal büyüme kontrolünden çıkar ve malign fenotip gösterir (15). Özellikle p21 Hras onkogeni, mesane kanserinin gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (16). Tümör süpresör genler ise hücrelerin mitotik döngüsü içindeki kontrol noktalarıdır. Bu döngüdeki fazlar arası geçişlerde, bu genler sayesinde büyüme kontrolü, DNA tamiri ve gerekirse apoptoz sağlanır. Bu genlerdeki herhangi bir değişim bu mekanizmaların çalışmasını engelleyebilir ve dolayısıyla büyüme kontrolünün kaybolmasına, hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin apoptoza uğramayıp kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına yol açabilir (15). Bu genler arasında mesane kanseri ile ilişkilendirilenler kromozom 17p'de yerleşen p53 geni ile kromozom 13q'da yerleşen Rb genidir (17). Ayrıca p16 gibi başka tümör süpresör etki gösteren proteinlerin kodlandığı genleri içeren 9. kromozomdaki mutasyonlar da mesane kanserine neden olabilmektedir (18).

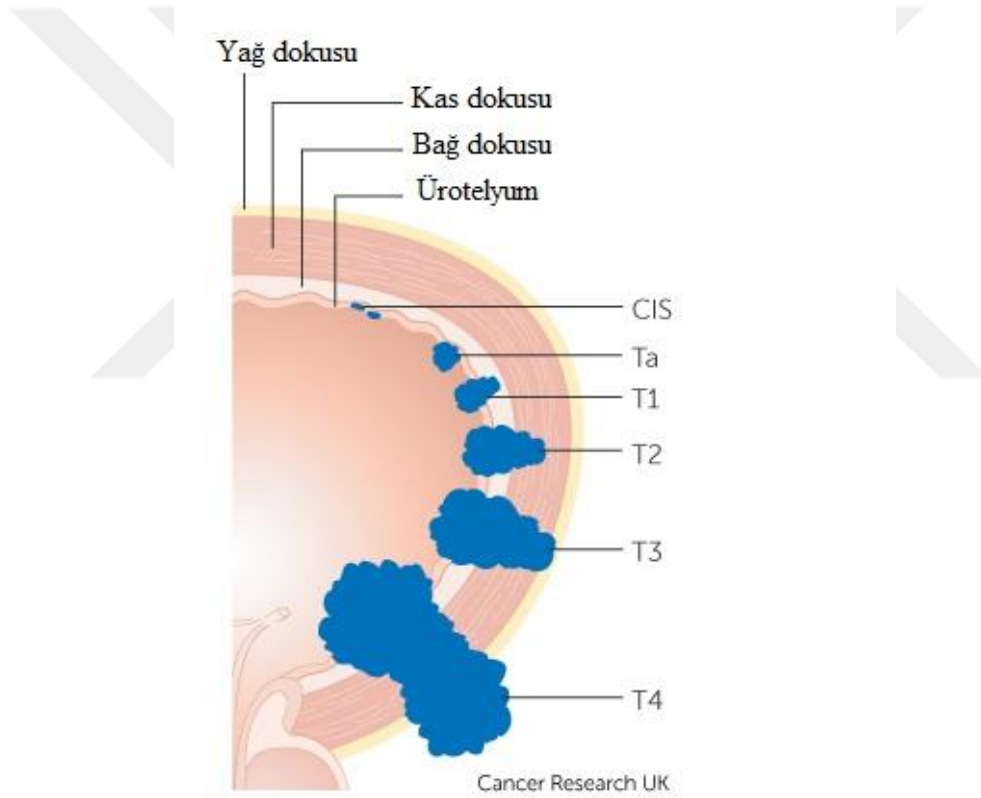
Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonu dışında genetik modifikasyon sonucu çeşitli büyüme faktörlerinin artışı veya bunların reseptörlerinde aşırı bir ekspresyon da karsinojenik bir etki oluşturabilir (15). Bunlardan özellikle epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörleri mesane kanser hücrelerinde artış gösterdiği bildirilmiş ve bu artışın tümörün evre ve derecesinin yanında kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (19).

Mesane kanserinin en sık görülen histolojik tipi değişici (tranzisyonel) epitel hücreli karsinomdur (20). Mesane tümörlerinin %90'ından fazlasını oluşturan değişici epitel hücreli karsinom, papiller, infiltratif, nodüler, intraepitelyal (karsinoma in situ) ya da mikst şeklinde olabilir. En sık papiller büyüme gösterirler (21). Prognozları diğer tiplere göre genel olarak daha iyidir. Daha az sıklıkta görülen (%2-3) bir başka histolojik tip skuamöz hücreli karsinomdur. Bu karsinom, genellikle kronik inflamasyon zemininde gelişir. Bu kanser tipine neden olan başlıca durumlar, taşlar, uzun süreli kateter kullanımı ve *Schistosoma hematobium* enfeksiyonu olarak sıralanabilir. Adenokarsinomlar daha da az görülür ve mesane kanserlerinin yaklaşık %2'sini oluştururlar. Bu kanserler genellikle çevre organlardan (rektum, endometrium, prostat, over gibi) yayılan metastatik adenokarsinomlardır. Bunlar dışında lenfomalar, leiomyosarkom, rabdomyosarkom, anjiosarkom gibi mezenkimal tümörler

de mesanede ortaya çıkabilir. Ancak bütün bunların prognozu değişici epitel hücreli karsinoma göre daha kötüdür (21).

4.1.2. Mesane Kanserinde Evreleme ve Derecelendirme

Prognozu belirleyen faktörler arasında tümörün çapı, sayısı ve morfolojik paterni (papiller veya infiltratif) sayılabilir. Ancak her kanserde olduğu gibi, mesane kanserinde de evreleme oldukça önemlidir. Çünkü evreleme esas alınarak seçilecek tedavi rejimi belirlenir. AJCC'nin (American Joint Committee on Cancer) sınıflamasına göre (22) mesane kanserinin evrelemesinde kullanılan TNM sistemi aşağıda belirtilmiştir:



şekil 1. Mesane kanserinde evreleme (<http://www.cancerresearchuk.org/>)

TX: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümöre ait kanıt yok

Ta: İnvaziv olmayan papiller karsinom (rotelyuma sınırlı)

Tis: Karsinoma in situ

T1: Epitel altı bağ dokusu tutulumu

T2a: Yüzeyel kas dokusu (iç yarı) tutulumu

T2b: Derin kas dokusu (dış yarı) tutulumu

T3a: Perivezikal yağ dokusu tutulumu (mikroskopik düzeyde)

T3b: Perivezikal yağ dokusu tutulumu (gözle görünür, makroskopik düzeyde)

T4a: Çevre organ/yapıların tutulumu (prostat, uterus, vajen)

T4b: Çevre organ/yapıların tutulumu (pelvik veya abdominal duvar tutulumu)

NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Pelviste tek bir bölgesel lenf nodu metastazı

N2: Pelviste birden fazla bölgesel lenf nodu metastazı

N3: Ana iliak arter çevresinde lenf nodu metastazı

MX: Uzak metastazlar değerlendirilemiyor

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var (en sık lenf nodlarına, kemiklere, akciğere ve karaciğere)

Tedavinin planlanması açısından bu evreleme sistemine bazı pratik gruplamalar getirilmiştir. Bunlardan en temeli, kasa invaziv olan ve kasa invaziv olmayan terimleridir. Kasa invaziv olmayan tümörler Ta, Tis ve T1 evrelerini kapsar ve tüm mesane kanseri olgularının %70-80'ini oluştururlar. Bu tümörler nispeten daha iyi prognozludur ve daha basit tedaviler yeterli olur. Kasa invaziv terimi ise T2, T3 ve T4 evrelerinin tümünü ifade eder, olguların %20-30'unu oluşturur ve daha agresif tedavi rejimlerini gerektirir. Kasa invaziv olmayan tümörlerde TURBT (mesane tümörünün transüretral rezeksiyonu) işlemini takiben Bacillus Calmette-Guerin (BCG) ile immunoterapi veya mitomisin gibi ajanlarla kemoterapi uygulaması çoğunlukla tercih edilir (23). Kasa invaziv tümörlerde ise yaklaşım farklıdır. Bu derece ilerlemiş olgularda altın standart tedavi biçimi radikal sistektomidir, ancak cerrahi

öncesi tümör boyutunu küçültmek amacıyla neoadjuvan kemoterapi veya radyoterapi uygulanabilir. Metastatik olgularda veya karın duvarına infiltrasyon varlığı gibi sistektominin yapılamayacağı durumlarda radyoterapi veya sistemik kemoterapi uygulanmaktadır (24). Yüksek dereceli T1 evrelerindeki tümörlerin yüksek rekürrens ve kasa invazyon potansiyelleri olduğundan bazen T1 evresi, T2, T3 ve T4 evreleri gibi invaziv mesane tümörleri olarak değerlendirilip buna göre agresif bir tedavi uygulanmaktadır (25).

Prognozu belirleyen diğer bir faktör de mesane tümörünün derecesidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün bildirdiği son kriterlere göre (26) mesane tümörleri şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

- Urotelyal papillom
- Düşük malignite potansiyeli bulunan papiller urotelyal neoplazm
- Düşük derece papiller urotelyal karsinom
- Yüksek derece papiller urotelyal karsinom

Bu sınıflamaya ve AJCC'nin de son yönergelerine göre mesane kanseri günümüzde düşük ve yüksek derece olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır.

4.1.3. Mesane Kanseri Tanı

Semptomlarının başında makroskopik hematurinin geldiği mesane kanserinin tanısı günümüzde başlıca sistoskopi ve sistoskopi sırasında görüntülenen tümör dokusundan alınan biyopsi örneği ile konmaktadır (27). Bunun dışında ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans ve pozitron emisyon tomografisi tümörün yayılımını değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Sistoskopi, tanıya ek olarak takipte nüks eden tümörlerin tespitinde de kullanılmaktadır, ancak invaziv bir işlemdir. Enfeksiyon, kanama, perforasyon ve verilen anesteziye bağlı iyatrojenik riskler barındırır (28). Buna alternatif olarak idrar sitolojisi kullanılabilir, ama bu da her ne kadar özgüllüğü kanser hücreleri için yüksek olsa da duyarlılığı göreceli olarak düşüktür (28).

Mesane kanserinde tümör dokusundan birtakım maddeler salınmaktadır. Bu maddelerin bazıları birer tümör belirteci olarak günümüzde kullanılmakta ve geliştirilmektedir. Mesane idrara doğrudan temas halinde olduğu için kanser tanısında

yardımcı olması açısından bazı idrar belirteçleri geliştirilmiştir (2). Bunlardan bazıları mesane kanserinin tanısı ve takibinde kullanımı FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmıştır, ancak tümörün invazyon derecesi ve kanserin prognozu hakkında verdikleri bilgiler yeterli değildir (29).

4.1.4. Mesane Tümörü Antijeni (Bladder Tumor Antigen, BTA)

BTA testi, idrarda insan kompleman faktör H-ilişkili proteininin [human complement factor H-related protein (hCFHrp)] düzeylerini tayin eder (28). Bu protein mesane tümörleri tarafından idrara salınmaktadır (30) ve kanser hücrelerinin immün hücreler tarafından lizisini önlediği düşünülmektedir (2).

Yüksek duyarlılığı dışında %97'ye varan özgüllük değerleri idrar BTA düzeyleri için rapor edilmektedir. Ancak bu değerler, mesane kanserli hastaların sağlıklı kontrollere göre kıyaslaması sonucu elde edilmiştir. Diğer genitörüner malignitelerle karşılaştırıldığında bu özgüllük değeri %46'ya kadar düşmektedir (31). Yine de BTA, mesane kanserinin tanısında ve takibinde kullanılacak noninvaziv testlerden biridir.

4.2. S100 Proteinleri

S100 proteinleri, 20'nin üzerinde üyesi bulunan bir protein ailesidir (32). Adlarını nötr pH'daki %100 amonyum sülfat çözeltisinde çözünebilme özelliklerinden alırlar (33). İlk defa 1965 yılında Moore BW tarafından tanımlanan S100 proteinleri, ortalama 10-12 kDa ağırlığındadırlar ve yalnızca omurgalılarda bulunmaktadır (34).

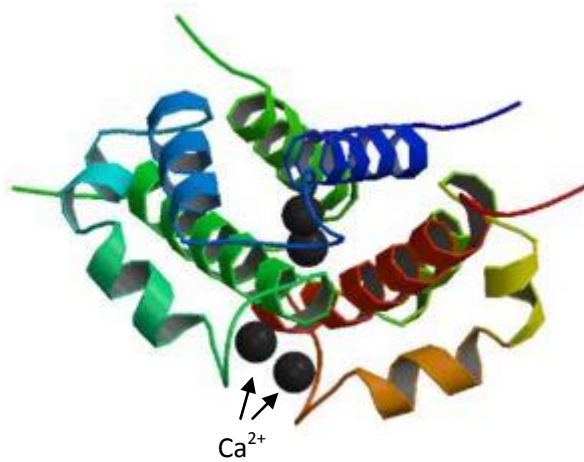
Yapısal olarak bakıldığında, tüm S100 proteinleri kalsiyum bağlayıcı EF-hand motifleri içerirler. Bu motifler, bir düğüm ile birbirine bağlı E ve F adı verilen iki heliksten oluşur (35). Kalsiyumun bağlandığı bölge bu düğümdür. S100 proteinlerinde ikişer adet EF-hand motifi bulunmaktadır; bunlardan biri karboksi terminalindedir ve bu motif tüm EF-hand proteinlerinde (kalmodulin, troponin, ... gibi) ortaktır. Amino terminalinde bulunan diğer motif ise S100 protein ailesine spesifiktir. Karboksi terminalinde ayrıca bir amino asit dizisi uzantısı da bulunmaktadır. Bu iki motifin arasında kalan bölgeye menteşe bölgesi adı verilir ve bu bölge ile karboksi terminaldeki amino asit kalıntısı S100 proteinlerinin kendilerine özgü

fonksiyonlarından sorumludur (3, 35). S100 proteinleri vücutta homodimer, heterodimer veya oligomer olarak bulunabilirler (3) (Şekil 2-4).

S100 proteinlerinin, protein fosforilasyonu, hücre büyümesi ve hareketliliği, hücre döngüsünün düzenlenmesi, transkripsiyon, differensiyasyon ve hücre sağkalımı gibi pek çok fonksiyonları bulunmaktadır (36). Ayrıca kalsiyum bağlama özelliklerinden dolayı kalsiyum homeostazında da rol oynarlar. Aslında S100 proteinlerine ait fonksiyonların çoğu kalsiyum bağımlıdır ve ancak kalsiyum ortamda bulunduğu zaman çeşitli enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesi veya hücre iskeleti ile etkileşimleri gibi işlevlerini gerçekleştirebilirler (37). S100 proteinlerinin bir başka özelliği de birbirleri ile homodimer veya heterodimer kompleks oluşturmasıdır. Bu şekilde fonksiyonlar arası dinamik bir geçiş sağlanır (37).

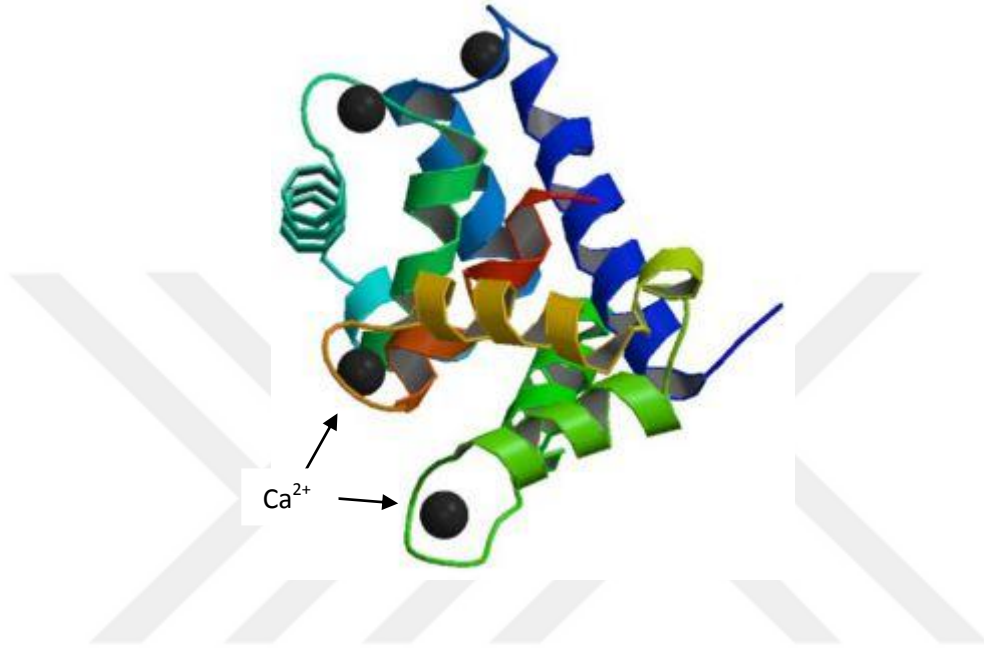
4.2.1. S100A8, S100A9 ve S100A8/A9 Kompleksi (Kalprotektin)

S100 proteinlerinden S100A8 ve S100A9 ilk defa myeloid kökenli hücrelerde keşfedildikleri için myeloid-ilişkili proteinler olarak adlandırılmışlardır [S100A8: myeloid-related protein 8 (MRP8); S100A9: myeloid-related protein 14 (MRP14)]. Granülositlerin içinde bol miktarda bulunup kalsiyum da bağlayabildiklerinden dolayı ayrıca kalgranülin A (S100A8) ve kalgranülin B (S100A9) olarak da tanımlanmaktadır. Bu iki proteinin oluşturduğu heterodimer komplekse (S100A8/A9) ise kalprotektin (MRP8/14) adı verilmektedir (38).



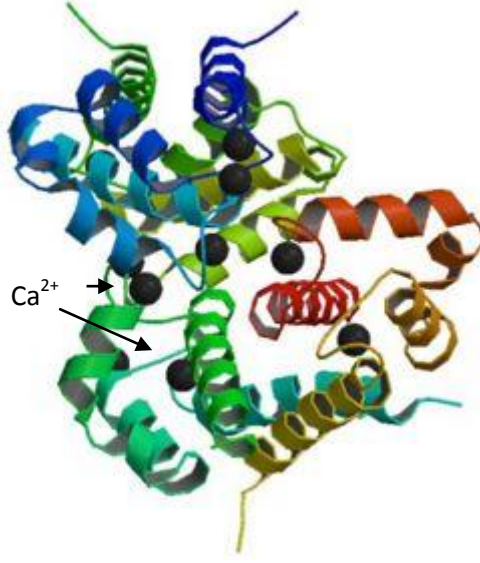
Şekil 2. S100A8'in moleküler yapısı (<http://www.rcsb.org/>)

S100A8 ve S100A9 proteinleri kalsiyum dışında çinko bağlama özelliğine de sahiptir. Bu şekilde antimikrobiyal etki de göstermektedirler (39). Ama çinko bağladıkları zaman kalsiyum bağlamış formlarından daha farklı bir konformasyona girdikleri için çinko bu proteinlerin fonksiyonlarını engellemektedir (40).



Şekil 3. S100A9'un moleküler yapısı (<http://www.rcsb.org/>)

Bu proteinler nötrofillerin ve monositlerin sitozolik kompartmanında yüksek miktarda bulunurlar, bu yüzden bu hücrelerin gelişiminde ve fonksiyonlarında rol oynadıkları düşünülmektedir (41). İnflamatuvar durumlarda ise keratinositlerde ve epitel hücrelerinde üretilmektedir (42).



Şekil 4. Kalprotektinin moleküler yapısı (<http://www.rcsb.org/>)

Bu proteinler ve oluşturdukları kompleks olan kalprotektin, hücre iskeleti komponentleri ile de etkileşimde bulunmaktadır. Mikrotübüller, vimentin, keratin ve aktin filamentlerine bağlanabilirler. Bu şekilde özellikle mikrotübüllere bağlanıp immün hücrelerin göçünde rol oynamaktadırlar (43).

Bunun yanı sıra bu proteinler birçok inflamatuvar hastalıkta birer belirteç olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (44, 45). Belirteç olmanın yanı sıra bu proteinler, özellikle de kalprotektin, TLR4 (toll-like reseptör 4) ve RAGE (ileri glikasyon son ürünleri için reseptör) gibi immüneyi aktifleyen reseptörlerin ligandı olarak davrandığı için bu tür hastalıkların patogenezinde de rol oynadığı ileri sürülmektedir (46). Bu yüzden S100A8, S100A9 ve kalprotektin, DAMP (hasar-ilişkili moleküler patern) molekülleri altında da sınıflandırılmaktadır.

4.2.2. S100A8, S100A9, Kalprotektin ve Kanser

Kronik inflamasyon ve kanser ilişkili patolojiler olduğundan bu inflamatuvar proteinler çeşitli kanserlerde de araştırılmıştır. Yapılan birçok çalışmada immünboyama yöntemiyle tümör dokusu incelendiğinde yalnızca dokuyu infiltre eden immün hücrelerde değil,

neoplastik hücrelerde de bu proteinlerin yüksek miktarda üretildiği gösterilmiştir. Çeşitli hücre kültürü çalışmalarında, gliomlarda, epidermoid karsinomlarda, osteosarkomlarda S100A8 ve S100A9'un aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir (38). Ayrıca kalprotektin tümör büyümesine de katkıda bulunmaktadır (47). Özellikle S100A9, dendritik hücrelerin differensiyasyonunu inhibe ederek tümöre karşı oluşacak immün yanıtı baskılamaktadır (48). Son olarak bu proteinler, tümör hücrelerinin göçünü de kolaylaştırmaktadır (49, 50).

Kanser hastalarında yapılan çalışmalarda da bu S100 proteinlerinin artışı saptanmıştır. Hermani A ve ark. (51) prostat kanserinde hem S100A8 hem de S100A9'un prostat kanserinde tümör hücrelerinden salındığını rapor etmişlerdir. Yong HY ve ark. (52) ise bu iki proteinin mide kanserinin invazyonunda önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Kolon kanseri için, Stulik J ve ark. (53) yaptığı çalışmada S100A8 ve S100A9 proteinlerinin tümörün invaziv marjinde belirgin arttığını rapor ederken, Turovskaya O ve ark. (54) ise kolit ile ilişkili karsinogenezde kalprotektinin bir rolü olabileceğini ileri sürmüştür. Ott HW ve ark. (55) ise yine bu iki proteinin benign over kisti olan hastalarda herhangi bir artış göstermeyip over kanserli hastaların serumunda ve kist sıvısında artış gösterdiğini bildirmiştir.

Mesane kanserinde de bu proteinler araştırılmış ve S100A8 proteininin tümör hücrelerinde normal urotelyuma göre ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (56). Daha yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise S100A8 ve S100A9 proteinleri, mesane tümör biyopsilerinde normal mesane epiteli hücrelerinde gözlenmezken, tümör hücrelerinde ve immün sistem hücrelerinde eksprese oldukları izlenmiştir (4). Ayrıca bu çalışmada, S100A8 proteini kasa invaziv olgularda (T2-4) diğer evrelere göre (Ta, Tis ve T1) anlamlı daha yüksek bir ekspresyon gösterirken, S100A9 proteini ise yüksek dereceli olgularda düşük dereceli olgulara göre anlamlı daha yüksek bir ekspresyon göstermiştir.

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Gereçler

Santrifüj Cihazı	:	Hettich Universal 320 (Tuttlingen, Almanya)
Otomatik Pipet (10 - 100 µL)	:	Axygen (Kaliforniya, A.B.D.)
Otomatik Pipet (100 - 1000 µL)	:	Axygen (Kaliforniya, A.B.D.)
8 Kanallı Otomatik Pipet (20 - 200 µL)	:	Axygen (Kaliforniya, A.B.D.)
Derin Dondurucu (-20 °C)	:	Regal RDD 1280 (İstanbul, Türkiye)
Distile Su Cihazı	:	Pentair (Manchester, İngiltere)
Spektrofotometre	:	Shimadzu UVmini-1240 (Kyoto, Japonya)
ELISA Yıkayıcı	:	BioTek ELx50 (Vermont, A.B.D.)
ELISA Okuyucu	:	BioTek ELx800 (Vermont, A.B.D.)

5.2. Yöntemler

Çalışma için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 4 Haziran 2014 tarihli, 88212 sayılı etik kurul onayı alındı. Haziran 2014 ila Ağustos 2015 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalına başvurup mesane kanseri tanısı alan, ancak henüz herhangi bir tedavi almamış hastalar çalışma kapsamına alındı. İkincil habaset, böbrek yetmezliği, iskemik kardiyak hastalıklar, enfeksiyöz, hematolojik ve romatolojik bozukluklar dışlama kriterleri olarak belirlendi. İdrar yolu enfeksiyonlarını dışlamak amacıyla negatif idrar kültürü olan hastalar çalışmaya alındı. Kontrol grubu ise hasta grubuna benzer yaş aralığında 48 sağlıklı gönüllüden oluşturuldu (ortalama \pm standart sapma olarak, sağlıklıların yaşı: $52,33 \pm 11,29$; hastaların yaşı: $55,19 \pm 12,96$). Tüm katılımcılardan yazılı onayları alındı.

5.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Tüm sağlıklı gönüllülerden ve cerrahi operasyon öncesi tüm hastalardan sabah 10 mL kan, serum tüpüne ve 20 mL orta akım spot idrar, steril idrar kabına toplandı. Alınan kan örnekleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında 1000 g'de 20 dakika santrifüj sonrası serumu ayrılıp analiz zamanına kadar -20 °C'de saklandı. İdrar örneklerinden de bir tüpe bir miktar alınıp aynı santrifüj işlemi sonrası üstte kalan kısım yine aynı şekilde derin dondurucuya kaldırıldı.

5.2.2. İdrar Kreatinin Düzeyleri

İdrarda ölçülen parametrelerin kreatinine oranlanabilmesi için (57) idrar kreatinin değerleri Jaffe yöntemi esas alınarak hesaplandı (58).

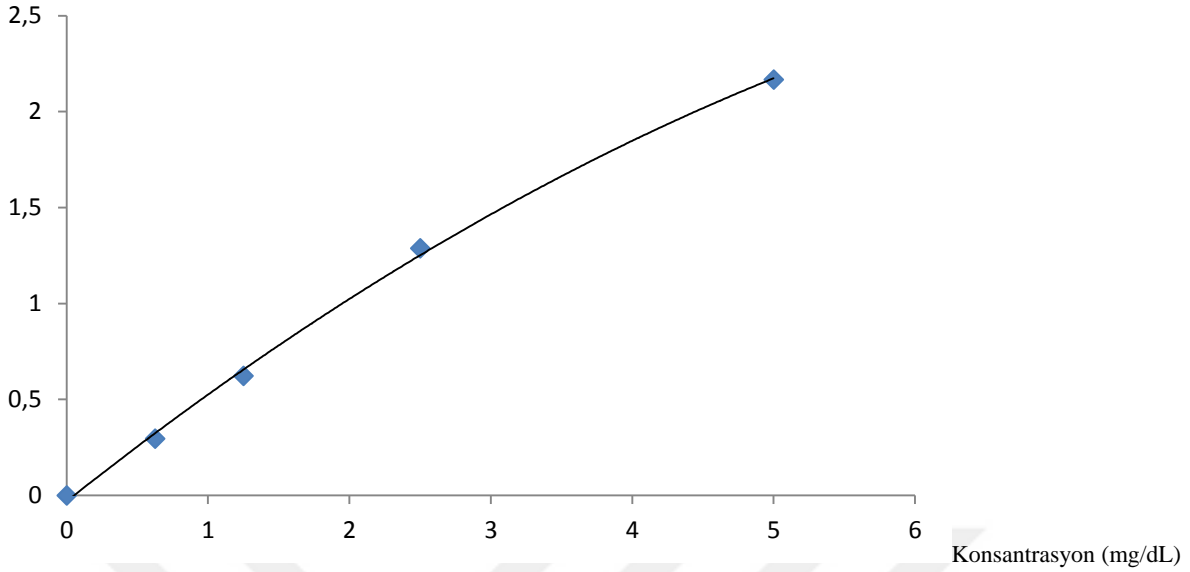
Prensip: Kreatinin alkali ortamda pikrik asit ile reaksiyona girip kırmızı-turuncu renkli bir bileşik oluşturur (Jaffe reaksiyonu). Oluşan bu bileşiğin absorbansı 520 nm'de okunup standart eğrisi ile karşılaştırılarak örnekteki kreatinin konsantrasyonu hesaplanır.

Çözeltiler:

0,04 M	Pikrik asit
0.75 N	Sodyum hidroksit
5 mg/dL	Kreatinin standardı

Yöntem: İdrar örnekleri 1:100 oranında distile su içerisinde sulandırıldı. Standartlar da seri dilüsyon yapılarak hazırlandı (5 mg/dL, 2,5 mg/dL, 1,25 mg/dL ve 0,625 mg/dL). Kör tüpüne 3 mL distile su, standart tüplerine her birinden 3'er mL, örnek tüplerine de 3'er mL sulandırılmış idrar örneğinden koyuldu. Sonra her bir deney tüpüne 1 mL pikrik asit çözeltisi, ardından 1 mL sodyum hidroksit çözeltisi ilave edildi. Son olarak oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Süre sonunda standart ve örnek çözeltilerin absorbansları 520 nm'de spektrofotometre cihazıyla köre karşı okundu ve standart grafiğine göre örneklerdeki kreatinin konsantrasyonu dilüsyon faktörü ile çarpılarak hesaplandı.

Absorbans



Şekil 5. Kreatinin standart eğrisi

5.2.3. İdrar BTA Düzeyleri

Diagnostik amaçlı üretilen Polymedco BTA TRAK® ELISA kiti (New York, Amerika Birleşik Devletleri) ile ölçüldü.

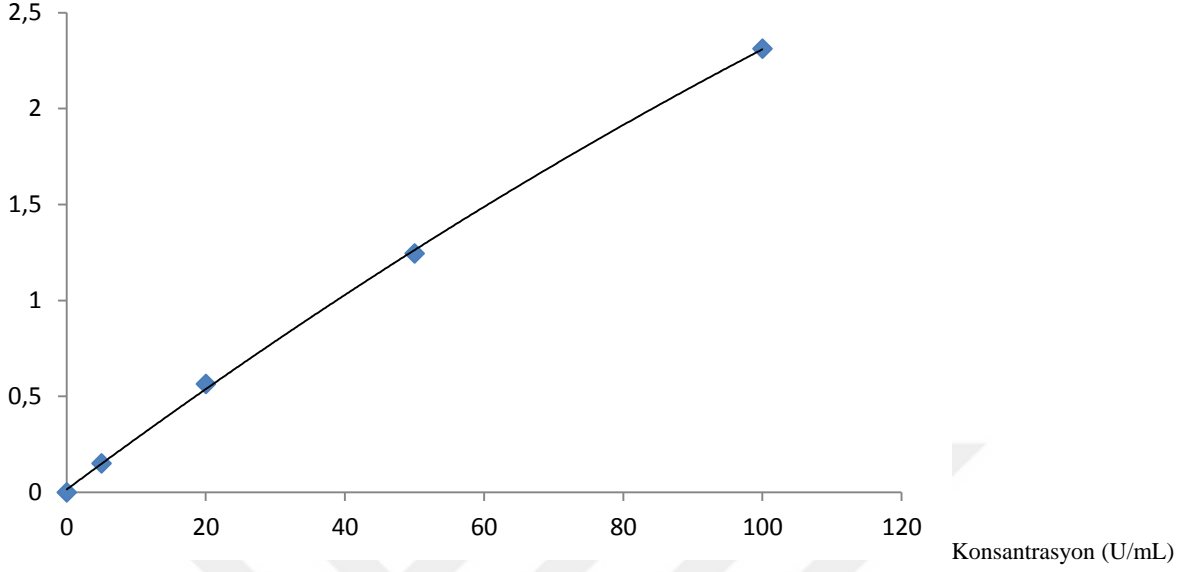
Prensip: Standartlar ve örnekler, daha önceden hedef antijene (hCFHrp: human complement factor H-related protein) spesifik birinci monoklonal antikora kaplı plaka üzerine eklenir. İnkübasyon sırasında hedef antijen bu antikora bağlanır ve tutulur. Yıkama işlemi takiben diğer moleküller ortamdan uzaklaştırılır, ancak hedef antijen bağlı kalır. Daha sonra her kuyucuğa alkalen fosfataz enzimi ile konjuge edilmiş ikinci monoklonal antikor eklenir. İkinci inkübasyon sırasında bu antikor ilk başta oluşan antijen-antikor kompleksine bağlanır ve bunu takiben ikinci yıkama sırasında serbest antikolar ortamdan uzaklaştırılır. Sonrasında tüm kuyucuklara substrat çözeltisinden ilave edilir ve örneğin içindeki hedef antijen miktarına oranlı bir şiddette renk oluşur. Bu son inkübasyon süresini takiben enzimin katalizlediği reaksiyonu sonlandırmak amacıyla reaksiyonu durdurucu çözelti eklenir ve her bir kuyucuğun içerisinde bulunan çözeltinin 405 nm'de absorbansı ELISA okuyucuda ölçülür.

Çözeltiler:

Seyreltme çözeltisi	(Tris tamponlu serum fizyolojik + 0,1 mM çinko klorür + 1,5 mM magnezyum klorür)
Standart çözeltileri	5, 20, 50, 100 U/mL [Tris tamponlu serum fizyolojik + insan kompleman faktör H (hCFH)]
Yıkama tamponu	(Tris tamponlu serum fizyolojik + Polisorbat)
İkinci antikor çözeltisi	(anti-hCFHrp ile konjuge alkalen fosfataz + tris tamponlu serum fizyolojik + 0,1 mM çinko klorür + 1,5 mM magnezyum klorür)
Substrat çözeltisi	(1 mg/mL p-nitrofenil fosfat + %10 dietanolamin + 0,5 mM magnezyum klorür)
Durdurma çözeltisi	(%3,7 EDTA)

Yöntem: Daha önceden hedef antijene (hCFHrp) spesifik antikor ile kaplanmış kuyucuklara 175 µL seyreltme çözeltisi koyuldu. Bunu takiben kuyucuklara standart ve örneklerden 25 µL ilave edildi. 37 °C'de 1 saat inkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandı. Enzim ile konjuge ikinci antikor bulunan çözeltiden 200 µL tüm kuyucuklara eklendi ve yine 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İkinci yıkama sonrası her bir kuyucuğa 200 µL substrat çözeltisi eklendi. 37 °C'de 30 dakikalık inkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 50'şer µL reaksiyonu durdurucu çözelti ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı ve 405 nm'de absorbanlar okundu. Standartlarla oluşturulan eğriye göre örneklerdeki konsantrasyonlar hesaplandı. Absorbans değeri en yüksek standardın değerinin üzerinde veya yakınında çıkan örnekler 1:5 oranında sulandırılarak tekrar çalışıldı. Buna rağmen yine yüksek çıkan değerler ise 1:50 oranında tekrar sulandırılarak çalışıldı.

Absorbans



Şekil 6. BTA standart eğrisi

5.2.4. Serum S100A8 Düzeyleri

Araştırma amaçlı üretilen Biomatik insan S100A8 ELISA kiti (Ontario, Kanada) ile ölçüldü.

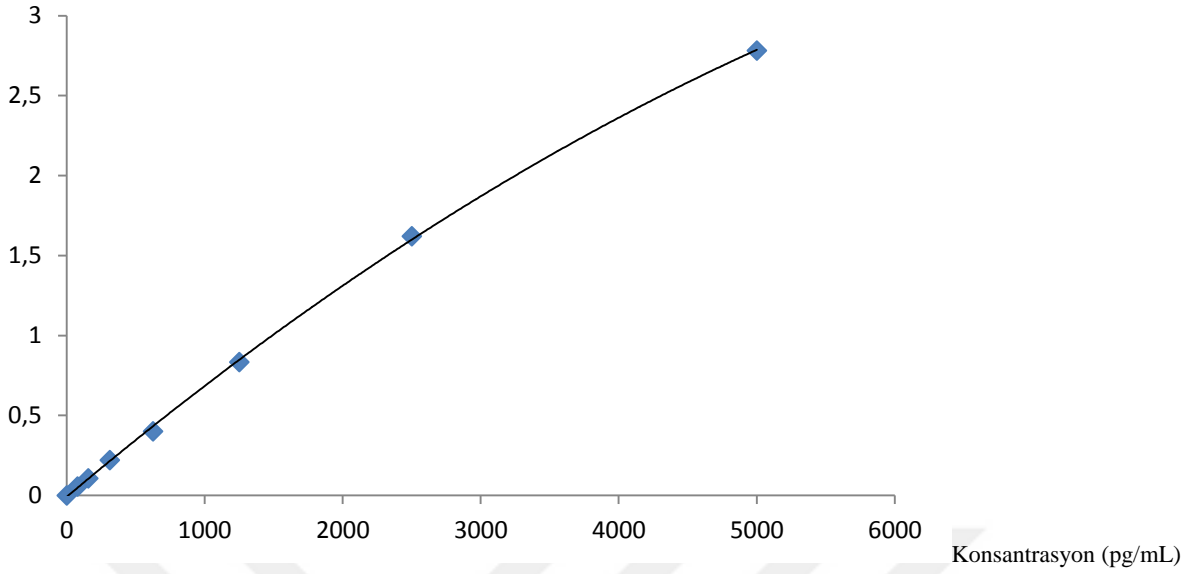
Prensip: Standartlar ve örnekler, daha önceden S100A8'e spesifik antikorla kaplı plaka üzerine eklenir. İnkübasyonu takiben biyotin ile konjuge, S100A8'e spesifik ikinci bir antikor kuyucuklara eklenir. Bunun üzerine avidin ile konjuge horseradish peroksidaz (HRP) her bir kuyucuğa ilave edilir ve yine inkübasyona bırakılır. Daha sonra kuyucuklara tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi eklenir ve bunun sonucunda yalnızca S100A8, biyotin ile konjuge antikor ve enzim ile konjuge avidin içeren kuyucuklarda bir renk değişimi gözlenir. Oluşan rengin şiddeti, örnekteki S100A8 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Son olarak enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit çözeltisi ile durdurulur ve renk değişimi 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standartların oluşturduğu eğri dikkate alınarak örneklerin S100A8 konsantrasyonları hesaplanır.

Çözeltiler:

Standart çözeltileri	78, 156, 312, 625, 1250, 2500, 5000 pg/mL
Fosfat tamponu	0,01 M (pH: 7,0-7,2)
İkinci antikor çözeltisi	(Biyotin ile konjuge antikor)
Yıkama çözeltisi	(Yıkama tamponu)
Enzim çözeltisi	(Avidin ile konjuge horseradish peroksidaz)
Substrat çözeltisi	(Tetrametilbenzidin)
Durdurma çözeltisi	(Sülfürik asit)

Yöntem: Örnekler, fosfat tamponu ile 1:10 oranında sulandırıldı. 100 µL hacminde kör, standart ve örnekler, daha önceden S100A8'e spesifik antikor ile kaplanmış kuyucuklara eklendi. 37 °C'de 2 saatlik inkübasyon sonrası kuyucuklar aspire edilip her birine biyotin ile konjuge ikinci antikorun bulunduğu çözeltiden 100 µL ilave edildi. 37 °C'de 1 saatlik ikinci bir inkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandı ve bu sefer avidin ile konjuge enzim içeren çözeltiden 100 µL eklendi. 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra kuyucuklar yeniden yıkandı ve her bir kuyucuğa 90 µL TMB substrat çözeltisinden koyuldu. Karanlık ortamda 37 °C'de 20 dakikalık son bir inkübasyonu takiben tüm kuyucuklara 50'şer µL sülfürik asit çözeltisinden ilave edilip reaksiyon durduruldu ve hemen 450 nm'de absorbanslar okundu. Standartların oluşturduğu eğriye göre örneklerin S100A8 konsantrasyonları dilüsyon faktörü ile çarpılarak hesaplandı. Absorbans değeri en yüksek standardın değerinin üzerinde veya yakınında çıkan örnekler 1:100 oranında sulandırılarak tekrar çalışıldı.

Absorbans



Şekil 7. S100A8 standart eğrisi

5.2.5. Serum S100A9 Düzeyleri

Araştırma amaçlı üretilen Biomatik insan S100A9 ELISA kiti (Ontario, Kanada) ile ölçüldü.

Prensip: Standartlar ve örnekler, daha önceden S100A9'a spesifik antikorla kaplı plaka üzerine eklenir. İnkübasyonu takiben biyotin ile konjuge, S100A9'a spesifik ikinci bir antikor kuyucuklara eklenir. Bunun üzerine avidin ile konjuge HRP her bir kuyucuğa ilave edilir ve yine inkübasyona bırakılır. Daha sonra kuyucuklara TMB substrat çözeltisi eklenir ve bunun sonucunda yalnızca S100A9, biyotin ile konjuge antikor ve enzim ile konjuge avidin içeren kuyucuklarda bir renk değişimi gözlenir. Oluşan rengin şiddeti, örnekteki S100A9 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Son olarak enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit çözeltisi ile durdurulur ve renk değişimi 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standartların oluşturduğu eğri dikkate alınarak örneklerin S100A9 konsantrasyonları hesaplanır.

Çözeltiler:

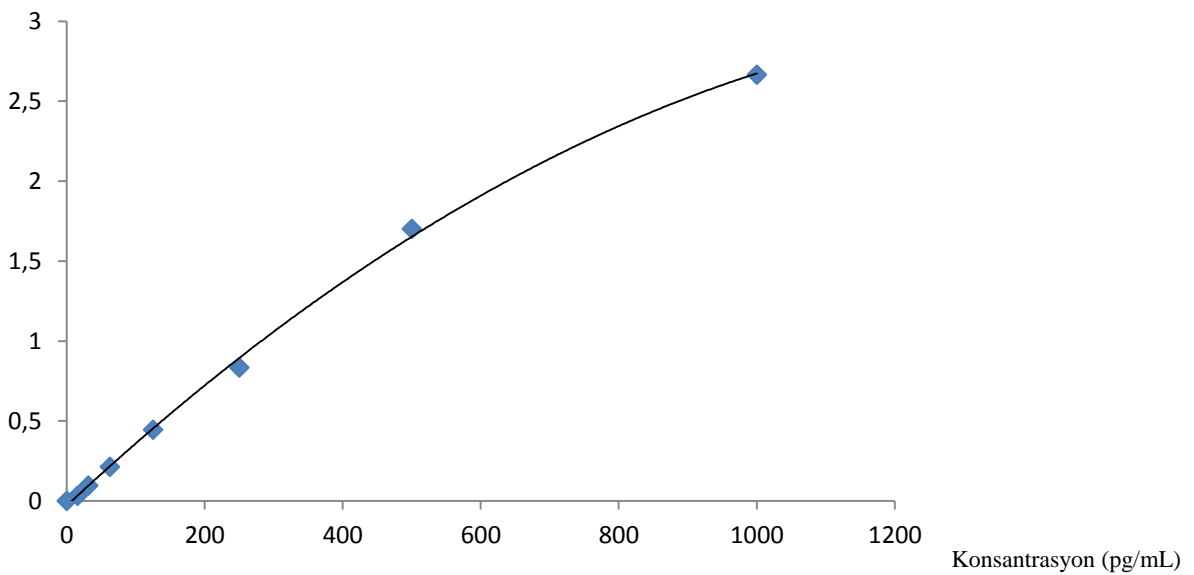
Standart çözeltileri 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250, 500, 1000 pg/mL

Fosfat tamponu 0,01 M (pH: 7,0-7,2)

İkinci antikor çözeltisi	(Biyotin ile konjuge antikor)
Yıkama çözeltisi	(Yıkama tamponu)
Enzim çözeltisi	(Avidin ile konjuge horseradish peroksidaz)
Substrat çözeltisi	(Tetrametilbenzidin)
Durdurma çözeltisi	(Sülfürik asit)

Yöntem: Örnekler, fosfat tamponu ile 1:100 oranında sulandırıldı. 100 µL hacminde kör, standart ve örnekler, daha önceden S100A9'a spesifik antikor ile kaplanmış kuyucuklara eklendi. 37 °C'de 2 saatlik inkübasyon sonrası kuyucuklar aspire edilip her birine biyotin ile konjuge ikinci antikorun bulunduğu çözeltiden 100 µL ilave edildi. 37 °C'de 1 saatlik ikinci bir inkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandı ve bu sefer avidin ile konjuge enzim içeren çözeltiden 100 µL eklendi. 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra kuyucuklar yeniden yıkandı ve her bir kuyucuğa 90 µL TMB substrat çözeltisinden koyuldu. Karanlık ortamda 37 °C'de 20 dakikalık son bir inkübasyonu takiben tüm kuyucuklara 50'şer µL sülfürik asit çözeltisinden ilave edilip reaksiyon durduruldu ve hemen 450 nm'de absorbanslar okundu. Standartların oluşturduğu eğriye göre örneklerin S100A9 konsantrasyonları dilüsyon faktörü ile çarpılarak hesaplandı.

Absorbans



Şekil 8. S100A9 standart eğrisi

5.2.6. Serum ve İdrar S100A8/A9 (Kalprotektin) Düzeyleri

Araştırma amaçlı üretilen Biomatik insan Kalprotektin ELISA kiti (Ontario, Kanada) ile ölçüldü.

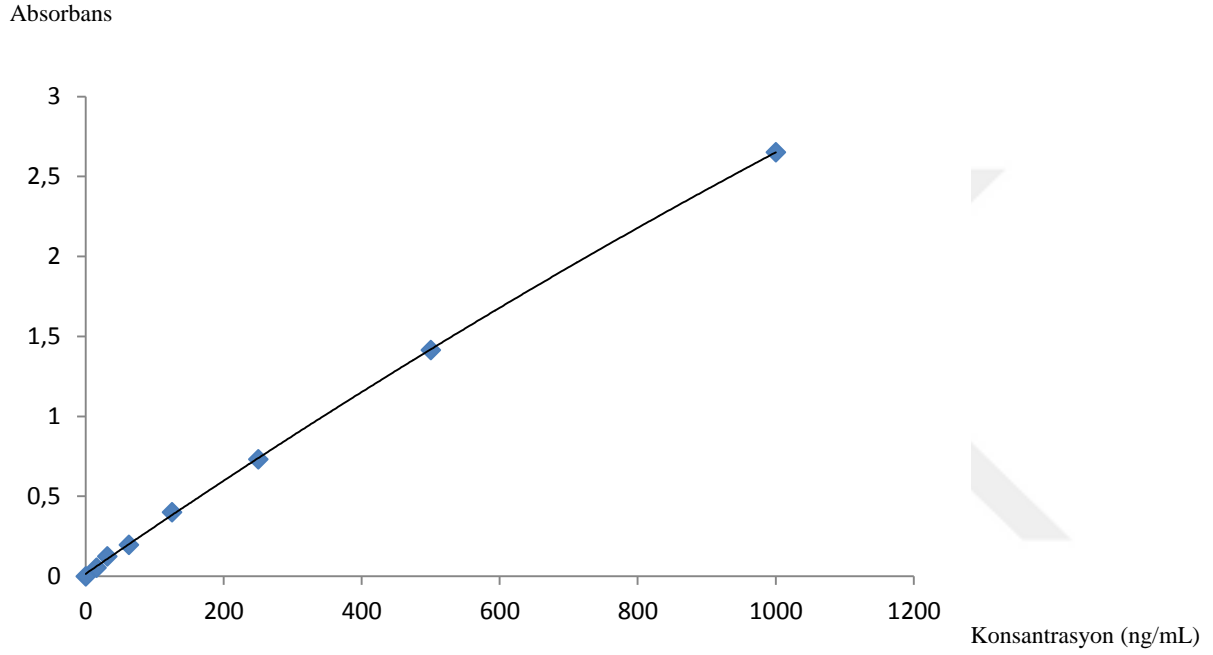
Prensip: Standartlar ve örnekler, daha önceden kalprotektine spesifik antikorla kaplı plaka üzerine eklenir. İnkübasyonu takiben biyotin ile konjuge, kalprotektine spesifik ikinci bir antikor kuyucuklara eklenir. Bunun üzerine avidin ile konjuge HRP her bir kuyucuğa ilave edilir ve yine inkübasyona bırakılır. Daha sonra kuyucuklara TMB substrat çözeltisi eklenir ve bunun sonucunda yalnızca kalprotektin, biyotin ile konjuge antikor ve enzim ile konjuge avidin içeren kuyucuklarda bir renk değişimi gözlenir. Oluşan rengin şiddeti, örnekteki kalprotektin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Son olarak enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit çözeltisi ile durdurulur ve renk değişimi 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standartların oluşturduğu eğri dikkate alınarak örneklerin kalprotektin konsantrasyonları hesaplanır.

Çözeltiler:

Standart çözeltileri	15,6, 31,2, 62,5, 125, 250, 500, 1000 ng/mL
Fosfat tamponu	0,01 M (pH: 7,0-7,2)
İkinci antikor çözeltisi	(Biyotin ile konjuge antikor)
Yıkama çözeltisi	(Yıkama tamponu)
Enzim çözeltisi	(Avidin ile konjuge horseradish peroksidaz)
Substrat çözeltisi	(Tetrametilbenzidin)
Durdurma çözeltisi	(Sülfürik asit)

Yöntem: Serum örnekleri, fosfat tamponu ile 1:10 oranında sulandırıldı, idrar örnekleri sulandırılmadı. 100 µL hacminde kör, standart ve örnekler, daha önceden kalprotektine spesifik antikor ile kaplanmış kuyucuklara eklendi. 37 °C'de 2 saatlik inkübasyon sonrası kuyucuklar aspire edilip her birine biyotin ile konjuge ikinci antikorun bulunduğu çözeltiden 100 µL ilave edildi. 37 °C'de 1 saatlik ikinci bir inkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandı ve bu sefer avidin ile konjuge enzim içeren çözeltiden 100 µL eklendi. 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra kuyucuklar yeniden yıkandı ve her bir

kuyucuğa 90 µL TMB substrat çözeltisinden koyuldu. Karanlık ortamda 37 °C'de 20 dakikalık son bir inkübasyonu takiben tüm kuyucuklara 50'şer µL sülfürik asit çözeltisinden ilave edilip reaksiyon durduruldu ve hemen 450 nm'de absorbanslar okundu. Standartların oluşturduğu eğriye göre örneklerin kalprotektin konsantrasyonları hesaplandı. Absorbans değeri en yüksek standardın değerinin üzerinde veya yakınında çıkan serum örnekleri 1:100, idrar örnekleri ise 1:10 oranında sulandırılarak tekrar çalışıldı.



Şekil 9. S100A8/A9 (Kalprotektin) standart eğrisi

5.2.7. Histopatolojik Değerlendirme

Ameliyat sırasında alınan doku örneklerinin postoperatif histolojik analizleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında yapıldı. Patoloji raporunda tümör tespit edilmediği belirlenen hastalar çalışmadan dışlandı ve bu hastalara ait örnekler çalışılmadı. Mesane kanserinin evrelendirilmesinde AJCC (American Joint Committee on Cancer) kriterleri baz alındı. Derecelendirmede ise Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 yılında duyurduğu kriterler uygulandı.

5.2.8. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin analizleri SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Statistics 20. sürüm ile yapıldı. Gruplar öncelikle Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile kıyaslandı, daha sonra gruplar arası farklılıklar post-hoc Mann-Whitney U testi ile Bonferroni düzeltmesi kullanılarak tespit edildi. İkili grupların karşılaştırılması ise yalnızca Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Korelasyonlar için Spearman rho kullanıldı. Tüm veriler %95 güven aralığında, anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ alınarak değerlendirildi. Ayrıca, serum ve idrar belirteçlerinin tanısal performansını değerlendirmek amacıyla ROC (receiver operating characteristic) eğrileri çizildi.



6. BULGULAR

Mesane kanseri hastalarından ameliyat sırasında alınan biyopsi örneklerinin histopatolojik analizi sonucu bazılarının benign lezyonlar olduğu saptandı. Bu örneklere sahip hastalar çalışmadan çıkarıldı. Yalnızca değişici epitel hücreli karsinomlar çalışmaya dahil edildi. Buna göre toplam 73 mesane kanserli hastanın hem serum, hem idrarında tüm parametreler analiz edildi ve değerlendirildi. Olgularımızın hiçbirinde in situ karsinoma rastlanmadı. Hastalardan 41'i düşük, non-invaziv (Ta) evrede iken 19'u bağ dokusuna invazivdi (T1). T2, T3 ve T4 evresinde olan olgular tek başlarına çok düşük sayıda olduğundan tümü kasa invaziv (T2-4) olarak gruplandırıldı. Bunun yanı sıra bütün invaziv olgular da (T1, T2, T3 ve T4) ek bir grupta (T1-4) değerlendirildi. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 yılında belirlediği kriterler baz alınarak olgular ayrıca düşük ve yüksek derece olmak üzere iki ayrı grupta da incelendi.

6.1. Cinsiyet ve sigara kullanımının ölçülen parametrelerin üzerine olası etkilerinin değerlendirilmesi

Kontrol grubu 21 kadın ve 27 erkek sağlıklı gönüllüden oluşmaktaydı. Ölçülen parametrelerin kadın ve erkeklerdeki değerleri, anlamlılık düzeyleri ile Tablo 1A ve Tablo 1B'de verilmiştir. Tablolarda görüldüğü gibi, herhangi bir parametrede alt gruplar arası anlamlı fark gözlenmemektedir.

Tablo 1A. Kontrol grubunda kadın ve erkeklerin serum S100A8, S100A9 ve kalprotektin düzeyleri; değerler, medyan (minimum - maksimum) şeklinde ifade edilmektedir.

Cinsiyet	n	Serum S100A8 (ng/mL)	Serum S100A9 (ng/mL)	Serum Kalprotektin (ng/mL)
Kadın	21	22,98 (10,25 - 52,64)	8,91 (5,13 - 14,86)	950,98 (409,44 - 2890,22)
Erkek	27	21,68 (8,59 - 58,35)	8,43 (4,67 - 14,81)	875,28 (260,88 - 2506,26)
p değeri		0,436	0,722	0,284

Tablo 1B. Kontrol grubunda kadın ve erkeklerin idrar kalprotektin ve BTA değerleri ile kalprotektin/kreatinin ve BTA/kreatinin oranları; değerler, medyan (minimum - maksimum) şeklinde ifade edilmektedir.

Cinsiyet	n	İdrar Kalprotektin (ng/mL)	İdrar Kalprotektin (ng/mL)/Kreatinin (mg/dL)	İdrar BTA (U/mL)	İdrar BTA (U/mL)/Kreatinin (mg/dL)
Kadın	21	69,14 (23,39 - 178,56)	0,75 (0,19 - 5,01)	3,21 (1,82 - 24,97)	0,05 (0,01 - 0,24)
Erkek	27	61,11 (23,84 - 202,41)	0,71 (0,13 - 7,79)	4,27 (1,48 - 34,32)	0,04 (0,01 - 0,15)
p değeri		0,507	0,489	0,113	0,563

Ölçülen parametrelerin sigara kullanım öyküsü olan ve olmayan sağlıklı gönüllülerdeki değerleri, anlamlılık düzeyleri ile Tablo 2A ve Tablo 2B'de verilmiştir. Yine tablolarda görüldüğü gibi, herhangi bir parametrede alt gruplar arası anlamlı fark gözlenmemektedir.

Tablo 2A. Kontrol grubunda sigara kullanan ve kullanmayanların serum S100A8, S100A9 ve kalprotektin düzeyleri; değerler, medyan (minimum - maksimum) şeklinde ifade edilmektedir.

Alt grup	n	Serum S100A8 (ng/mL)	Serum S100A9 (ng/mL)	Serum Kalprotektin (ng/mL)
Sigara	22	21,03 (10,06 - 52,64)	8,91 (4,77 - 14,83)	990,9 (260,88 - 2890,22)
İçen				
Sigara	26	22,05 (8,59 - 58,35)	8,39 (4,67 - 14,86)	874,45 (409,44 - 1964,35)
İçmeyen				
p değeri		0,634	0,547	0,102

Tablo 2B. Kontrol grubunda sigara kullanan ve kullanmayanların idrar kalprotektin ve BTA değerleri ile kalprotektin/kreatinin ve BTA/kreatinin oranları; değerler, medyan (minimum - maksimum) şeklinde ifade edilmektedir.

Alt grup	n	İdrar Kalprotektin (ng/mL)	İdrar Kalprotektin (ng/mL)/Kreatinin (mg/dL)	İdrar BTA (U/mL)	İdrar BTA (U/mL)/Kreatinin (mg/dL)
Sigara içen	22	65,94 (24,31 - 202,41)	0,91 (0,16 - 4,21)	3,62 (1,48 - 24,97)	0,04 (0,01 - 0,22)
Sigara içmeyen	26	75,80 (23,39 - 202,21)	0,62 (0,13 - 7,79)	4,3 (1,82 - 34,32)	0,05 (0,01 - 0,24)
p değeri		0,707	0,494	0,166	0,918

6.2. Kontrol grubu içerisinde korelasyonlar

Ölçülen parametreler (serum S100A8, serum S100A9, serum kalprotektin, idrar kalprotektin, idrar kalprotektin/kreatinin oranı, idrar BTA ve idrar BTA/kreatinin oranı), kontrol grubunda katılımcıların yaşları ile pozitif veya negatif herhangi bir korelasyon göstermedi. Hasta grubu da dikkate alındığında yine yaş açısından hiçbir korelasyon gözlenmedi.

Parametrelerin kontrol grubunda birbirleri ile korelasyonları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kontrol grubunda ölçülen parametreler arası korelasyon değerlendirmeleri

		BTA	BTA/ Kreatinin	S100A8	S100A9	Serum Kalprotektin	İdrar Kalprotektin	İdrar Kalprotektin/ Kreatinin
BTA	rho	1,000	0,546	0,204	0,186	0,002	0,140	-0,082
	p		0,002	0,280	0,325	0,991	0,467	0,674
BTA/ Kreatinin	rho	0,546	1,000	0,129	0,174	0,344	0,391	0,546
	p	0,002		0,496	0,357	0,063	0,036	0,002
S100A8	rho	0,204	0,129	1,000	0,301	0,144	-0,117	-0,166
	p	0,280	0,496		0,044	0,329	0,477	0,313
S100A9	rho	0,186	0,174	0,301	1,000	0,277	-0,157	-0,097
	p	0,325	0,357	0,044		0,066	0,355	0,568
Serum Kalprotektin	rho	0,002	0,344	0,144	0,277	1,000	0,061	0,069
	p	0,991	0,063	0,329	0,066		0,712	0,677
İdrar Kalprotektin	rho	0,140	0,391	-0,117	-0,157	0,061	1,000	0,723
	P	0,467	0,036	0,477	0,355	0,712		0,000
İdrar Kalprotektin/ Kreatinin	rho	-0,082	0,546	-0,166	-0,097	0,069	0,723	1,000
	p	0,674	0,002	0,313	0,568	0,677	0,000	

Tabloda görüldüğü gibi, idrar BTA/kreatinin oranları, idrar kalprotektin düzeyleri ile çok zayıf bir pozitif korelasyon gösterdi. Bununla beraber, idrar kalprotektin/kreatinin oranı ile idrar BTA/kreatinin oranı arasında daha güçlü bir pozitif korelasyon vardı. Ancak kreatinine oranlanmamış idrar BTA düzeyleri ile idrar kalprotektin veya idrar kalprotektin/kreatinin oranı arasında herhangi bir anlamlı korelasyon izlenmedi. Ayrıca kontrol grubunda serum kalprotektin düzeyleri ile ne idrar kalprotektin ne de idrar kalprotektin/kreatinin oranı arasında bir korelasyon vardı. Son olarak, kontrol grubunda serum S100A8 düzeyleri ile S100A9 düzeyleri arasında çok zayıf bir pozitif korelasyon bulunurken, serum kalprotektin düzeyleri ile her ikisinin arasında pozitif veya negatif herhangi bir korelasyon gözlenmedi.

6.3. Ölçülen parametrelerin tüm çalışma gruplarında değerlendirilmesi

Sağlıklı gönüllüler ve hastalara ait serum ve idrar analiz sonuçları alt gruplar ve anlamlılık düzeyleri ile Tablo 4A ve Tablo 4B'de verilmektedir.

Tablo 4A. Kontrol gruplarında ve hasta alt gruplarında serum S100A8, S100A9 ve kalprotektin düzeyleri; değerler, medyan (minimum - maksimum) şeklinde ifade edilmektedir.

Grup	n	Serum S100A8 (ng/mL)	Serum S100A9 (ng/mL)	Serum kalprotektin (ng/mL)
Kontrol	48	21,91 (8,59 - 58,35)	8,45 (4,67 - 14,86)	930,18 (260,88 - 2890,22)
Ta (non-invaziv)	41	23,52 (10,83 - 68,97)	8,39 (4,78 - 15,61)	2235,76 ^a (635,87 - 5824,30)
T1 (bağ dokuya invaziv)	19	22,65 (13,09 - 78,62)	8,72 (4,57 - 15,44)	2162,58 ^a (821,58 - 16456,84)
T2-4 (kasa invaziv)	13	31,32 (14,89 - 81,23)	9,15 (5,34 - 15,59)	2912,55 ^a (867,21 - 14227,73)
T1-4 (tüm invazivler)	32	24,72 (13,09 - 81,23)	8,90 (4,57 - 15,59)	2506,76 ^a (821,58 - 16456,84)
Düşük Derece	30	22,98 (10,83 - 68,97)	8,45 (4,78 - 15,61)	2082,03 ^a (635,87 - 5824,30)
Yüksek Derece	43	26,41 (11,22 - 81,23)	8,75 (4,81 - 15,59)	2392,65 ^a (821,58 - 16456,84)
Tüm Hastalar	73	24,57 (10,83 - 81,23)	8,72 (4,78 - 15,59)	2290,38 ^a (635,87 - 16456,84)

^aKontrol grubuna göre p<0,001

Tablo 4B. Kontrol grubunda ve hasta alt gruplarında idrar kalprotektin ve BTA değerleri ile kalprotektin/kreatinin ve BTA/kreatinin oranları; değerler, medyan (minimum - maksimum) şeklinde ifade edilmektedir.

Grup	n	İdrar Kalprotektin (ng/mL)	İdrar Kalprotektin (ng/mL)/Kreatinin (mg/dL)	İdrar BTA (U/mL)	İdrar BTA (U/mL)/Kreatinin (mg/dL)
Kontrol	48	67,08 (23,39 - 202,41)	0,72 (0,13 - 7,79)	3,83 (1,48 - 34,32)	0,05 (0,01 - 0,24)
Ta (non-invaziv)	41	323,01 ^a (88,01 - 810,12)	4,69 ^a (0,76 - 25,51)	30,21 ^a (8,92 - 937,19)	0,53 ^a (0,08 - 21,39)
T1 (bağ dokuya invaziv)	19	350,81 ^a (93,64 - 810,59)	4,30 ^a (0,96 - 31,79)	73,68 ^a (12,62 - 924,31)	1,70 ^a (0,20 - 18,78)
T2-4 (kasa invaziv)	13	833,21 ^{a,b,c} (553,52 - 3458,42)	12,61 ^a (4,88 - 78,59)	153,31 ^a (11,77 - 1148,19)	3,17 ^a (0,19 - 31,29)
T1-4 (tüm invazivler)	32	542,17 ^a (93,64 - 3458,42)	6,80 ^a (0,96 - 78,59)	94,08 ^{a,b} (11,77 - 1148,19)	2,34 ^{a,b} (0,19 - 31,29)
Düşük Derece	30	305,81 ^a (88,01 - 810,12)	4,67 ^a (0,76 - 25,51)	24,13 ^a (8,92 - 937,19)	0,52 ^a (0,08 - 21,39)
Yüksek Derece	43	528,38 ^a (93,64 - 3458,42)	7,31 ^a (0,96 - 78,59)	83,55 ^{a,d} (11,77 - 1148,19)	1,55 ^{a,d} (0,19 - 31,29)
Tüm Hastalar	73	412,56 ^a (88,01 - 3458,42)	5,72 ^a (0,76 - 78,59)	41,46 ^a (8,92 - 1148,19)	0,83 ^a (0,08 - 31,29)

^aKontrol grubuna göre p<0,001

^bTa grubuna göre p<0,05

^cT1 grubuna göre p<0,05

^dDüşük Derece grubuna göre p<0,05

Tablolarda görüldüğü gibi, serum S100A8 ve S100A9 düzeyleri açısından hastalar ile sağlıklılar arasında veya hasta alt grupları arasında hiçbir anlamlı fark bulunamadı. Serum kalprotektin, idrar kalprotektin ve idrar BTA düzeyleri ile idrar kalprotektin/kreatinin ve BTA/kreatinin oranları ise tüm hastalarda ve hasta alt gruplarında kontrole göre anlamlı yüksekti. Ancak serum kalprotektin düzeyleri ile idrar kalprotektin/kreatinin oranlarında hasta alt grupları arasında herhangi bir anlamlı fark bulunamadı. İdrar BTA düzeyleri ile idrar BTA/kreatinin oranları ise tüm invazivleri (T1-4) non-invazivlerden (Ta) ayırabilmekteydi. Ayrıca, bu iki parametre yüksek dereceli olgularla düşük dereceliler arasında da anlamlı fark gösterdi. Buna karşın idrar kalprotektin düzeyleri, kasa invaziv (T2-4) olguları hem non-invaziv (Ta), hem de bağ dokuya invaziv (T1) olgulardan anlamlı farklı bulan tek parametreydi.

6.4. Hasta gruplarında korelasyonlar

Serum S100A8, serum S100A9 ve serum kalprotektin düzeyleri ile hastalık evresi ya da tümör derecesi herhangi bir anlamlı korelasyon göstermedi. İdrar kalprotektin düzeyleri ise yalnızca evre ile pozitif bir korelasyon gösterdi (rho: 0,407 p<0,01). Benzer şekilde idrar kalprotektin/kreatinin oranı da yalnızca evre ile bir korelasyon gösterdi (rho: 0,333 p<0,01). İdrar BTA düzeyleri ile idrar BTA/kreatinin oranları ise hem evre hem de derece ile pozitif korelasyon gösterdi (idrar BTA, evre için rho: 0,411 derece için rho: 0,427; idrar BTA/kreatinin oranı, evre için rho: 0,401 derece için rho: 0,402; hepsi için p<0,01).

Evre ve derecenin yanında hastalarda parametreler arası anlamlı pozitif korelasyonlar da izlendi (Tablo 5).

Tablo 5. Hasta gruplarında ölçülen parametreler arası korelasyon değerlendirmeleri

		BTA	BTA/ Kreatinin	S100A8	S100A9	Serum Kalprotektin	İdrar Kalprotektin	İdrar Kalprotektin/ Kreatinin
BTA	rho	1,000	0,938	0,008	-0,047	-0,119	0,243	0,303
	p		0,000	0,947	0,697	0,329	0,059	0,018
BTA/ Kreatinin	rho	0,938	1,000	0,032	0,023	-0,054	0,278	0,420
	p	0,000		0,791	0,853	0,659	0,030	0,001
S100A8	rho	0,008	0,032	1,000	0,321	0,666	0,120	0,138
	p	0,947	0,791		0,007	0,000	0,370	0,301
S100A9	rho	-0,047	0,023	0,321	1,000	0,477	0,146	0,088
	p	0,697	0,853	0,007		0,000	0,269	0,508
Serum Kalprotektin	rho	-0,119	-0,054	0,666	0,477	1,000	0,192	0,216
	p	0,329	0,659	0,000	0,000		0,144	0,101
İdrar Kalprotektin	rho	0,243	0,278	0,120	0,146	0,192	1,000	0,850
	P	0,059	0,030	0,370	0,269	0,144		0,000
İdrar Kalprotektin/ Kreatinin	rho	0,303	0,420	0,138	0,088	0,216	0,850	1,000
	p	0,018	0,001	0,301	0,508	0,101	0,000	

Tabloda görüldüğü gibi hastalarda idrar kalprotektin/kreatinin oranları idrar BTA düzeyleri ile çok zayıf bir korelasyon gösterirken, idrar BTA/kreatinin oranları ile daha anlamlı bir korelasyon göstermekteydi. Bunun dışında serum S100A8 ile S100A9 da birbiri ile çok zayıf korele iken, serum kalprotektin düzeyleri de serum S100A8 ile orta güçte, serum S100A9 düzeyleri ile de zayıf bir pozitif korelasyon gösterdi.

6.5. Tüm çalışma grupları dahilinde korelasyonlar

Sağlıklı ve hastaların tümü dikkate alındığında ortaya çıkan parametreler arası korelasyonlar Tablo 6'da verilmektedir.

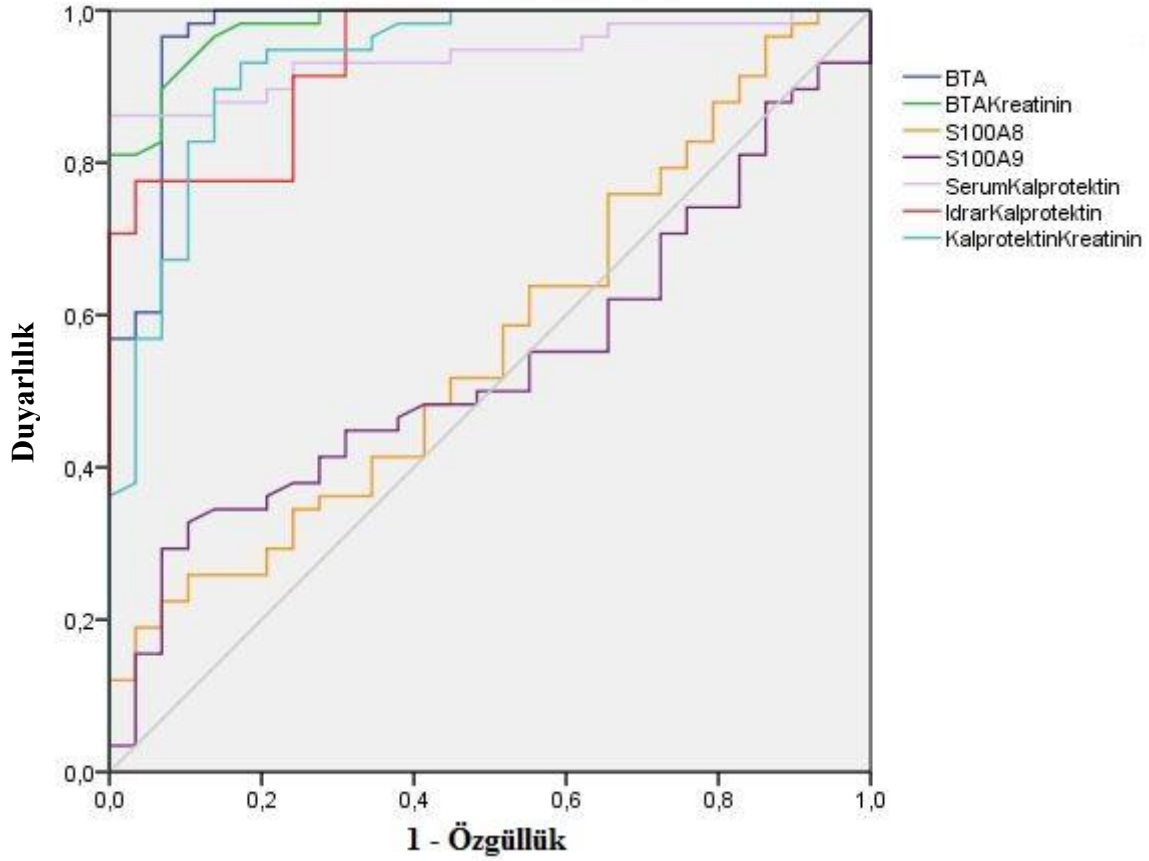
Tablo 6. Tüm katılımcılar dahilinde ölçülen parametreler arası korelasyon değerlendirmeleri

		BTA	BTA/ Kreatinin	S100A8	S100A9	Serum Kalprotektin	İdrar Kalprotektin	İdrar Kalprotektin/ Kreatinin
BTA	rho	1,000	0,944	0,097	0,060	0,509	0,643	0,630
	p		0,000	0,340	0,556	0,000	0,000	0,000
BTA/ Kreatinin	rho	0,944	1,000	0,107	0,093	0,536	0,676	0,740
	p	0,000		0,292	0,359	0,000	0,000	0,000
S100A8	rho	0,097	0,107	1,000	0,302	0,472	0,153	0,168
	p	0,340	0,292		0,002	0,000	0,136	0,101
S100A9	rho	0,060	0,093	0,302	1,000	0,269	0,057	0,051
	p	0,556	0,359	0,002		0,004	0,583	0,620
Serum Kalprotektin	rho	0,509	0,536	0,472	0,269	1,000	0,544	0,566
	p	0,000	0,000	0,000	0,004		0,000	0,000
İdrar Kalprotektin	rho	0,643	0,676	0,153	0,057	0,544	1,000	0,903
	P	0,000	0,000	0,136	0,583	0,000		0,000
İdrar Kalprotektin/ Kreatinin	rho	0,630	0,740	0,168	0,051	0,566	0,903	1,000
	p	0,000	0,000	0,101	0,620	0,000	0,000	

Tabloda da görüldüğü üzere, idrar BTA düzeyleri ile serum kalprotektin düzeyleri, idrar kalprotektin düzeyleri ve idrar kalprotektin/kreatinin oranları arasında orta güçte bir korelasyon bulundu. Benzer şekilde idrar BTA/kreatinin oranları ile serum kalprotektin düzeyleri, idrar kalprotektin düzeyleri ve idrar kalprotektin/kreatinin oranları arasında da orta güçte bir korelasyon vardı. Ancak serum S100A8 ve S100A9 düzeyleri, idrar BTA düzeyleri veya idrar BTA/kreatinin oranları ile hiçbir korelasyon göstermezken serum S100A8 düzeyleri serum kalprotektin düzeyleri ile zayıf bir korelasyon gösterdi. Serum S100A9 düzeylerinin ise tıpkı kontrol grubunda olduğu gibi yalnızca serum S100A8 ile çok zayıf bir korelasyonu vardı. Son olarak, kontrol ve hasta gruplarındaki sonuçların aksine, serum kalprotektin düzeyleri tüm katılımcılar arasında değerlendirildiğinde idrar kalprotektin düzeyleri ve idrar kalprotektin/kreatinin oranları ile orta güçte bir korelasyon gösterdi.

6.6. ROC eğrileri ve tanısal duyarlılık/özgüllük karşılaştırmaları

ROC eğrisi analizi, mesane kanserli hastaları sağlıklı gönüllülerden ayırmakta en iyi olarak idrar BTA düzeylerini işaret etti (Şekil 10).

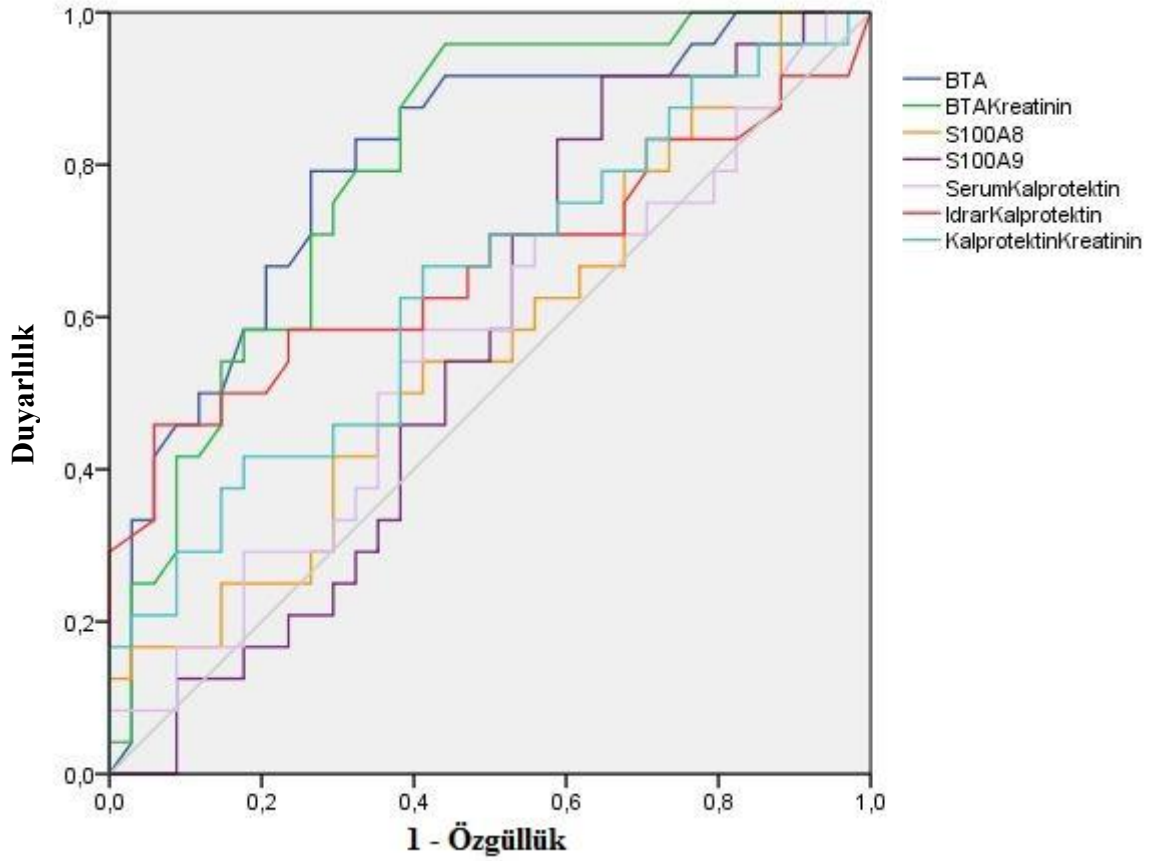


Şekil 10. Ölçülen parametrelerin tüm hastaları sağlıklılarından ayırabilme yeteneklerini karşılaştıran ROC eğrisi

Eğri altında kalan alanlar, idrar BTA düzeyleri için 0,970; idrar BTA/kreatinin oranları için 0,980; serum S100A8 düzeyleri için 0,565; serum S100A9 düzeyleri için 0,536; serum kalprotektin düzeyleri için 0,941; idrar kalprotektin düzeyleri için 0,938; idrar kalprotektin/kreatinin düzeyleri için ise 0,931 olarak belirlendi. ROC eğrisinin koordinatlarından belirlenen kesim değerleri ile duyarlılık ve özgüllük oranları sırasıyla; idrar BTA düzeyleri için (14 U/mL) %96 ve %93; idrar BTA/kreatinin oranları için [0,14 U/mL(mg/dL)] %90 ve %93; serum S100A8 düzeyleri için (22 ng/mL) %64 ve %45; serum S100A9 düzeyleri için (8,5 ng/mL) %48 ve %59; serum kalprotektin düzeyleri için (1000

ng/mL) %88 ve %86; idrar kalprotektin düzeyleri için (115 ng/mL) %92 ve %76; idrar kalprotektin/kreatinin oranları için ise [1,7 ng/mL(mg/dL)] %90 ve %86 olarak hesaplandı.

Hastaları sağlıklılıklardan ayırmanın yanı sıra, ölçülen parametrelerin hasta alt gruplarını da birbirlerinden ayırabilme kapasitesini gösteren ek ROC eğrileri çizildi. Tüm invaziv (T1-4) olguların non-invazivlerden (Ta) ayırt edilmesinde performansların karşılaştırıldığı eğri Şekil 11'de verilmektedir.

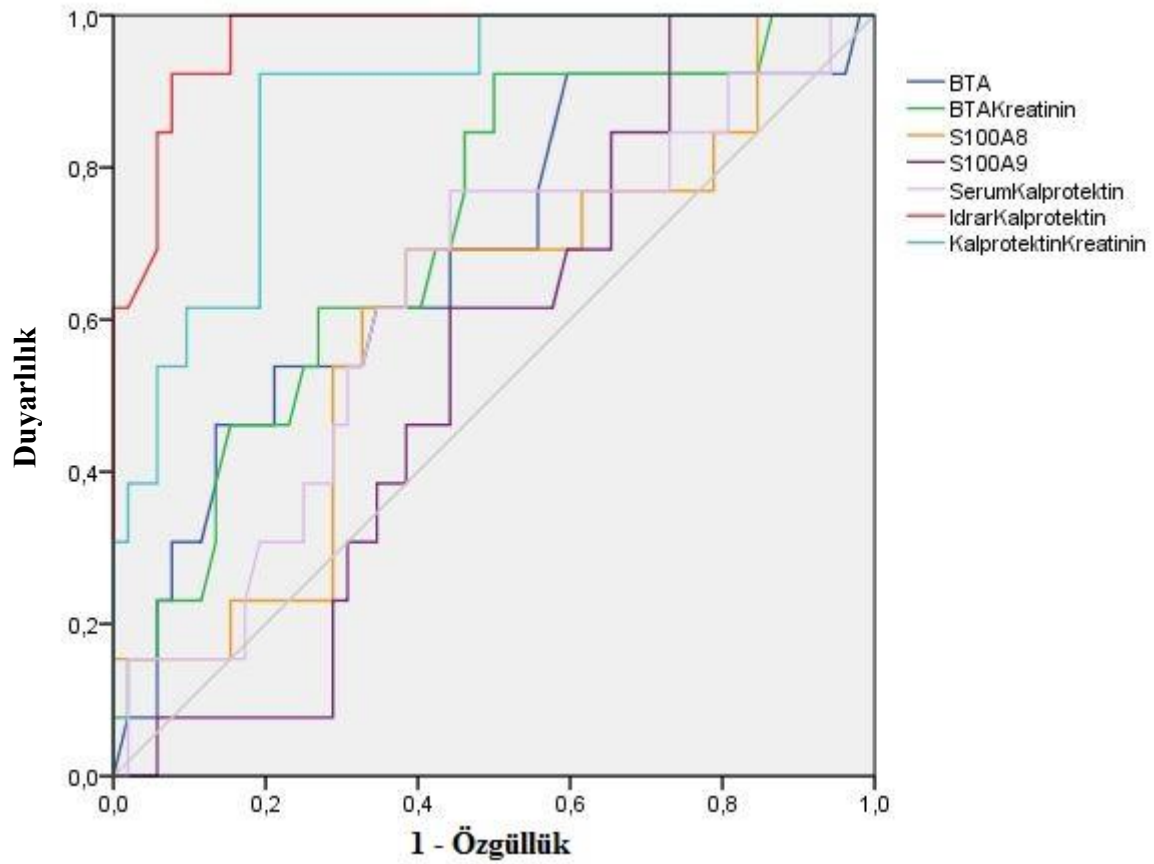


Şekil 11. Ölçülen parametrelerin tüm invaziv olguları (T1-4) non-invaziv (Ta) olgulardan ayırabilme yeteneklerini karşılaştıran ROC eğrisi

Eğri altında kalan alanlar, idrar BTA düzeyleri için 0,803; idrar BTA/kreatinin oranları için 0,799; serum S100A8 düzeyleri için 0,562; serum S100A9 düzeyleri için 0,560; serum kalprotektin düzeyleri için 0,556; idrar kalprotektin düzeyleri için 0,668; idrar kalprotektin/kreatinin düzeyleri için ise 0,638 olarak belirlendi. ROC eğrisinin koordinatlarından belirlenen yeni kesim değerleri ile buna göre değişen duyarlılık ve özgüllük

oranları sırasıyla; idrar BTA düzeyleri için (48 U/mL) %80 ve %74; idrar BTA/kreatinin oranları için [0,77 U/mL(mg/dL)] %80 ve %68; serum S100A8 düzeyleri için (24 ng/mL) %54 ve %59; serum S100A9 düzeyleri için (8,7 ng/mL) %54 ve %56; serum kalprotektin düzeyleri için (2300 ng/mL) %58 ve %59; idrar kalprotektin düzeyleri için (500 ng/mL) %58 ve %77; idrar kalprotektin/kreatinin oranları için ise [5,6 ng/mL(mg/dL)] %67 ve %59 olarak hesaplandı.

Kasa invaziv (T2-4) olguların, diğer hasta alt gruplarından (Ta ve T1) ayrılmasındaki performansların karşılaştırıldığı ROC eğrisi ise Şekil 12'de verilmiştir.

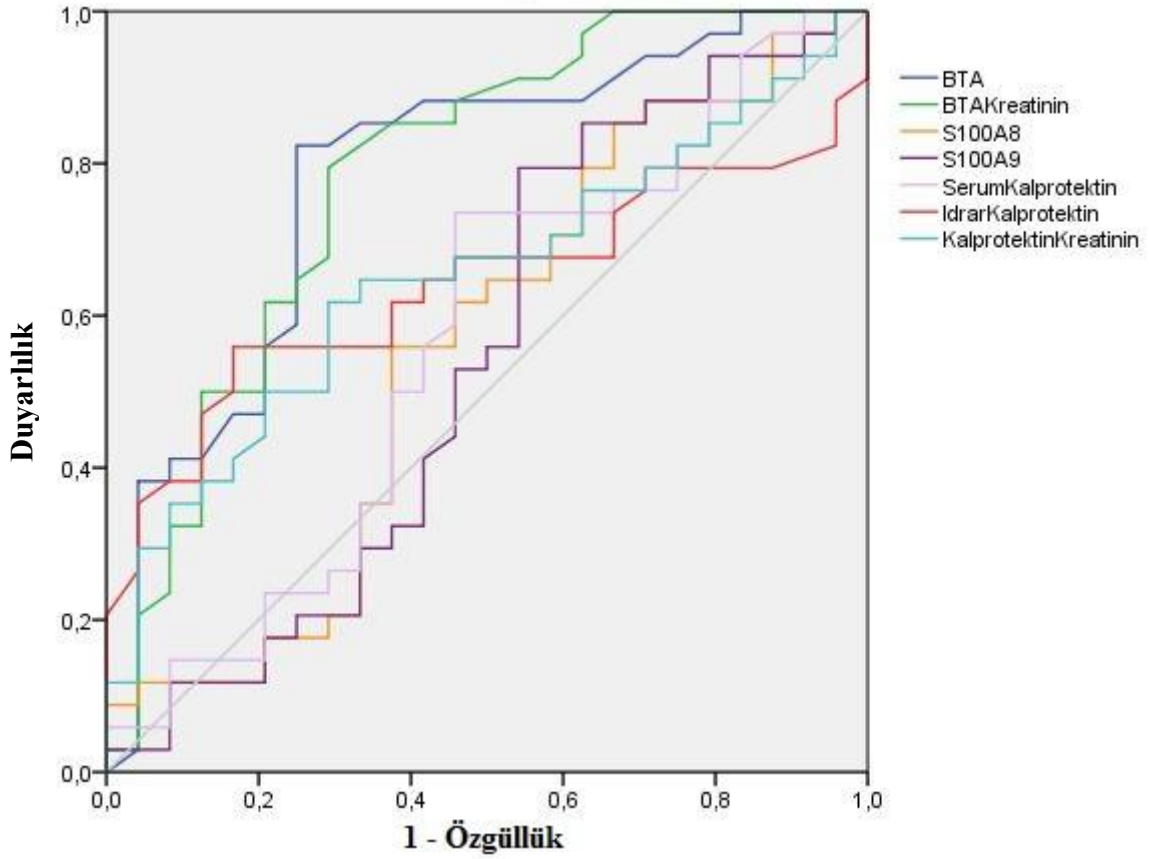


Şekil 12. Ölçülen parametrelerin kasa invaziv olguları (T2-4) non-invaziv (Ta) ve bağı dokusuna invaziv (T1) olgulardan ayırabilme yeteneklerini karşılaştıran ROC eğrisi

Eğri altında kalan alanlar, idrar BTA düzeyleri için 0,682; idrar BTA/kreatinin oranları için 0,717; serum S100A8 düzeyleri için 0,607; serum S100A9 düzeyleri için 0,545; serum kalprotektin düzeyleri için 0,624; idrar kalprotektin düzeyleri için 0,970; idrar

kalprotektin/kreatinin düzeyleri için ise 0,886 olarak belirlendi. ROC eğrisinin koordinatlarından belirlenen yeni kesim değerleri ile buna göre değişen duyarlılık ve özgüllük oranları sırasıyla; idrar BTA düzeyleri için (77 U/mL) %62 ve %67; idrar BTA/kreatinin oranları için [2,5 U/mL(mg/dL)] %62 ve %73; serum S100A8 düzeyleri için (30 ng/mL) %62 ve %67; serum S100A9 düzeyleri için (9 ng/mL) %62 ve %56; serum kalprotektin düzeyleri için (2400 ng/mL) %70 ve %61; idrar kalprotektin düzeyleri için (725 ng/mL) %92 ve %92; idrar kalprotektin/kreatinin oranları için ise [8 ng/mL(mg/dL)] %92 ve %81 olarak hesaplandı.

Son olarak, yüksek derece ile düşük dereceli olguları birbirinden ayırmadaki performans karşılaştırma eğrisi Şekil 13'te verilmektedir.



Şekil 13. Ölçülen parametrelerin yüksek dereceli olguları düşük derecelilerden ayırabilme yeteneklerini karşılaştıran ROC eğrisi

Eğri altında kalan alanlar, idrar BTA düzeyleri için 0,782; idrar BTA/kreatinin oranları için 0,784; serum S100A8 düzeyleri için 0,555; serum S100A9 düzeyleri için 0,541; serum kalprotektin düzeyleri için 0,565; idrar kalprotektin düzeyleri için 0,640; idrar kalprotektin/kreatinin düzeyleri için ise 0,650 olarak belirlendi. ROC eğrisinin koordinatlarından belirlenen yeni kesim değerleri ile buna göre değişen duyarlılık ve özgüllük oranları sırasıyla; idrar BTA düzeyleri için (30 U/mL) %83 ve %75; idrar BTA/kreatinin oranları için [0,66 U/mL(mg/dL)] %80 ve %70; serum S100A8 düzeyleri için (26 ng/mL) %56 ve %63; serum S100A9 düzeyleri için (8,6 ng/mL) %53 ve %54; serum kalprotektin düzeyleri için (2250 ng/mL) %56 ve %58; idrar kalprotektin düzeyleri için (340 ng/mL) %62 ve %63; idrar kalprotektin/kreatinin oranları için ise [5,5 ng/mL(mg/dL)] %65 ve %67 olarak hesaplandı.



7. TARTIŞMA

Mesane kanseri dünya genelinde görülen kanserlerin arasında 9. sırada yer almaktadır (1). Bu kanser, yüksek nüks ve mortalite oranı ile seyredildiği gibi, tanısı da geç konabilmekte ve tedavi başarısı düşük olabilmektedir (59). Bu kanserin evreleri birbirinden farklı klinik seyre sahiptir, dolayısıyla her evreye farklı tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır ve tanı, takip ve tedaviye yönelik yöntemler sürekli geliştirilmektedir (23). Bu nedenle yeni tümör belirteçleri diğer tüm kanserlerde olduğu gibi mesane kanserinde de araştırılmakta ve geliştirilmektedir.

Günümüzde mesane kanserinde kullanılabilecek çeşitli tümör belirteçleri mevcuttur. Bunlar BLCA-4, BTA, sitokeratin 8, 9 ve 19, nükleer matriks protein (NMP) 22, survivin, hyaluronik asit, telomeraz aktivitesi gibi sıralanabilir (60). Bunlardan BTA ve NMP22 mesane kanserinin tanısında ve takibinde FDA tarafından onaylı belirteçlerdir. Ancak bu belirteçler bile yüksek duyarlılıklarına rağmen takipte daha özgül olan sitolojinin yerini alamamaktadırlar (61).

BTA, mesane kanserinde yaygın olarak kullanılan ve araştırılan bir idrar belirtecidir (2). Ancak mesane kanseri için duyarlılığı ve özgüllüğü konusunda yayınlar farklı değerler rapor etmektedir. Bazı yayınlar BTA'nın duyarlılığını %60 ila %77 arasında bir değerde rapor ederken (62, 63), kimisi hem duyarlılık (%100) hem de özgüllük (%92,5) açısından oldukça isabetli bir belirteç olduğunu bildirmektedir (59). Çalışmamızda bu yayınların çoğunda olduğu ve kit üreticisinin önerdiği gibi kesim değerini 14 U/mL olarak aldığımızda (64) göreceli olarak yüksek bir duyarlılık (%96) ve yüksek bir özgüllük (%93) değeri belirledik (Şekil 10).

Ancak bazı yayınlar BTA testinin hematüri durumundan da etkilendiğini öne sürmektedir (64, 65). Hematüri, mesane kanserinin başlıca bulgularından biridir, ama mesane kanseri olmadan da hematüri başka patolojik nedenlerle görülebilir (2). Tümör olmadan hematüri varlığında BTA testinin yanlış pozitif sonuç vermesi kanama sırasında serumdaki kompleman proteininin idrara geçmesi ve bu şekilde BTA testini yanıltmasına yorumlanmaktadır (65). Bu nedenle birtakım yayınlar tümör olmadan hematüri olduğu durumlarda veya diğer ürolojik benign hastalıklarda BTA testinin yanlış sonuçlar doğurabileceği konusunda uyarıda bulunmaktadır (65, 66). Bizim çalışmamızda benign olgular oldukça az sayıda olduğu için ve dışlama kriterlerinin (sistit) içinde yer aldığından bu konuda katkıda bulunamıyoruz.

S100 proteinleri kronik inflamatuvar olaylarda yer aldığı gibi kanser patogenezinde de rol oynadığı düşünülmektedir, bu yüzden günümüzde birçok kanserde araştırılmaktadır. Çeşitli inflamatuvar hastalıklarda da artış gösterdiğinden kansere özgüllükleri sınırlıdır, ancak yine de klinik uygulamaları bulunmaktadır. Bunlardan S100B, beyin hasarında serumda artsa da (67), malign melanomun evrelendirmesinde yararlı bir serum belirteci olarak rapor edilmektedir (68).

Benzer şekilde, S100A8 ve S100A9'un bazı kanserlerde birer tümör belirteci olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. Kim HJ ve ark. (69) yaptıkları çalışmada, kolorektal karsinom hastalarından alınan biyopsi örneklerinde tümör hücrelerini infiltre eden immünite hücrelerinde S100A8 ve S100A9 proteinlerinin ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, bu proteinleri hastaların plazmalarında da western blot yöntemiyle araştırmışlar ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı yüksek düzeyde bulmuşlardır. Ayrıca, kolon kanserinde yaygın kullanılan bir tümör belirteci olan karsinoembriyonik antijen (CEA) düzeyini de S100A8 ve S100A9 düzeyleriyle hastaların plazmasında karşılaştırmışlar ve CEA'ya göre her ikisinin de hastaları kontrollerden ayırmakta daha üstün olduğunu rapor etmişlerdir. Du XM ve ark. (70) meme kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada ise S100A9 proteininin kanserli meme dokusunda çevre benign meme dokusuna göre artmış ekspresyon gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca, serum S100A9 düzeylerinin, preoperatif meme kanserli hastalarda postoperatif hastalara ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı yüksek olduğunu ELISA yöntemiyle belirlemişlerdir. Bununla beraber, serum S100A9 düzeylerini hastanın yaşı, tümör büyüklüğü ve histolojik derece ile ilişkili bulup, lenf nodu metastazı olan hastalarda, lenf nodu metastazı olmayan hastalara göre anlamlı yüksek bildirmişlerdir. S100A8 ve S100A9 proteini prostat kanserinde de araştırılmıştır. Hermani A ve ark. (71) yaptıkları çalışmada, S100A8 ve S100A9 düzeylerinin prostat tümör hücrelerinde arttığı bildirilmiştir. Ayrıca S100A9'un serum düzeyleri de ELISA yöntemiyle araştırılmış ve prostat kanserli hastalarda hem sağlıklı kontrollere, hem de benign prostat hiperplazi (BPH) hastalarına göre anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır. Bu yüksek S100A9 düzeylerinin, yüksek ve düşük dereceli kanserlerde bir fark gösteremese de, benign prostat hiperplazisini prostat kanserinden ayırmakta prostat spesifik antijenden (PSA) daha iyi performans gösterdiği rapor edilmektedir. Ancak Müller H ve ark. (72) ise, yaptıkları çalışmada S100A9 proteinini prostat kanserli hastaların serumunda Hermani A ve ark. kullandığı aynı ELISA kitini kullanarak belirlemişlerdir ama düzeylerini sağlıklı kontrollerden farklı bulamamışlardır. İdrarda da ELISA yöntemini kullanmışlardır ama çoğu olguda proteini algılama sınırının altında tespit

ettikleri için sonuçları kalitatif olarak (pozitif veya negatif) rapor etmişlerdir, ancak yine de hastalarla kontroller arası bir fark tespit edememişlerdir. Buna karşın PSA düzeyleri bu çalışmada hastaları sağlıklılarından başarıyla ayırabilmiştir ve S100A9'un serum veya idrar düzeylerinin prostat kanserinin tanısında PSA'ya hiçbir üstünlüğü olmadığını vurgulamışlardır.

S100A8 ve S100A9 düzeylerini mesane kanserli hastaların serumunda araştıran çok sınırlı sayıda çalışma vardır. Bansal N ve ark. (73) yaptıkları çalışmada mesane kanserli hastaların serumunda western blot yöntemiyle S100A8 ve S100A9 ekspresyon düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre arttığını bildirmiştir. Ayrıca, bu artışın yüksek derece tümörlerde daha belirgin olduğunu saptamış ve özellikle S100A8'in yüksek dereceli tümörleri düşük dereceli tümörlerden yüksek duyarlılık ve özgüllük ile ayırabildiğini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise, Ismail MF ve ark. (74) serum S100A8 ve S100A9 mRNA düzeylerini mesane kanserli hastaların serumlarında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time PCR) ile tespit etmiş ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla beraber, hem S100A8 hem de S100A9 ekspresyon düzeylerinin, invaziv tümörlerde invaziv olmayan tümörlere göre ve ayrıca yüksek dereceli tümörlerin de düşük dereceli tümörlere göre anlamlı daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak bu makalede, evrelemede kullanıldığı beyan edilen kılavuzun (AJCC) bizim çalışmamızda kullanılan kılavuzla aynı olmasına rağmen, T1 ve T2 evresindeki tümörler noninvaziv olarak, T3 ve T4 evresindekiler ise invaziv olarak nitelendirilmiştir. Halbuki AJCC sınıflamasına göre T1, T2, T3 ve T4 evrelerinin tümü invaziv olarak değerlendirilir. İnvaziv olmayan mesane tümörleri ise Ta veya Tis olarak sınıflandırılır. İlginç olarak, bu düşük evrelerden hiçbiri hasta gruplarında tanımlanmamıştır. Bu yüzden bu çalışmada verilen sonuçlar hakkında şüphe duyduğumuz için kendi verilerimizle ne karşılaştırabiliyor ne de yorum yapabiliyoruz. Bizim verilerimize bakılacak olursa, Bansal N ve ark. (73) yaptığı çalışmanın aksine, serum S100A8 veya S100A9 düzeyleri yüksek dereceli mesane tümörlerini düşük derecelilerden ayıramamaktadır, hatta tüm mesane kanserli hastalar değerlendirildiğinde bile sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir artış bulunmamaktadır. Organ olarak mesane, idrara komşu olduğu için bu proteinlerin idrarda bakılması yeni bir çalışma için konu olabilir, ancak Müller H ve ark. (72) yaptığı çalışmayı da göz önünde bulundurarak, bu proteinlerin tespiti ve miktar tayini için kütle spektrometrisi gibi ELISA'dan analitik anlamda daha duyarlı bir yöntemle çalışılması gerektiğini düşünüyoruz.

S100A8 ve S100A9 proteinlerinin heterodimeri olan kalprotektin de bazı kanserlerde araştırılmış ve araştırılmaktadır. Bir çalışmaya göre (75), plazma kalprotektin düzeyi over kanserinde sağlıklı kontrollere ve benign over tümörlerine göre anlamlı artmaktadır. Ayrıca over tümörlerinde yaygın olarak kullanılan bir belirteç olan serum CA125 ile de pozitif yönde bir korelasyon göstermektedir. Ancak bir tümör belirteci olarak kullanıldığında, bu çalışmaya göre, CA125'dan daha düşük bir performans sergilemektedir. Benzer şekilde, Mielczarek-Palacz A ve ark. (76) yaptığı çalışma da serum kalprotektin değerlerinin over kanserinde sağlıklı kontrollere göre anlamlı yükseldiğini teyit etmektedir. Bununla beraber, uterin kanserde de serum kalprotektin düzeyleri yine sağlıklı kontrollere göre anlamlı artış göstermektedir, ancak bu artış over kanserinde olduğu kadar yüksek değildir (over kanseri için ortalama \pm standart sapma olarak, $231,84 \pm 13,74$ ng/mL; uterin kanser için $166,23 \pm 13,36$ ng/mL). Blanco-Prieto S ve ark. (77) yaptığı çalışmada ise kalprotektin düzeyleri akciğer kanserinde serumda anlamlı artış göstermektedir [akciğer kanseri için medyan (aralık) olarak, $221,21$ (48,33 - 482,89) ng/mL; kontroller için $129,44$ (33,13 - 421,23) ng/mL].

Yaptığımız literatür taramasında mesane kanserinde serum kalprotektin düzeylerini tayin eden hiçbir yayına rastlamadık. Ancak idrar düzeylerini tayin eden tek bir çalışmayla karşılaştık. Ebbing J ve ark. (5) yaptığı bu çalışmada, idrar kalprotektin düzeyleri sağlıklı kontrollere göre 10 kata kadar anlamlı artış göstermektedir [mesane kanseri için medyan (çeyrek değerler genişliği) olarak, $522,3$ (167,1 - 1801,4) ng/mL; sağlıklı kontroller için $51,0$ (20,5 - 86,6) ng/mL]. Bizim çalışmamızda da benzer değerler ile karşılaşılmaktadır (mesane kanseri için medyan $412,56$ ng/mL, sağlıklı kontroller için medyan $67,08$ ng/mL). Ancak onların çalışmasında, bizim çalışmamızdan daha az sayıda hasta olmasına rağmen yüksek dereceli tümörlerle düşük dereceli tümörler arasında anlamlı fark bulabilmişlerdir [yüksek derece (n=13) için medyan $1635,2$ ng/mL; düşük derece (n=25) için medyan $351,9$ ng/mL]. Biz çalışmamızda böyle bir fark bulamadık [yüksek derece (n=43) için medyan $528,38$ ng/mL; düşük derece (n=30) için medyan $305,81$ ng/mL]. Çalışmamızda yüksek derece ile düşük derece arasında ayırım yapan parametre(ler) yalnızca idrar BTA düzeyleri ile idrar BTA/kreatinin oranları idi. Bu yüzden idrar kalprotektin düzeyleri her ne kadar diğer çalışmada yüksek derece ile düşük dereceli tümörleri ayırıyor görünse de idrar BTA düzeylerine tümör derecesini ayırt edebilme açısından bir üstünlüğü olduğunu düşünmüyoruz. Çalışmamızda idrar BTA düzeylerinin, kreatinine oranları da dahil, ayrıca tüm invaziv olguları noninvazivlerden ayırabilme yeteneğine de sahip olduğunu saptadık (Tablo 4B, Şekil 11). İdrar kalprotektin düzeylerinin böyle bir özelliği olmamasına rağmen idrar BTA

düzeylelerine bir üstünlüğü olduğunu tespit ettik. İdrar BTA düzeyleri ve kreatinine oranları kasa invaziv (T2-4) olguları diğler hasta alt gruplarından ayıramazken idrar kalprotektin düzeyleri kasa invaziv (T2-4) olguları hem noninvaziv (Ta) olgulardan, hem de yalnızca bağ dokuya invaziv (T1) olgulardan yüksek bir duyarlılık (%92) ve özgüllük (%92) ile ayırabilmekteydi (Tablo 4B, Şekil 12). Ancak idrar kalprotektin düzeyleri, idrar kreatinin değerlerine oranlandığı zaman bu anlamlı farklılık ortadan kayboldu (Tablo 4B). Bunun yanı sıra ister idrar kalprotektin, ister idrar BTA düzeyleri idrar kreatinin değerlerine oranlandığında performanslarında herhangi bir artış çalışmamızda gözlenmemektedir (Tablo 4B). Bu yüzden Heller F ve ark. (78) yaptıkları çalışmada bildirildiği gibi idrar kalprotektinin idrar kreatinin değerlerine oranlanmasının tanısai isabetlilik açısından bir yarar sağlamadığı görüşüne katılmaktayız.

Çalışmamız, yaptığımız literatür taramasına göre, mesane kanserinde serum kalprotektin düzeylerini tayin eden ilk çalışmadır. Sonuçlarımız, serum kalprotektin düzeylerinin mesane kanserinde anlamlı yükseldiğini göstermektedir. Ancak hasta alt gruplarını (evre ve derece) birbirinden ayırmakta yetersizdir (Tablo 4B). Bu açıdan bakıldığında mesane kanserinin tanısında idrar BTA düzeylerine herhangi bir üstünlüğü bulunmamaktadır. Bununla beraber, sağlıklı kontrollerde elde ettiğimiz serum kalprotektin sonuçları, literatürdeki diğler çalışmalardan önemli ölçüde farklıdır (76, 77, 79, 80). Ancak bu çalışmalarda elde edilen değerler de birbirlerinden oldukça farklıdır. Bu farklılığın kullanılan ticari kitlerin farklı olduğuna yorumluyoruz. Ayrıca çalışmamızda, serum kalprotektin düzeyleri yükselirken serum S100A8 ve S100A9 düzeyleri anlamlı bir artış göstermemektedir. Bunun nedeninin de S100A8 ve S100A9'un immün sistem hücrelerinde veya tümör hücrelerinde heterodimer kompleks oluşturup (81) dolaşıma kalprotektin olarak salınması (82) olduğunu düşünüyoruz. Son olarak, kontrol ve hasta gruplarında serum kalprotektin düzeylerinin, idrar kalprotektin ve BTA düzeyleri ile korelasyon göstermeyip, tüm katılımcılar dahilinde anlamlı pozitif korelasyonlar göstermesini, sağlıklı kontroller ile hastaların serum kalprotektin düzeyleri arasındaki anlamlı farktan kaynaklandığına yorumluyoruz.

Özetle, mesane kanserinde serum S100A8 ve S100A9 düzeyleri çalışmamızın sonuçlarına göre anlamlı artış göstermemektedir. Serum kalprotektin düzeyleri her ne kadar hastalarda anlamlı bir yükseliş eğiliminde olsa da hasta evre ve derece alt gruplarında herhangi bir ayırım yapamadığı için idrar BTA düzeylerinin önüne geçememektedir. Ancak idrar kalprotektin düzeyleri, idrar BTA düzeylerine üstün olarak kasa invaziv tümörleri,

noninvaziv ve bağ dokusuna invaziv tümörlerden ayırabilmektedir. Dolayısıyla idrar kalprotektin düzeyleri, mesane kanserinin tanısında idrar BTA düzeylerini desteklemek amacıyla kullanılabilir ve bu Şekilde mesane kanserinin tedavi rejiminin planlanmasına katkıda bulunabilir.



8. KAYNAKLAR

- 1) Ploeg M, Aben KK, Kiemeneij LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol.* 2009;27:289-93.
- 2) Shariat SF, Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI. Critical evaluation of urinary markers for bladder cancer detection and monitoring. *Rev Urol.* 2008;10:120-35.
- 3) Salama I, Malone PS, Mihaimed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34:357-64.
- 4) Minami S, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Kawashima Y, Yoshio K, Ishii J, Matsumoto K, Nagashio R, Okayasu I. Proteomic study of sera from patients with bladder cancer: usefulness of S100A8 and S100A9 proteins. *Cancer Genomics Proteomics.* 2010;7:181-9.
- 5) Ebbing J, Mathia S, Seibert FS, Pagonas N, Bauer F, Erber B, Günzel K, Kilic E, Kempkensteffen C, Miller K, Bachmann A, Rosenberger C, Zidek W, Westhoff TH. Urinary calprotectin: a new diagnostic marker in urothelial carcinoma of the bladder. *World J Urol.* 2014;32:1485-92.
- 6) Bhatt J, Cowan N, Protheroe A, Crew J. Recent advances in urinary bladder cancer detection. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012;12:929-39.
- 7) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-917.
- 8) Cancer Facts and Figures 2006. Atlanta: American Cancer Society 2006
- 9) Wan J, Grossman HB. Bladder carcinoma in patients age 40 years or younger. *Cancer.* 1989;64:178-81.
- 10) Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA.* 2011;306:737-45.
- 11) Negri E, La Vecchia C. Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2001;10:7-14.
- 12) Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeneij LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013;63:234-41.

- 13) Abern MR, Dude AM, Tsivian M, Coogan CL. The characteristics of bladder cancer after radiotherapy for prostate cancer. *Urol Oncol.* 2013;31:1628-34.
- 14) Zaghloul MS. Bladder cancer and schistosomiasis. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2012;24:151-9.
- 15) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
- 16) Ahmad I, Patel R, Liu Y, Singh LB, Taketo MM, Wu XR, Leung HY, Sansom OJ. Ras mutation cooperates with β -catenin activation to drive bladder tumorigenesis. *Cell Death Dis.* 2011;2:124.
- 17) Grossman HB, Liebert M, Antelo M, Dinney CP, Hu SX, Palmer JL, Benedict WF. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 1998;4:829-34.
- 18) Abat D, Demirhan O, Inandiklioglu N, Tunc E, Erdogan S, Tastemir D, Uslu IN, Tansug Z. Genetic alterations of chromosomes, p53 and p16 genes in low- and high-grade bladder cancer. *Oncol Lett.* 2014;8:25-32.
- 19) Izumi K, Zheng Y, Li Y, Zaengle J, Miyamoto H. Epidermal growth factor induces bladder cancer cell proliferation through activation of the androgen receptor. *Int J Oncol.* 2012;41:1587-92.
- 20) Fleshner NE, Herr HW, Stewart AK, Murphy GP, Mettlin C, Menck HR. The National Cancer Data Base report on bladder carcinoma. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer.* 1996;78:1505-13.
- 21) Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics. Tumors of the urinary system and male genital organs. 2010 Chapter 2:89-147.
- 22) Edge S, Byrd D, Compton C. 7th ed. Chicago: Springer-Verlag; 2010. *AJCC Cancer Staging Manual.*
- 23) Gregg JR, Dahm P, Chang SS. Guideline-based management of non-muscle invasive bladder cancer. *Indian J Urol.* 2015;31:320-326.
- 24) Witjes JA, Comp erat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, Lebet T, Ribal MJ, Van der Heijden AG, Sherif A; European Association of Urology. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol.* 2014;65:778-92.

- 25) Kitamura H, Kakehi Y. Treatment and management of high-grade T1 bladder cancer: what should we do after second TUR? *Jpn J Clin Oncol*. 2015;45:315-22.
- 26) Sauter G, Algaba F, Amin M, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon, France: IARCC Press; 2004.
- 27) European Association of Urology. Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. <http://www.uroweb.org/>. Erişim: Aralık 2015.
- 28) Proctor I, Stoeber K, Williams GH. Biomarkers in bladder cancer. *Histopathology*. 2010;57:1-13.
- 29) Wang HF, Wang JS. Research progress in potential urinary markers for the early detection, diagnosis and follow-up of human bladder cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:1723-6.
- 30) Kinders R, Jones T, Root R, Bruce C, Murchison H, Corey M, Williams L, Enfield D, Hass GM. Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder. *Clin Cancer Res*. 1998;4:2511-20.
- 31) Leyh H, Marberger M, Conort P, Sternberg C, Pansadoro V, Pagano F, Bassi P, Boccon-Gibod L, Ravery V, Treiber U, Ishak L. Comparison of the BTA stat test with voided urine cytology and bladder wash cytology in the diagnosis and monitoring of bladder cancer. *Eur Urol*. 1999;35:52-6.
- 32) Ravasi T, Hsu K, Goyette J, Schroder K, Yang Z, Rahimi F, Miranda LP, Alewood PF, Hume DA, Geczy C. Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. *Genomics*. 2004;84:10-22.
- 33) Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*. 1995;37:417-29.
- 34) Schäfer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*. 1996;21:134-40.
- 35) Yan WX, Armishaw C, Goyette J, Yang Z, Cai H, Alewood P, Geczy CL. Mast cell and monocyte recruitment by S100A12 and its hinge domain. *J Biol Chem*. 2008;283:13035-43.
- 36) Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33:637-68.

- 37) Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J.* 2006;396:201-14.
- 38) Vogl T, Gharibyan AL, Morozova-Roche LA. Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. *Int J Mol Sci.* 2012;13:2893-917.
- 39) Sohnle PG, Hunter MJ, Hahn B, Chazin WJ. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J Infect Dis.* 2000;182:1272-5.
- 40) Kerkhoff C, Vogl T, Nacken W, Sopalla C, Sorg C. Zinc binding reverses the calcium-induced arachidonic acid-binding capacity of the S100A8/A9 protein complex. *FEBS Lett.* 1999;460:134-8.
- 41) Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol.* 1993;53:197-204.
- 42) Mørk G, Schjerven H, Mangschau L, Søyland E, Brandtzaeg P. Proinflammatory cytokines upregulate expression of calprotectin (L1 protein, MRP-8/MRP-14) in cultured human keratinocytes. *Br J Dermatol.* 2003;149:484-91.
- 43) Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, Foell D, Gerke V, Manitz MP, Nacken W, Werner S, Sorg C, Roth J. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood.* 2004;104:4260-8.
- 44) Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3762-71.
- 45) Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.* 2007;81:28-37.
- 46) Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med.* 2007;13:1042-9.
- 47) Ghavami S, Rashedi I, Dattilo BM, Eshraghi M, Chazin WJ, Hashemi M, Wesselborg S, Kerkhoff C, Los M. S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *J Leukoc Biol.* 2008;83:1484-92.
- 48) Cheng P, Corzo CA, Luetke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, Ortiz M, Nacken W, Sorg C, Vogl T, Roth J, Gabrilovich DI. Inhibition of dendritic cell differentiation and

accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med.* 2008;205:2235-49.

49) Moon A, Yong HY, Song JI, Cukovic D, Salagrama S, Kaplan D, Putt D, Kim H, Dombkowski A, Kim HR. Global gene expression profiling unveils S100A8/A9 as candidate markers in H-ras-mediated human breast epithelial cell invasion. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1544-53.

50) Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol.* 2006;8:1369-75.

51) Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, Tessier PA, Mayer D. S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Exp Cell Res.* 2006;312:184-97.

52) Yong HY, Moon A. Roles of calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, in invasive phenotype of human gastric cancer cells. *Arch Pharm Res.* 2007;30:75-81.

53) Stulík J, Osterreicher J, Koupilová K, Knížek, Macela A, Bures J, Jandík P, Langr F, Dedic K, Jungblut PR. The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass. *Electrophoresis.* 1999;20:1047-54.

54) Turovskaya O, Foell D, Sinha P, Vogl T, Newlin R, Nayak J, Nguyen M, Olsson A, Nawroth PP, Bierhaus A, Varki N, Kronenberg M, Freeze HH, Srikrishna G. RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2008;29:2035-43.

55) Ott HW, Lindner H, Sarg B, Mueller-Holzner E, Abendstein B, Bergant A, Fessler S, Schwaerzler P, Zeimet A, Marth C, Illmensee K. Calgranulins in cystic fluid and serum from patients with ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 2003;63:7507-14.

56) Tolson JP, Flad T, Gnau V, Dihazi H, Hennenlotter J, Beck A, Mueller GA, Kuczyk M, Mueller CA. Differential detection of S100A8 in transitional cell carcinoma of the bladder by pair wise tissue proteomic and immunohistochemical analysis. *Proteomics.* 2006;6:697-708.

57) Urquidi V, Goodison S, Ross S, Chang M, Dai Y, Rosser CJ. Diagnostic potential of urinary α 1-antitrypsin and apolipoprotein E in the detection of bladder cancer. *J Urol.* 2012;188:2377-83.

- 58) Bauer JD, Ackermann PG, Toro G. Bray's Clinical laboratory methods, The C. V. Mosby Company. Saint Louis, USA, 7th ed., 1968;p.315.
- 59) Abd El Gawad IA, Moussa HS, Nasr MI, El Gemae EH, Masooud AM, Ibrahim IK, El Hifnawy NM. Comparative study of NMP-22, telomerase, and BTA in the detection of bladder cancer. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2005;17:193-202.
- 60) Konety BR. Molecular markers in bladder cancer: a critical appraisal. *Urol Oncol.* 2006;24:326-37.
- 61) Smith ZL, Guzzo TJ. Urinary markers for bladder cancer. *F1000Prime Rep.* 2013;5:21.
- 62) Irani J, Desgrandchamps F, Millet C, Toubert ME, Bon D, Aubert J, Le Duc A. BTA stat and BTA TRAK: A comparative evaluation of urine testing for the diagnosis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 1999;35:89-92.
- 63) Mahnert B, Tauber S, Kriegmair M, Schmitt UM, Hasholzner U, Reiter W, Hofmann K, Schmeller N, Stieber P. BTA-TRAK--a useful diagnostic tool in urinary bladder cancer? *Anticancer Res.* 1999;19:2615-9.
- 64) Thomas L, Leyh H, Marberger M, Bombardieri E, Bassi P, Pagano F, Pansadoro V, Sternberg CN, Boccon-Gibod L, Ravery V, Le Guludec D, Meulemans A, Conort P, Ishak L. Multicenter trial of the quantitative BTA TRAK assay in the detection of bladder cancer. *Clin Chem.* 1999;45:472-7.
- 65) Miyake M, Goodison S, Rizwani W, Ross S, Bart Grossman H, Rosser CJ. Urinary BTA: indicator of bladder cancer or of hematuria. *Urinary BTA: indicator of bladder cancer or of hematuria. World J Urol* 2012;30:869-73.
- 66) Heicappell R, Wettig IC, Schostak M, Müller M, Steiner U, Sauter T, Miller K. Quantitative detection of human complement factor H-related protein in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol.* 1999;35:81-7.
- 67) Krzych ŁJ, Czempik PF, Saucha W, Kokocińska D, Knapik P. Serum S100B protein concentration in brain-dead organ donors: a pilot study. *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2015;47:320-3.
- 68) Gogas H, Eggermont AM, Hauschild A, Hersey P, Mohr P, Schadendorf D, Spatz A, Dummer R. Biomarkers in melanoma. *Ann Oncol.* 2009;20 Suppl 6:vi8-13.
- 69) Kim HJ, Kang HJ, Lee H, Lee ST, Yu MH, Kim H, Lee C. Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer. *J Proteome Res.* 2009;8:1368-79.

- 70) Du XM, Chang H, Sun HY, Zhang JY, Gao Y, Shen B. [Expression and clinical significance of calcium-binding protein S100A9 in breast cancer]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2012;28:637-9. Özet
- 71) Hermani A, Hess J, De Servi B, Medunjanin S, Grobholz R, Trojan L, Angel P, Mayer D. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5146-52.
- 72) Müller H, Haug U, Rothenbacher D, Stegmaier C, Brenner H. Evaluation of serum and urinary myeloid related protein-14 as a marker for early detection of prostate cancer. *J Urol*. 2008;180:1309-13.
- 73) Bansal N, Gupta A, Sankhwar SN, Mahdi AA. Low- and high-grade bladder cancer appraisal via serum-based proteomics approach. *Clin Chim Acta*. 2014;436:97-103.
- 74) Ismail MF, El Boghdady NA, Shabayek MI, Awida HA, Abozeed H. Evaluation and screening of mRNA S100A genes as serological biomarkers in different stages of bladder cancer in Egypt. *Tumour Biol*. 2015 Ekim 27.
- 75) Ødegaard E, Davidson B, Elgaaen BV, Fagerhol MK, Engh V, Onsrud M, Staff AC. Circulating calprotectin in ovarian carcinomas and borderline tumors of the ovary. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198:418.e1-7.
- 76) Mielczarek-Palacz A, Sikora J, Kondera-Anasz Z, Nocoń M. [Changes in calprotectin concentration--inflammation marker in serum of women with gynecological cancer]. *Ginekol Pol*. 2011;82:822-6. Özet
- 77) Blanco-Prieto S, Vázquez-Iglesias L, Rodríguez-Girondo M, Barcia-Castro L, Fernández-Villar A, Botana-Rial MI, Rodríguez-Berrocal FJ, de la Cadena MP. Serum calprotectin, CD26 and EGF to establish a panel for the diagnosis of lung cancer. *PLoS One*. 2015;10:e0127318.
- 78) Heller F, Frischmann S, Grünbaum M, Zidek W, Westhoff TH. Urinary calprotectin and the distinction between prerenal and intrinsic acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:2347-55.
- 79) Meuwis MA, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y, Laharie D, Piver E, Seidel L, Colombel JF, Louis E. Serum calprotectin as a biomarker for Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7:678-83.

- 80) Oktayoglu P, Mete N, Caglayan M, Bozkurt M, Bozan T, Em S, Nas K. Elevated serum levels of calprotectin (MRP8/MRP14) in patients with Behçet's disease and its association with disease activity and quality of life. *Scand J Clin Lab Invest.* 2015;75:106-12.
- 81) Vogl T, Leukert N, Barczyk K, Strupat K, Roth J. Biophysical characterization of S100A8 and S100A9 in the absence and presence of bivalent cations. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763:1298-306.
- 82) Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol.* 2009;86:557-66.



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özgür Yaşar

Doğum Yeri : Fatih/İstanbul

Doğum Tarihi : 3 Mayıs 1986

Eğitim:

İlkokul : Özel Yeni Yıldız İlkokulu (1992 – 1997)

Ortaokul : Özel Üsküdar Amerikan Lisesi (1997 – 2001)

Lise : Özel Üsküdar Amerikan Lisesi (2001 – 2004)

Üniversite : İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (2004 – 2011)

Tıpta Uzmanlık Eğitimi : İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2012 – 2016)

Üye Olduğu Meslek Kuruluşları: Türk Biyokimya Derneği, Türk Klinik Biyokimya Derneği,
Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği

Yabancı Dil : İngilizce, Almanca

E-posta : ozgryasr@hotmail.com