

**T.C.
ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**IRAK’ TA TÜMÖR MARKER VE GEN KARAKTERİZASYONU
TARAFINDAN KULLANILAN MESANE KANSERİNİN ERKEN YAŞTA
TANIMLANMASI**

HAYDER HATEM ABDULWAHHAB AL-DOORI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2021**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

HAYDER HATEM ABDULWAHHAB AL-DOORI tarafından hazırlanan “**İrak’ta Tümör Marker ve Gen Karakterizasyonu tarafından kullanılan Mesane Kanserinin erken yaşta tanımlanması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Jüri Üyeleri:

Başkan: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, Botanik ABD

Doç. Dr. Mine TÜRKTAS ERKEN
Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD

Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÜL
Çankırı Karatekin Üniversitesi Orman Fakültesi,
Orman Mühendisliği Bölümü, Toprak İlimi ve Ekoloji ABD

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **“Irak’ta Tümör Marker ve Gen Karakterizasyonu tarafından kullanılan Mesane Kanserinin erken yaşta tanımlanması”** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (12/02/2021).

HAYDER HATEM ABDULWAHHAB AL-DOORI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İRAK‘TA TÜMÖR MARKER VE GEN KARAKTERİZASYONU TARAFINDAN KULLANILAN MESANE KANSERİNİN ERKEN YAŞTA TANIMLANMASI

HAYDER HATEM ABDULWAHHAB AL-DOORI

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Kanser daha ziyade genetik temelli bir hastalık olarak değerlendirilmektedir. Öyle ki hücre proliferasyonunun kontrolsüz bir hale geldiği ve tümör oluşumu ile karakterize edilen çok basamaklı bir neoplaziyi tanımlayan bu hastalık bireyin genetik yatkınlığına bağlıdır mesane kanseri, tütün gibi farklı kanserojen ajanlara çevresel maruziyetten sonra ve mesleki maruziyetin yanı sıra çoklu genetik ve epigenetik değişikliklerin ardışık birikimi nedeniyle ortaya çıkar. Bu moleküler değişiklikler, kontrolsüz hücre çoğalması, hücre döngüsünün deregülasyonu ve farklılaşması, hücre ölümü veya apoptozda azalma, istila bloğu ve metastaz ile sonuçlanır. Belirli genetik değişiklikler, epigenetik ve protein ekspresyonu, bu sinyal yollarının etkileşimi gibi bir çift olarak ortaya çıkar ve büyüme, çare, ilerleme ve metastaz yapma yeteneği dâhil olmak üzere tümörün biyolojik davranışını belirler. Tümör kaslarında en sık görülen değişiklikler Papiller invazif düşük dereceli FGFR3 mutasyonel aktivasyonu, kromozom 9'un heterozigotluk kaybı (LOH), PIK3CA ve RAS genlerinin mutasyonel aktivasyonu ve TSC1'in mutasyonel inaktivasyonunu içerir. Kas invaziv tümörlerde yaygın değişiklikler arasında TP53 ve RB1 inaktivasyonu, PTEN ekspresyonunun azalması (mutasyon, LOH, homozigot delesyon veya diğer mekanizmalar yoluyla), ERBB2 amplifikasyonu, 6p22 amplifikasyonu, kromozom delesyonları 8 ve hedefleri olan diğer Genomik değişiklikler yer alır. CpG adalarının hipermetilasyonu, sıklıkla tümör baskılayıcılar da dahil olmak üzere kanserdeki kritik genlerin transkripsiyonel susturulmasıyla ilişkilidir.

2021, 113 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mesane Kanseri, Tümör Marker, Gen Karakterizasyonu

ABSTRACT

Master of Science Thesis

IDENTIFICATION OF BLADDER CANCER AT EARLY AGE IN IRAQ USED BY TUMOR MARKER AND GENES CHARACTERIZATION

HAYDER HATEM ABDULWAHHAB AL-DOORI

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Supervisor: Assoc. Prof. Melda Dölarslan

Cancer is mostly considered as a genetic disease so much so that this disease, which defines a multi-step neoplasia characterized by tumor formation and cell proliferation becomes uncontrolled, depends on the individual's genetic predisposition. Bladder cancer occurs after environmental exposure to different carcinogenic agents such as tobacco and due to occupational exposure as well as the sequential accumulation of multiple genetic and epigenetic alterations. These molecular alterations result in uncontrolled cell proliferation, deregulation of the cell cycle and differentiation, decrease in cell death or apoptosis, invasion block and metastasis. The particular genetic alterations, epigenetic and protein expression occur as a pair like the interaction of these signalling pathways, and determine the biological behavior of the tumor, including its ability to grow, resort, progress and metastasize. Depending on the genetic profile, the clinical behavior, The changes most common in tumors muscle Papillary invasive low grade include mutational activation of FGFR3, loss of heterozygosity (LOH) of the chromosome 9, mutational activation of PIK3CA and RAS genes and mutational inactivation of TSC1. Common alterations in muscle-invasive tumors include inactivation of TP53 and RB1, reduced expression of PTEN expression (via mutation, LOH, homozygous deletion, or other mechanisms), amplification of ERBB2, amplification of 6p22, chromosome deletions 8 and other Genomic alterations whose targets .The hypermethylation of the CpG islands is frequently associated with the transcriptional silencing of critical genes in cancer, including tumor suppressors.

2021, 113 pages

Key words: Bladder Cancer , Tumor Marker , Gene Characterization .

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

„„Irak'ta Tümör Marker ve Gen Karakterizasyonu tarafından kullanılan Mesane Kanserin erken yaşta tanımlanması““adlı bu çalışma 2019-2021 yılları arasında Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne „„Yüksek Lisans Tezi““ olarak sunulmuştur. Bu çalışmanın amacı ülkemiz ile gen ifadesi düzenleyici elementlerle (epigenomik metilasyon profilleri ilk olarak toplanan idrar örneklerinin içeren bir metilasyon dizisi kullanılarak analiz edildi. Bu profillerin analizi, seçilen idrar örneklerinde mesane kanseri varlığıyla ilişkili aday genlerin tanımlanmasına hizmet etmiştir. Daha sonra MS-PCR ile metilasyonu karakterize etmek ve seçilen genlerin hem hücresel tümör çizgileri hem de gelecekteki idrar serilerinde zaten toplanmış olanlardan bağımsız teknik alternatiflerle metillenip metillenmediğini belirlemek için optimize edilmiş epigenetik metodolojisi. Seçilen genlerin hipermetilasyonunun, seçilen genlerin ekspresyon kaybıyla ilişkili olup olmadığını değerlendirmek için, mesane kanseri hücre çizgileri, metillenmişlerse genlerin ekspresyonunu geri almak için bir demetile edici ajan olan azasitidin ile tedavi edildi. metilasyonun varlığı sadece CpG dizisi tarafından değil, aynı zamanda PCR metilasyonu, bisülfidin dizilenmesi ve gen ekspresyonunun RT-PCR, western blot (WB) ile geri kazanımının doğrulanması ve immüno Floresans. Tümörlerin moleküler analizi için yüksek etkili teknolojilerin ilerlemesi, genetik profillerin, epigenetik ve protein karakteristiğinin farklı tümör alt tiplerinin araştırılmasına ve belirli bir klinik davranışı tanımlayan hedeflerin ve moleküler yolların tanımlanmasına izin verir olan ilişkisi açıklanmıştır). Tez çalışma konumun belirlenmesinde, planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Melda Dölarslan, Çalışmalarım anında manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan annem ve babam ve erkek ve kız kardeşlerimiz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım anında manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan arkadaşlarım saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

HAYDER HATEM ABDULWAHHAB AL-DOORI
Şubat 2021, Çankırı

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	12
1.1. Mesane kanseri.....	12
1.2. Mesane tümörlerinin sınıflandırılması	13
1.3. Histolojik Sınıflaması	14
1.4. Klinik Sınıflandırma.....	15
1.5. Genetik Karakterizasyon	16
1.6. Genetik değişiklikler	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
2.1. Çalışma Hipotezinin Gerekçesi.....	21
2.2. Biyobelirteçler	21
2.2.1 Biyobelirteçlerin keşfi ve kimlik tanımlama süreci	22
2.2.2 Yeni biyobelirteçlerin keşfi için farklı yaklaşımlar	23
2.3. Biyoinformatiğin Rolü	24
2.4. Proteomik Teknolojiler	24
2.5. Mesane Kanserinin İdrar Biyobelirteçleri	27
2.5.1. BTA-TRAK™ VE BTA-STAT™	28
2.5.2. NMP22.....	28
2.5.3. IMMUNOCYT™	29
2.5.4. BLCA-4.....	29
2.5.4. SİTOKERATİNLER.....	29
2.5.5. HA-HAASE	30
2.5.6. SURVIVINE.....	30
2.5.7. LEWIS X ANTİJEN.....	31
2.5.8. PROTEİN OLMAYAN Belirteçler	31
2.5.9. UROVYSION™	31
2.5.10. MİKROSATELLİLER.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1. Çalışmanın popülasyonu	34
3.2. Elde edilen veriler	36
3.2.1. Risk faktörleri	37
3.3.1. Görüşme süresi	38
3.3.2. Fonksiyonel işaretler	39
3.3. Fizik Muayenenin Sonuçları	40
3.4. Paraklinik Muayeneler	41
3.4.1. Tanı amaçlı ek muayeneler	41
3.4.2. Uzantının değerlendirilmesi	43
3.5. Verilerin İrdelenmesi	45
3.5.1. Epidemiyoloji.....	45

3.5.2. Ortalama tanı yaşı.....	47
3.5.3. Risk faktörleri.....	47
3.5.4. Patoloji.....	48
4. SEÇİLMİŞ BİYOBELİRTEÇLER ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA.....	51
4.1. Malzemeler.....	51
4.1.1. Biyobelirteçler	51
4.1.2. Örnekler.....	51
4.2. Antikor	52
4.2.1. Antikor Yakalama.....	52
4.2.2. Çözücüler, kimyasal reaktifler ve diğer ürünler	52
4.2.3. Tamponlar	53
4.2.3. Destekler	54
4.3. ELISA Kitleri	54
4.4. Yöntemler.....	55
4.5. Genel prensip	56
4.5.1. Sinyal Üretimi ve Analizi	57
4.5.2. Multipara metrik immunoanalizler	58
4.6. Sonuçlar ve Tartışma	62
4.6.1. Mesane kanseri için biyobelirteç seçimi.....	62
4.6.2. İkinci Çalışma.....	70
4.6.3. İdrar kesesi kanseri biyobelirteçlerinin miktar tayini.....	74
4.6.4. E.G.F.R İşaretleyicisini entegre etmek	79
4.6.5. E.N-2 İşaretleyicisinin Özel Durumu	80
4.6.6. V.E.G.F, M.M.P-9 VE I.L-8'in Kantifikasyonu için Multipara metrik İmmünoassay.....	81
4.6.7. P.T.G.S-2 İşaretleyici Entegrasyonu.....	82
4.6.8. Sağlıklı Kontroller Kategorisi (HCC) için Biyolojik Belirteçlerin Geliştirilmesi 83	
4.6.9. V.E.G.F, M.M.P-9, I.L-8 VE I.L-6 Kantifikasyonu için Multipara metrik İmmünoassay.....	83
4.6.10. Çapraz Reaksiyon.....	84
4.6.11. C.D.H-1 ve ER.BB-2 belirteçlerinin Entegrasyonu	85
5. MESANE KANSERİ HASTALARINDA GENETİK DEĞİŞİKLİKLER.....	89
5.1. Giriş	89
5.2. Mesane kanserinde tanısal, prognostik faktörler ve kişiselleştirilmiş alternatif tedaviler	90
5.3. Mesane kanserinde epigenetik değişikliklerin belirlenmesi için yüksek etkili teknolojiler.....	91
5.4. Metodoloji.....	91
5.4.1. İdrar toplama.....	91
5.4.2. Mikrohematüri değerlendirmesi.....	92
5.4.3. İdrar örneklerinde DNA metilasyon profilleri	92
5.4.4. İdrar örneklerinde miRNA ekspresyonunun profilleri.....	92
5.4.5. Aday genlerin hipermetilasyonunu susturma ile ilişkilendirmek için fonksiyonel analiz	93
5.4.6. Epigenetik profilli miRNA'ların hedeflerinin belirlenmesi ve hedeflerin susturulmasını düzenleyici miRNA'larla ilişkilendirmek için fonksiyonel analiz ...	93

5.4.7. Doku dizilerinde (T.M.A) immünohistokimya ile epigenetik profilin tümörjenezinde kritik genlerin susturulmasını değerlendirin	93
5.5. Verilerin Yorumlanması.....	95
5.5.2. Mikrohematüri değerlendirmesi.....	96
5.5.3. İdrar örneklerinde DNA metilasyon profilleri	96
5.5.4. Aday genlerin hipermetilasyonunu susturma ile ilişkilendirmek için fonksiyonel analiz	99
5.5.5. BDNF metilasyonunun biyolojik ve klinik ilgisinin karakterizasyonu.....	99
5.5.6. Metilasyon durumu bisülfitle işlenmiş DNA üzerinde iki metilasyon PCR'sinin optimize edilmesiyle belirlenmiştir	100
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	103
6.1. Sonuçlar	103
6.2. Öneriler	106
KAYNAKLAR	107



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
cDNA	KomplementerDeoksiribonükleik asit
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	Real Time (Eş zamanlı) PCR

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mesane kanserinin aşamaları (Billerey, 2001).....	14
Şekil 1.2. Mesane tümörlerinin sınıflandırılması (Chou <i>et al</i> , 2015).....	16
Şekil 2.1. Biyolojik olarak protein profilleri için ProteinChip® teknolojisi analiz prosedürü (Kulasingam, 2008).....	26
Şekil 2.2. Biyobelirteçlerin keşfi için stratejiler. MS, kütle spektrometresi (Kulasingam, 2008).....	27
Şekil 3.1. Seminal ve prostat yağını infiltre eden erken mesane tümörü (Benedetto, 1976).....	36
Şekil 3.2. 101 hastanın yaşa göre % dağılımı	37
Şekil 3.3. 101 hastada sigara içme profili	37
Şekil 3.4. Hastaların diğer risk faktörlerine göre dağılımı (J. Ferris et al, 2013)...	38
Şekil 3.5. Tüm hastalarda farklı fonksiyonel belirtilerin sıklığı (N. İsmaili, 2017)39	
Şekil 3.6. 101 hastada hematüri karakteri	40
Şekil 3.7. Prostat kanseri ile ilişkili hastaların klinik tablosu	40
Şekil 3.8. Mesane teşhis cihazı (Nishizuka , 2005).....	42
Şekil 3.9. Pek ultrason ve tarayıcının gelişiyile bu yana yapılmıştır. (Nishizuka , 2005)	43
Şekil 3.10. Doppler cihazı (Nishizuka , 2005).....	43
Şekil 3.11. Hastayı muayene etme yöntemi (Nishizuka , 2005)	45
Şekil 4.1. Sigma-Aldrich'ten	52
Şekil 4.2. BCIP / NBT.....	53
Şekil 4.3. Bromofenol mavisi.....	54
Şekil 4.4. Fosfat tamponlu salin	54
Şekil 4.5. ELISA Kitleri.....	55
Şekil 4.6. İdrar Örnekleri.....	55
Şekil 4.7. Çöktürülmüş sonra	56
Şekil 4.8. Sinyal Üretimi ve Analizi (Landman et al , 1998).....	57
Şekil 4.9. Kuyunun dibine yerleştirilmiş bir matris örneği.	59
Şekil 4.10. Mesane kanseri hastaları ve sağlıklı vericilerden alınan örneklerdeki işaret konsantrasyonları (Gogalicet al , 2015)	66
Şekil 4.11. Kavramın ispatı. (a) I.L-6, I.L-10 ve I.L-8 kalibrasyon eğrileri (b) Düzeltilmiş eğri parametreleri. (Hata çubukları 8 ped standart sapmalarını temsil etmektedir. U.a., keyfi birim)	75
Şekil 4.12. Çok parametrelili immünolojik testlerin geliştirilmesine genel bakış 75	
Şekil 4.13. V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8'in kantifikasyonu için multiparametrik immünoassay. (a) Kalibrasyon eğrileri (b) Ayarlanmış eğri parametreleri (c) Immünoassay koşulları (d) komplo matrisi	76
Şekil 5.1. Tüm CpG adalarının metilasyon profillerinin kümeleme analizi 97	
Şekil 5.2. Denetimli hiyerarşik kümelerin patolojik derecesi veya histolojik aşaması analizi	98
Şekil 5.3. Farklı şekilde metillenmiş farklı genlerin yoğunluğundaki varyasyon .98	
Şekil 5.4. BDNF promotörünün bisülfid dizilemesi ile karakterizasyonunu göstermektedir	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Hastaların geçmişe göre dağılımı.....	39
Çizelge 4.1. İdrar örneklerinde belirteçlerin ilk değerlendirmesi.....	64
Çizelge 4.2. A.U.C değerine göre sınıflandırılan biyobelirteçlerin bireysel performansı.....	67
Çizelge 4.3. İkinci çalışmadan biyobelirteç tahlilleri.....	72
Çizelge 4.4. Parametrelerin bireysel performansı	73



1. GİRİŞ

1.1. Mesane kanseri

Mesane, ana işlevi bir rezervuar olarak hareket etmek ve böbreklerde üretilen idrarın boşaltılmasına izin vermek üzere içi boş bir organdır. Mesane duvarı Yaklaşık yarım santimetre kalınlığında ve birkaç doku tabakasından oluşur. Mesane kanseri, mesanede kanserli hale gelen normal bir hücrenin transformasyonudur. Kanser hücresinin anarşik çoğalması, malign tümör adı verilen az çok organize bir düzeneğin oluşumuna yol açar. Bu yayılmaya metastatik yayılma denir. Mesane kanseri mukozadaki vakaların% 90'ında görülür, buna ürotelyal tümör veya ürotelyal karsinom denir. Hastalığın başlangıcında, kanser hücreleri az ve mukoza ile sınırlı bulunmaktadır. Ya bu yerel aşamada kalabilir, ya da tümör kas tabakasına veya yakındaki organlara sızabilir (Anthony, 2009). Mesanenin içi, çoğu mesane kanserinden sorumlu geçiş hücreleri ile kaplıdır. Ve ilerleme büyük ölçüde tümörün agresifliğine bağlı olur. İleri yaş ve eşlik eden hastalıklar herhangi bir nedene bağlı yüksek ölüm oranları ile ilişkilidir.

İdrar kesesinin kanseri, ciddi bir sağlık sorunudur, özellikle gelişmiş ve son derece sanayileşmiş ülkelerde nispeten yüksek bir prevalansa ulaştığını bulunmuştur. Ürolojik tümörler içinde sıklık sırasına ve ölüm nedenine göre ikinci sırada yer alır. Genellikle (vakaların% 75'inde) iyi prognozunu ve dolayısıyla yüksek sağkalımını açıklayacak olan başlangıç aşamalarında teşhis edildiğinden karakterizedir. Tüm kanserler gibi mesane kanseri gelişimi onkogenler ve tümör baskılayıcı genler çeşitli mutasyonlar elde edilmesinden ibarettir. Mesane kanserinde değiştirilebilen genler arasında FGFR3, HRAS, RB1 ve TP53 bulunur. Bu nedenle, ailede mesane kanseri öyküsü de hastalık için bir risk faktörüdür. Ve bazı insanların bazı kimyasalları parçalama yeteneğini azaltarak, etkilere karşı daha duyarlı hale getirdiklerine inanılmaktadır. (P.Sanchez , 2004).

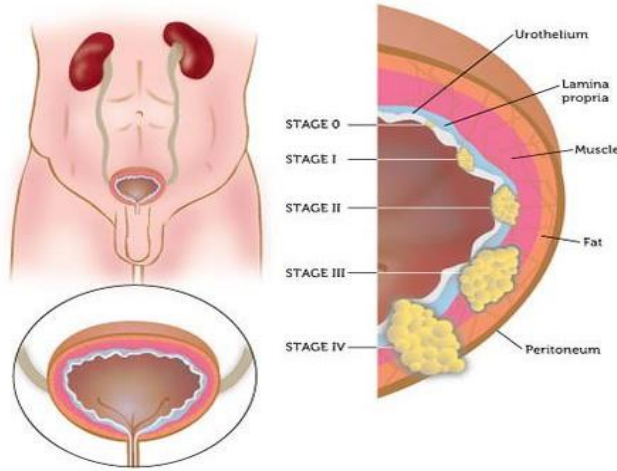
1.2. Mesane tümörlerinin sınıflandırılması

Mesane kanseri evresini tanımlamak için, doktorlar tümörün boyutunu ve mesanenin iç duvarına olası sızması, özellikle mesane kasını inceler. Ayrıca lenf düğümlerine, komşu organlara veya vücutta belli bir mesafeye metastaz şeklinde olası bir yayılımı da incelerler. Mesane tümörlerinin% 75'inin tamamen yüzeysel olduğu ve bu nedenle infiltre edilmediği tahmin edilmektedir. Ek olarak, infiltrasyon olarak nitelendirilen diğer tümörler vardır, çünkü mesane duvarını kaslara kadar istila ederler (Felix *et al* , 2008).

Mevcut uygulamada, doktorlar Tümör, etkilenen düğüm sayısı ve Metastaz için TNM sınıflandırmasını kullanırlar (Şekil 1.1). Bu sınıflandırma, tümörleri farklı prognoz ve tedavilere sahip olacak şekilde evrim aşamalarında değerlendirmeyi ve sınıflandırmayı mümkün kılar. Mesane kanseri için TNM 3 spesifik unsurların analizine dayanmaktadır: T: tümörün büyüklüğü ve mesane kasına girmesidir. Tümör ne kadar büyük ve sızmışsa, tedavisi o kadar zor olur.

N: lenf düğümlerinde kanser hücrelerinin varlığına veya yokluğuna ve etkilenen düğüm sayısına karşılık gelir. Bu parametre, lenfatik ağında kanserin olası yayılması hakkında bir fikir verir.

M: metastazın varlığı ya da yokluğu, yani kanserin organizmanın diğer dokularına yayılmasıdır.



Şekil 1.1. Mesane kanserinin aşamaları (Billerey, 2001)

Mesane idrar yolunun bir parçasıdır ve idrar için geçici bir rezervuardır. Duvarı üç katmandan oluşan içi boş bir organdır:

1. Mukoza: bir epitel ve bir koryondan oluşur (lamina propria) . Ürothelium adı verilen epitel, mesanenin içini çizir ve bu nedenle idrarla temas eder. Aynı zamanda ürotelyal (veya geçişli) hücrelerden oluşur.
2. Muskular (veya detrüsör): iç boyuna tabaka, dairesel orta tabaka ve dış boyuna tabaka olan üç düz kas dokusu tabakasına bölünmüştür.
3. Adventisya: En dıştaki katmandır. Bu katman bağ dokusu içerir ve yetişkinlerde bir yağ yatağı oluşturur. Mesane kubbesinin seviyesinde, adventisya periton ile kaplıdır (Billerey , 2001).

1.3.Histolojik Sınıflaması

Histolojik olarak tümörler dört kategoriye ayrılabilir:

1. Geçiş hücreli karsinomlar (veya ürotelaller): bunlar doğada epiteldirler ve mesane tümörlerinin % 90'ından fazlasına karşılık gelirler. Bunlar, hücre farklılaşması (histolojik derece) ve mesane duvarı içine girişi ile karakterizedir. (stage T or TVNIM / TVIM, described below).

2. Skuamöz hücre karsinomları: bunları mesane kanserlerinin% 10'undan daha azını oluşturur. Şiztozomiyaz ile en fazla ilişkili histolojik tiptir.
3. Adenokarsinomlar: Mesanenin kötü huylu tümörlerinin% 0,5 ila% 2'si ile ilgilidir.
4. Farklılaşmamış hücre kanserleri: bu kategori, küçük hücreli kanserler (TBM) dahil olmak üzere diğer tüm histolojik formları içerir. ikinci çok nadirdir ve mesane kanserleri% 0.5 ila% 1 oranında temsil eder.

1.4. Klinik Sınıflandırma

Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) Kılavuzlarına göre, mesane kanserinin klinik tablosu prognozu, yönetimi ve terapötik amaçları açısından farklılık gösteren üç kategoriye ayrılmıştır (Şekil 1.2):

1. Sızdırmayan kas mesanesi (TVNIM) veya yüzeysel tümörler: bunlar mukoza ile sınırlı ürotelyal tümörlerdir.
2. Kas infiltrasyonlu mesane tümörü (TVIM): bunlar mesane kasını istila eden tümörlerdir.
3. Metastatik lezyonlar.

classification of bladder tumors		TVNM		TVIM				
		Non-invasive tumor			Non-invasive tumor			
		Tis	Ta	T1(a-b)	T2	T3a	T3b	T4a-T4b
	Urothelium Chorion superficial muscle deep muscle Adipose tissue							
Neighborhood bodies								

Şekil 1.2. Mesane tümörlerinin sınıflandırılması (Chou *et al* , 2015)

1.5. Genetik Karakterizasyon

Tümörlere uygulanan moleküler biyolojinin gelişimi, mesane tümörlerinde somatik genetik (ve epigenetik) değişikliklerin tanımlanmasını sağlamış ve mesane karsinogenezinin moleküler mekanizmalarını anlamak için önemli bir adım olmuştur. On yıl önce, ürotelyal mesane karsinogenez modeli, genetik değişikliğin iki farklı yoluna dayanıyordu: papiller hiperplazi ve infiltrate edici olmayan ve düşük dereceli tümörlerin yolu (HRAS ve FGFR3 genlerinin baskın mutasyonları ile) ve displazi ve kas içine sızan tümörlerin yolu (tümör baskılayıcı genler TP53 ve / veya RB1'in yapısal ve fonksiyonel anormallikleri ile). Bu iki moleküler yolak, ürotelyal mesane karsinogenezinde yer alan yeni genleri tanımlayan genom çapında çalışmaların yakın zamandaki sonuçları ile yeniden değerlendirilmelidir (Chou *et al* , 2015). Bu değişiklikler potansiyel olarak klinik kanserolojide belirteç olarak da kullanılabilir. Gerçekten de, bazıları tanısal ve prognostik değerlendirmelerde, tedaviye yanıtı değerlendirmek için yararlı olabilir ve şu anda yeni terapötik yaklaşımlara yol açmaktadır.

1.6. Genetik değişiklikler

Genetik değişiklikler onkogenlerin anormal aktivasyonundan sorumludur (fonksiyon kazancı) veya tümör baskılayıcı genlerin deaktivasyonu (fonksiyon kaybı). Bu iki gen sınıfı, etki mekanizmaları ile ayırt edilir. Onkogenlerin etki tarzının baskın olduğu düşünölmektedir, tümör üzerinde olumlu bir etkinin gözlemlenmesi için iki allelden sadece birinin aktive edilmesi yeterlidir. Tersine, tümör baskılayıcı genlerin etki tarzının resesif olduğu kabul edilir. İnaktivasyonu, iki alellerinin değiştirilmesini gerektirir.

Yeni hibridizasyon tekniklerinin geliştirilmesi sayesinde sitogenetik ve moleküler analizlerin çözme gücü arasındaki boşluk son yıllarda önemli ölçüde daralmıştır: karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (karşılaştırmalı genomik hibridizasyon için CGH, ardından CGH-dizisi) ve floresan yerinde hibridizasyon (FISH tekniği). 2000'lerin başında, metafazik kromozomlar üzerindeki CGH, çözünürlüğü artırdı ve yüksek mitotik indekse sahip tümör hücrelerinde seçici önyargı kaynağı olan sitogenetik analizden önce hücre kültüründen kaçındı. CGH, gittikçe daha fazla çözümleyici olan CGH dizisi teknikleriyle hızla yerini aldı (BAC dizileri için 1 Mb, oligonükleotid dizileri için birkaç Kb'ye kadar çözünürlük) ve bu, tümörlerde büyütölmüş veya kaybolmuş, daha küçük boyutlu yeni bölgeleri vurgulamayı mümkün kılmıştır. DNA çiplerinden türetilen teknolojilerin geliştirilmesi (mikrodiziler), insan genomundaki tüm genlerin kapsamlı analizini yaparak iş ölçeğini değiştirmeyi mümkün kılmıştır (genom çapında analiz),bu da tümörlerde önemli sayıda yeni moleküler, genetik ve epigenetik olayı tanımlamayı mümkün kılar (Rosser *et al* , 2014).

Bu genetik değişikliklerin büyük bir kısmı muhtemelen onkogenik güce sahip olmayan geçici değişikliklere karşılık gelir. Bu değişikliklerin sadece bir kısmı tümör ilerlemesi sırasında nedensel bir rol oynamaktadır ve farklı kanser türlerinde ortak olan birkaç temel mekanizma üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabilir ve hücre proliferasyonu, hücre döngüsü tutuklamasından kaçış veya apoptoz gibi "kanserin ayırt edici özellikleri" adı altında listelenir.

Tümör DNA, RNA'nın mikrodizi teknolojileri ve özellikle de ekzomların veya tüm genomların dizilenmesi (1 bp'lik çözünürlük) ile kapsamlı analizi, bazı değişikliklerin kanser gelişiminde ne kadar önemli bir rol oynadığını hızlı bir şekilde açıklamamıza izin vermelidir. Yeni nesil sıralama teknolojilerinin yaptığı önemli ilerlemeye rağmen, bu teknikler, düzenli olarak büyük ölçekli tüm genom (3 Gb) dizilemesini dikkate almak için hala çok pahalıdır. Son beş yıl kullanılan bir alternatif, genom dizisinin tüm kodlama kısımlarına (genomun% 1'i, 28 Mb) karşılık gelen ekzom dizisinin analizidir. Mesane kanserinde, ekzom üzerine yapılan son çalışmalar, ürotelyal mesane karsinogenezinde yer alan genlerle ilgili son zamanlarda yeni genomik değişikliklerin tanımlanmasını mümkün kılmıştır. Son olarak, son zamanlarda, hepsi bulaşıcı ve yüksek dereceli 131 mesane tümörü içeren Kanser Genom Atlas projesi çerçevesinde genom çapında bir analiz gerçekleştirilmiştir. Genomik değişikliklerin sayısı özellikle önemliydi, mesane tümörleri melanomlar (10 / Mb) ve akciğer kanserlerinden (8 / Mb) sonra mutasyon oranı (Megabaz başına yaklaşık 7.7) açısından üçüncü sırada geliyor. Bu çalışma, mesane tümörlerinde daha önce hiç hasar görmediğini bildiren genleri içeren bir dizi mutasyon, delesyon ve amplifikasyon tanımlamıştır, ve bunlar potansiyel yeni terapötik hedefler oluşturabilir. (Wu , 2005).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çalışmalar, sistematik hale getirilmesi amacıyla incelenen değişkenlere göre gruplandırılmış ve aşağıdaki verileri göz önünde bulundurarak sonuçların anlaşılmasını kolaylaştırmıştır: ilk yazar ve referans yılı, çalışma tasarımı, çalışma süresi, çalışma popülasyonu (ırk ve cinsiyet gibi sosyo-demografik veriler, maruziyet ajanları, maruz kalma süresi, karıştırıcı faktörler, ana sonuçlar, kanıt düzeyi ve tavsiye derecesi vb.

En son yayınlanan 2019 WHO verilerine göre Irak'ta mesane kanserinden ölümler 1.125'e (tüm ölümlerin% 0.64'ü) ulaştı. Yaşa göre ölüm oranı 100.000 kişi başına 7,39'dur. Irak, dünyadaki 3 numaralı sırada yer alıyor. Kanser ile iş faaliyeti arasındaki ilişkiye ilişkin ilk referanslardan biri, Percival Pott'un İngiltere'deki genç baca temizleyicilerinde skrotal kanseri tanımladığı 1775'te bulundu. bu kanser türü ile kurum arasında nedensel bir ilişki olduğunu düşünmüştür.

1895'te Ludwing Rehm, bir Alman anilin fabrikasındaki işçilerin mesane kanseri vakalarını bildirdi. Bu gözlem, diğer birçok ülkede benzer çalışmalara ve insan mesane kanserinde aromatik aminlerin nedenselliğinin tanınmasına yol açmıştır. Uluslararası Çalışma Örgütü (ILO), 1921'de, benzidin ve naftilaminin sorumlu kanserojen maddeler olduğunu belirtti ve iş sağlığı konusunda ilk uyarıyı başlatmıştır.

Deneyisel kanıt, 1930'da, patolog Wilhelm Hueper ve diğerleri, beta-naftilamin'in tekrar uygulanmasının ardından hayvanlarda mesane kanserine neden olduğunu bulundu (Beatriz Suarez , 2015).

1970 yılında, Piemontese dei Colori di Anilina (IPCA) işçilerinde mesane tümörlerinden 36 ölüm doğrulandı, o zamandan beri halk arasında kanser fabrikası (kanser fabrikası) olarak bilinen bir İtalyan boya fabrikası. 1982'de Carlos A. Gonzalez, Mataro'da (İspanya) tekstil ürünleri boyayan ve basan işçilerin mesane kanserine yakalanma olasılığını hesapladı ve nüfusun geri kalanından neredeyse altı kat daha yüksek oldukları endişe verici verileri keşfetti.

Çin'de aromatik aminlerle mesane kanseri ile ilgili ilk çalışma 1990'da yayınlandı ve kullanımı 1950'lerde başladı. Amerikan Kanser Derneği'ne göre, mesane kanseri gelişmiş ülkelerde kolorektal, akciğer ve prostat tümörlerinden sonra dördüncü sırada yer aldı, dünya çapında yılda yaklaşık 375.000 yeni vaka açıklıyordur . Vakaların% 65'i gelişmiş ülkelerde, özellikle de Güney Avrupa ve Kuzey Amerika'da kayıtlı olup, esas olarak yüksek sigara içme oranına bağlıdır. Mesane kanseri vakalarının% 70-75'i tütün kullanımına bağlıdır ve % 20-25 kadarı belirli mesleki maruziyetlerle ilişkilidir. Çeşitli araştırmacılar (Lancet, 1978; NIOSH, 1981) kanser ölümünün% 23 ila% 38'inin mesleki nedenlerle ilişkilendirilebileceğini hesaplamıştır. Mesane karsinogeneziyle ilgili özel kimyasallar arasında beta-naftilamin, benzidin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) ve 4-aminobifenil bulunur. Bu maddeler batı ülkelerinde yasaklanmış olmasına rağmen da, şu anda kullanımda olan diğer birçok kimyasallar da bu patolojiden sorumlu olabileceği tahmin edilmektedir. En yüksek mesane kanseri oranları tekstil boyası ve lastik kauçuk endüstrileri, ressamlar, deri işçileri, ayakkabı, alüminyum, demir ve çelik endüstrisinde bildirilmiştir. İspanya'da, yılda yaklaşık 12.200 vaka teşhis edilmektedir; bu, erkek popülasyondaki tümörlerin% 11'ini ve kadın

popülasyonunun% 2.4'ünü temsil etmektedir. Ülkemizdeki insidans, erkeklerde dördüncü en sık görülen tümör olan dünyadaki en yüksek oranlardan biridir.

Arap ülkelerinde ve özellikle Mısır'da kronik iritasyona neden olan hastaların mesanesinde biriken parazit *Schistosoma haematobium*'un neden olduğu endemik schistosomiasis enfeksiyonu, çevremizde nadir görülen mesane skuamöz hücreli karsinomuna (SCC) neden olmaktadır ve aile geçmişinin bu kanser riskini artırdığına inanılmaktadır. Bazı durumlarda, bu aile üyeleri kansere neden olan aynı kimyasala maruz kalmış olabilir. Glutasyon-s-transferaz (GSTM1) enzimlerindeki ve N-asetiltransferaz enzimindeki (NAT2) (asetilatörler) genetik polimorfizmler gibi diğer değişiklikler, bireylerin organizmalarının belirli toksinleri parçalamada yavaş olduğunu ve bunun da mesane kanserine yakalanma eğiliminin artmasına neden olabilir.

Az sayıda insan, mesane kanseri riskini artıran genetik bir sendromu miras alır, örneğin:

- ✓ Retinoblastoma geninin (RB1) bir mutasyonu çocuklarda göz kanserine neden olabilir ve ayrıca mesane kanseri riskini artırabilir.
- ✓ PTEN genindeki mutasyonların neden olduğu ve esas olarak meme ve tiroid kanserleriyle ilişkili olan inek hastalığı da mesane kanseri için yüksek risk altındadır.
- ✓ Lynch sendromu (kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser) esas olarak kolon ve endometriyal kanser ile ilişkilidir, ancak etkilenen hastalarda mesane kanseri ve üreter kanseri riski de yüksektir.

Seçilen çalışmaları gözden geçirdikten sonra, en yüksek kanıt derecesine sahip olan sonuç, aromatik aminlere mesleki maruziyet ile polisiklik hidrokarbonlar ve mesane kanseri arasında kanıtlanmış bir bağlantı olduğudur. Bununla birlikte, bu kanser ve diğer mesleki maruziyetlerin ilişkisine ilişkin kesin sonuçlar elde etmek için daha fazla bilgi elde etmek için daha fazla çalışma yapılmasının yanı sıra, önceden onaylanmış maddelere maruz kalan işçilerin gözetim ve izlenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

2.1. Çalışma Hipotezinin Gerekçesi

Evrensel kanser kayıtları yoktur. İnsidans oranlarını tahmin etmek için kullanılan yöntemler, bir taraftan ulusal (veya bölgesel) insidans kayıtlarında ve diğer taraftan ölüm kayıtlarında olmak üzere çeşitli olasılıklara dayanmaktadır. Çok merkezli olanlar da dahil olmak üzere farklı ülkelerde yapılan çok sayıda çalışma, yüzeysel mesane tümörlerinin erken evrelerde evriminde belirli klinik ve patolojik faktörlerin önemini göstermiştir.

Tüm hastalıklarda olduğu gibi mesane tümörlerinin izlenmesi ve tedavisi, hastaların yaşam kalitesi üzerinde en az önemli etkiye sahip olan en iyi maliyet-fayda testleri ve tedavileri istenir. Bugün itibariyle belirli bir izleme ve eylem planı mesane tümörlü tüm hastalar için kurulmamıştır. Ürologa bu hastalığı olan hastaların yönetiminde kullanımı kolay bir araç sağlamak amacıyla, 2006 yılında Avrupa Üroloji Derneği dergisinde yayınlanan çok merkezli bir çalışma yapılmıştır. İçinde, çalışılan faktörlere göre, toplamına bağlı olarak, mesane tümörünün daha büyük veya daha az nüks veya ilerlemesi riskine yönelik ve böylece bir takip veya yeterli tedavi düşünülebilecek bir puan atanır. Bu nedenle araştırmacı, sağlık alanımızda mesane tümörü tanısı ve tedavisi olan hastaların özelliklerini ve gelişimini gösteren bir çalışma yapmayı planlıyor, Mesane tümöründen muzdarip Irak nüfusunun riskini ölçmek için, tütün (vaka-kontrol çalışması) gibi literatürde kanıtlanmış bir etiyopatojenik faktörü ve bundan muzdarip olanlar gibi, zayıf gelişme riski (çok değişkenli çalışma).

2.2. Biyobelirteçler

Ulusal Sağlık Enstitüleri'ne göre, bir biyobelirteç (veya biyolojik belirteç) "Nesnel olarak ölçülen ve normal veya patolojik biyolojik süreçlerin veya terapötik bir müdahaleye farmakolojik tepkilerin bir göstergesi olarak değerlendirilen biyolojik bir özellik" olarak tanımlanır. Bir biyobelirteç bu nedenle moleküler, anatomik, fizyolojik veya biyokimyasal olabilir (Biomarkers, 2001).

Daha kesin olarak, bir tümör markörü, "kanser öncesi veya kanserli koşullar altında kantitatif veya kalitatif olarak değiştirilen bir molekül, bir işlem veya bir madde olarak tanımlanır, ve modifikasyon bir analizle tespit edilebilir ". Bu değişiklikler tümörün kendisinden veya çevresindeki normal dokudan gelebilir.

Biyobelirteçler iki ana alanda kullanılmaktadır. Biyomedikal araştırmada, biyobelirteçler yeni tedavileri geliştirirken ve değerlendirirken kullanılabilir. Özellikle terapötik hedefleri belirlemeyi, ilaç adaylarının seçimine yardımcı olmayı ve adayların farmakolojisinin anlaşılmasına katkıda bulunmayı mümkün kılarlar. Ek olarak, bir ilacın klinik değerlendirmesi sırasında klinik bir kriterin yerini alabilirler, bu vekil son noktalar olarak bilinir. (Schroth et al, 2003).

Klinik uygulamada, biyobelirteçlerin çeşitli işlevleri bir sınıflandırma oluşturmayı mümkün kılar:

- Teşhis biyobelirteçleri: anormal patolojisi veya durumu olan hastaların tanımlanmasına izin verirler.
- Risk veya duyarlılık biyobelirteçleri: Bir patoloji geliştirme riskini tahmin etmeyi mümkün kılarlar.
- Prognostik biyolojik belirteçler: patolojinin seyrini belirlemeyi mümkün kılarlar. Onkolojide, prognostik biyobelirteçler rekürrens riskinin bir tahminini verir.
- Tahmine dayalı biyobelirteçler: bir tedaviye yanıtı tahmin etmeyi ve dolayısıyla bir hasta için en uygun tedaviyi belirlemeyi mümkün kılar ("Kişiselleştirilmiş tıp" olarak tanımlanan strateji).
- Gözetim biyobelirteçleri: hasta izleme sırasında kullanılırlar. Kanserolojide nüks veya remisyon tespitine izin verirler (Kelloff , 2012).

2.2.1 Biyobelirteçlerin keşfi ve kimlik tanımlama süreci

Kişiselleştirilmiş tıbbın geliştirilmesi, hasta teşhisi, izleme ve tabakalandırma bağlamında kullanılabilecek biyobelirteçler için güçlü bir talep yaratmıştır. Aynı zamanda, yeni geniş bant teknolojilerinin ortaya çıkmasının yanı sıra kanser gibi

hastalıkların patofizyolojisini incelemek için sistemik yaklaşımların geliştirilmesiyle yeni biyobelirteç arayışı yeniden canlandı.

Bu bölümde açıklanan keşif ve tanımlama süreci esas olarak protein biyobelirteçleri ve dolayısıyla proteomiklerle ilgilidir. İlk olarak 1996 yılında bilimsel literatürde ortaya çıkan "proteom" terimi, bir organizma veya bir hücrel sistem tarafından üretilen tüm proteinleri ifade eder. Proteomik bu nedenle, bir proteomun büyük ölçekli çalışması ve proteinlerin biyolojik önemi ile ilgilidir. Bu nedenle, proteomik çalışmalar, proteinlerin tüm yönlerini (bunların ekspresyonu, işlevi, etkileşimi ve yapısı) anlamak veya hastalık durumlarının yeni biyolojik belirteçlerinin keşfedilmesine yol açmak gibi farklı amaçlara sahip olabilir (Schroth *et al* , 2003).

2.2.2 Yeni biyobelirteçlerin keşfi için farklı yaklaşımlar

Yeni biyolojik belirteçlerin keşfi için üç ana yaklaşım vardır (Ramachandran, 2008);

- Veriye dayalı yaklaşım: sayısal proteinler ile belirli bir patolojik durum arasındaki bir bağlantıyı tanımlamaya izin veren tüm proteomun bir analizidir.
- Bu yaklaşım tarafsızdır çünkü dahil olabilecek proteinler hakkında hiçbir varsayımda bulunulmamaktadır.
- Bilgiye dayalı yaklaşım: bir patoloji için bilimsel bilgi durumu sayesinde potansiyel biyobelirteçlerin belirlendiği hedeflenen proteomik bir yaklaşımdır. Bilginin durumuna bağımlılık bir dezavantaj olabilir çünkü yeterince geliştirilmezse, belirli bilinmeyen belirteçler tanımlanamaz.
- Sistem biyolojisine dayalı yaklaşım: Sistem biyolojisi, biyolojik bir sistemin tüm unsurlarının davranışlarını ve ilişkilerini inceleyen ve davranışını tahmin etmek için modeller geliştiren disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Bu yaklaşım, karmaşık bir sistemi birkaç parçaya bölerek ve aralarındaki ilişkileri belirleyerek analiz eden sözde indirgemeci yaklaşımla çelişir. Bu, izole edilmiş moleküllerin çalışmasının tüm sistemi anlamak için yeterli olduğunu varsayarken, sistem biyolojisi, hesaplama teknikleriyle (hesaplama yöntemleri)

ilişkili büyük miktarda genomik ve proteomik verilerin entegrasyonuna dayanır.

Proteomik ve bir hücredeki tüm proteinlerin incelenmesi (örneğin kanserli) ile ilgili iki ana zorluk vardır. Bu, çok sayıda numuneyi ve proteini aynı anda analiz edebilmek için yeni teknolojilere ve elde edilen büyük miktarda veriyi yönetmek ve analiz etmek için biyoinformatik araçların geliştirilmesine duyulan ihtiyaçtır (Ahram , 2008).

2.3. Biyoinformatiğin Rolü

Yeni biyobelirteçleri keşfetme sürecinde biyoenformatiğin iki ana rolü veri yönetimi ve veri madenciliğidir. Veri yönetimi, temel olarak belirli miktarda bilginin depolanmasına, aranmasına ve alınmasına izin veren veritabanları tarafından yapılır. Mevcut birçok veri tabanı vardır, bunlardan başlıcaları SWISS-PROT, TrEMBL ve NCBI'dir. Veri madenciliğine gelince, proteomik teknolojileri tarafından üretilen verilerin analizi ve yorumlanması ile ilgilidir. Bunun için veri yorumlama, örüntü tanıma ve tahmine dayalı analiz araçları kullanılır (Yu , 2010).

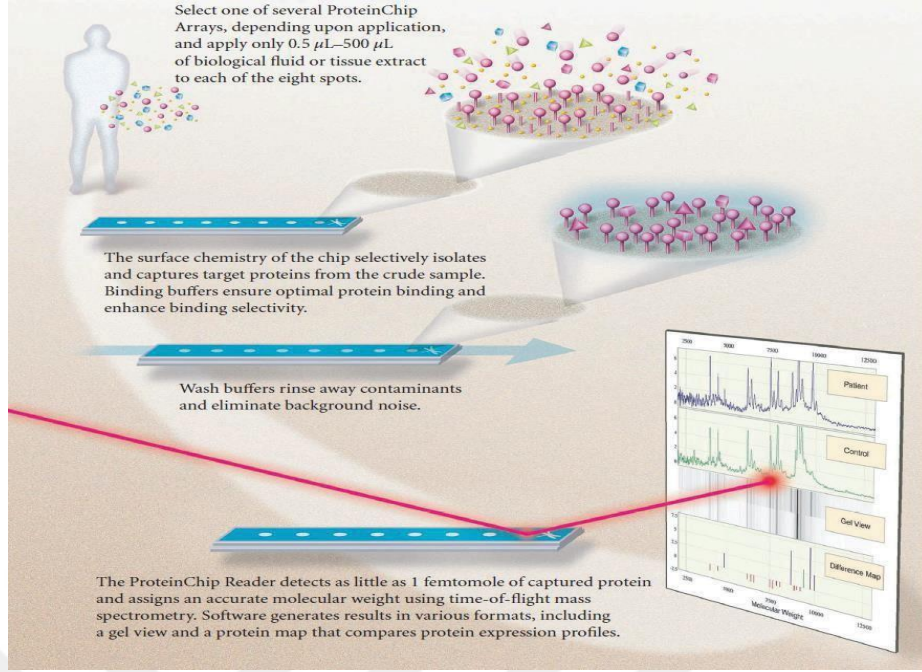
2.4. Proteomik Teknolojiler

Biyolojik belirteçlerin araştırılması için klinik örneklerin analizi esas olarak iki teknik kullanılarak yapılır: kütle spektrometrisi ve protein çipleri. Kütle spektrometresi, molekülleri kütlelerine göre tespit etmek ve tanımlamak için kullanılan analitik bir tekniktir. İyonizasyon kaynağı molekülleri iyonlara dönüştürür ve ardından analizör iyonların kütle / yük oranını (m / z) ölçer.

Farklı kütle spektrometresi teknikleri arasında, SELDI (yüzeyde geliştirilmiş lazer desorpsiyon iyonizasyonu) iyonizasyon yöntemi, kimlikleri bilinmese bile, potansiyel biyobelirteçlerin iyonik imzalarını keşfetmek için yeterli bir strateji olarak ortaya çıkmıştır (Edwards *et al* , 2015).

Amerika Birleşik Devletleri Kanseri Enstitüsü'nün Ulusal Kanseri Enstitüsü (NCI), birincil amacı proteomik teknolojileri yoluyla kanserin moleküler temelini anlaşılmasını geliştirmek olan Klinik Proteomik Tümör Analizi Konsorsiyumu (CPTAC) adlı bir program oluşturdu. Bu konsorsiyum, bu nedenle, tümör biyolojik numunelerinin kütle spektrometresi ile analizine devam eder, böylece proteinlerin tanımlanmasına ve miktarının belirlenmesine ve numunenin proteomunun karakterizasyonuna izin verir. Bu verilerin aynı örneklerin transkriptomik ve genomik verileriyle entegrasyonu, tümör mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve aynı zamanda aday biyobelirteçlerin keşfine olanak tanır (Nishizuka, 2015).

Kütle spektrometrisi gibi, protein çipleri de çipin türüne bağlı olarak bir işaretleyiciyi, bir işaretçi grubunu veya bir proteom profilini tanımlamaya yardımcı olabilir. Adayları büyük ve paralel bir şekilde tespit etmeyi ve ölçmeyi mümkün kılarlar. Ve biyobelirteçlerin keşfi için çeşitli teknolojiler kullanılmaktadır. Ters fazlı çip formatları, biyobelirteçlerin keşfi için umut vadetmiştir, çünkü yüksek hassasiyetleri ve tekrarlanabilirlikleri ve ayrıca nicel yönleri nedeniyle bu tür uygulamalar için özellikle uygundur. Bu çipler aynı anda birçok numuneyi inceleyebilme avantajına da sahiptir. Protein çipleri ve uygulamaları, bu araçlara ayrılmış bir bölümde daha ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Hem kütle spektrometresinden hem de protein çiplerinden türetilen bir alete örnek, Bio-Rad'ın (www.bio-rad.com) SELDI ProteinChip® sistemidir. ProteinChip® teknolojisi, biyolojik numunelerden proteinlerin keşfi, doğrulanması, tanımlanması ve karakterizasyonu için kullanılır. SELDI-TOF-MS tekniğini bir çip formatıyla birleştirir (Şekil 2.1).



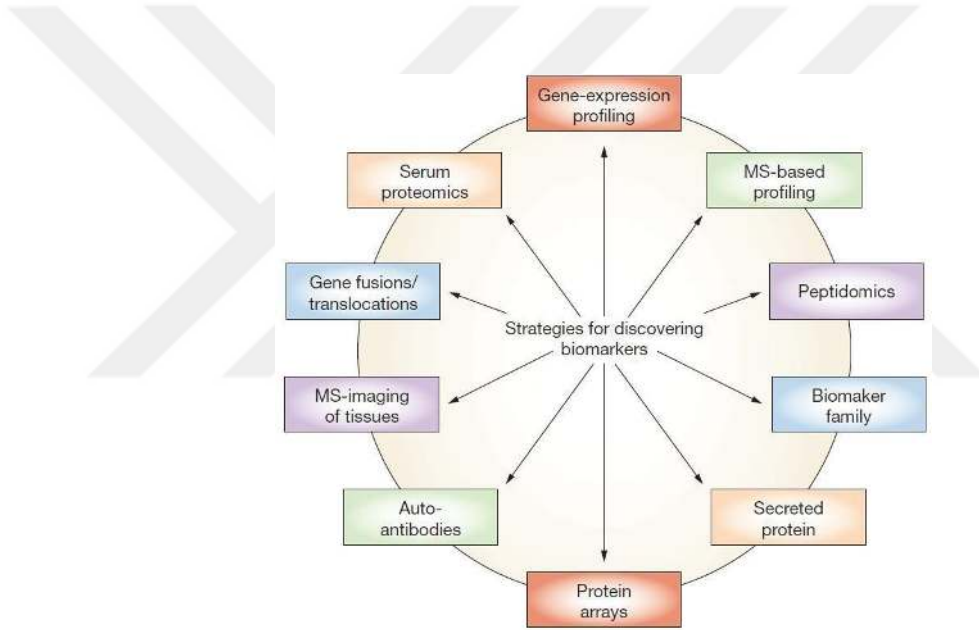
Şekil 2.1. Biyolojik olarak protein profilleri için ProteinChip® teknolojisi analiz prosedürü (Kulasingam, 2008)

ProteinChip® teknolojisinin prensibi, yüzey özellikleri proteinlerin tutulmasına izin veren çip üzerinde biyolojik numunelerin biriktirilmesine dayanır. Bu proteinler daha sonra bir ProteinChip® okuyucu kullanılarak SELDI-TOF-MS tarafından analiz edilir ve tespit edilir. Farklı örnek serilerinden bu şekilde elde edilen profiller daha sonra diferansiyel protein ekspresyon eşlemesi adı verilen bir teknik kullanılarak karşılaştırılır: belirli bir moleküler ağırlıkta proteinlerin nispi ekspresyon seviyeleri, istatistiksel yöntemler ve Bioinformatics yazılımı ile karşılaştırılır.. Örnekler Ek olarak, bir çalışma ProteinChip® teknolojisinin geçiş hücreli mesane tümörleri için bir teşhis aracı olarak potansiyelini göstermiştir. Yazarlar, proteindeki bu değişikliklerin tespit edilmesinin tanı duyarlılığını artırdığı ve bu nedenle bu yöntemle geçiş hücreli karsinom tanısını iyileştirmenin mümkün olduğu sonucuna varmışlardır. Yararlılığını belirlemek için artık daha derinlemesine çalışmalara ihtiyaç vardır.

Mueller ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada, mesane kanseri hastalarından alınan idrar örneklerini analiz etmek için ProteinChip® teknolojisi kullanıldı. Duyarlılıkta% 80 ve özgülükte% 90 ila% 97 tanısal performans gösteren çeşitli biyobelirteçler tanımlanmıştır. Bunların ayırt edici güçlerinin, tümörün invazif

aşamalarını (pT2 ve pT3) invazif olmayan aşamalardan (pT1 ve pTa) ayırdığı da gösterilmiştir (Reddy, 2003).

Kütle spektrometrisi ve protein dizilerinin yanı sıra, yeni biyobelirteçlerin keşfi için diğer ortaya çıkan teknolojiler kullanılmaktadır. Farklı olası stratejiler Şekil 2.2 de özetlenmiştir. Bunlardan bazıları, biyolojik numunelerdeki biyobelirteç yükseltme mekanizmalarının çalışmasına dayanmaktadır. Kanserojide ana mekanizmalar, proteinleri kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu, proteinlerin salgılanması ve atılmasındaki artış ve ayrıca doku mimarisinin anjiyojenez, istila ve yıkımıdır (moleküllerin salınmasına izin verebilir) (Mueller et al , 2005).



Şekil 2.2. Biyobelirteçlerin keşfi için stratejiler. MS, kütle spektrometresi (Kulasingam, 2008)

2.5. Mesane Kanserinin İdrar Biyobelirteçleri

İdrarın biyobelirteçleri tespit etmede çeşitli avantajları vardır. Koleksiyonu basittir ve invaziv değildir. Ek olarak, idrar, birçok farklı fizyolojik ve patolojik sürecin saptanmasına ve izlenmesine izin veren çok çeşitli aday biyobelirteçler kaynağıdır. Aslında, idrarda bulunan proteinler, üriner sistem hücrelerinin işlev bozukluğunu (örneğin, epitel hücrelerinin atılımı ile), aynı zamanda glomerüler filtrasyon sırasında proteinlerin kandan idrara geçişinden kaynaklanan diğer işlev bozukluklarını

yansıtabilir (Topham, 2007). Böylelikle mesane kanserinin saptanması ve izlenmesine yönelik birçok belirteç tanımlanmış ve bu belirteçlerin bazıları için idrar testleri zaten geliştirilmiştir. Bu bölüm, biyolojik belirteçlerin kapsamlı olmayan bir listesini ve mesane kanserine olan ilgilerini sunacaktır.

2.5.1.BTA-TRAK™ VE BTA-STAT™

BTA-Trak™ ve BTA-Stat™ (Polymedco, www.polymedco.com) BTA (mesane tümör antijeni) idrarında iki dozajlardır hCFHrp (insan tamamlayıcı faktör H-ilişkili protein) için olan karşılık gelir. Bu protein, insan tamamlayıcısının faktör H'sine benzer bir işleve sahiptir ve normal hücreler tarafından onları kendi organizmalarının bağışıklık sisteminden korumak için salınır. Kanser hücrelerinde, BTA bu nedenle bağışıklığa kaçışa izin verir (Kinderset al, 1998). BTA-TRAK™ testi, iki monoklonal antikor kullanan bir immüno-enzimatik sandviç tipi yöntemle kantitatif bir teste karşılık gelirken, BTA-stat™, immünokromatografi ile kalitatif bir testtir. İki test, üriner sitolojiden daha fazla duyarlılık gösterdi, ancak özellikle tümör dışı genitoüriner patolojiler sırasında yanlış pozitifler olasılığı nedeniyle daha düşük özgüllük gösterdi. Bu testler, FDA tarafından sadece sistoskopi ile birlikte mesane kanserinin izlenmesi için onaylanmıştır. Düşük özgüllükleri nedeniyle tarama veya teşhis için kullanılamaz.

2.5.2. NMP22

NMP22 (nükleer matriks proteini 22), çekirdek yapısının bir elemanı ve önemli bir mitoz düzenleyicisidir. Bir tümör bağlamında, NMP22 kanser hücrelerinde daha yüksek bir konsantrasyonda bulunur (bunlar çekirdek yapısında değişiklikler gösterir) ve hücrelerin apoptozu sırasında idrarda salınır Alere tarafından pazarlanan iki test vardır (www.alere.com): Alere NMP22® Testi (kantitatif ELISA testi) ve Alere NMP22 BladderChek®. Her ikisi de mesane kanserinin izlenmesi için FDA tarafından onaylanmıştır. Alere NMP22 BladderChek® testi, yüksek riskli hastalarda kanserin saptanması için de kullanılabilir (Shariatet al, 2008).

2.5.3. IMMUNOCYT™

ImmunoCyt™, Scimedx (www.scimedx.com) tarafından pazarlanan bir testtir. Bir immünoSitofloresan tekniğine dayanır ve tercihen mesane tümör hücreleri tarafından eksprese edilen antijenleri tanıyan üç monoklonal antikor kullanır. İdrar sitolojisinin duyarlılığını artırmak için yapılan bir testtir. Hastanın idrarında toplanan hücreler bir cam slayt üzerine sabitlenir ve sonuçlar daha sonra bir floresan mikroskobu kullanılarak okunur. Bu nedenle, iyi eğitilmiş personel ve operatörler arası değişkenliği mümkündür gerektirir. Bu test, idrar sitolojisi ve sistoskopi ile birlikte mesane kanserinin izlenmesi için FDA tarafından onaylanmıştır.

2.5.4. BLCA-4

Mesane kanserine özgü bir nükleer matris proteini (NMP) tanımlanmış ve BLCA-4 olarak adlandırılmıştır. Hem tümörde hem de komşu bölgelerde bulunur ancak tümörsüz mesanelerde saptanmaz (Konety et al, 2000).

BLCA-4'ün idrar konsantrasyonu, bir sandviç tipi ELISA testi ile ölçülür. Mesane kanseri hastalarından alınan idrar örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar, testin % 89 ile % 96.4 arasında bir duyarlılığının yanı sıra % 95 ile % 100 arasında bir özgüllük belirlemiştir. Dolayısıyla bu belirteç hem yüksek bir duyarlılığa hem de yüksek bir özgüllüğe sahiptir, ancak bu gözlemi doğrulamak için daha büyük ölçekli bir çalışma gerekli olacaktır.

2.5.4. SİTOKERATİNLER

Sitokeratinler, epitel hücrelere özgü ara filamentlerdeki proteinlerdir. İnsanlarda yirmi farklı sitokeratin izotipi tanımlanmıştır. Sitokeratin fragmanları, serum ve idrarda çözünür ve bu nedenle tespit edilebilir. Bu fragmanlar arasında, CYFRA 21-1 (sitokeratin 19'un çözünür fragmanı) çeşitli kanser türlerinde tespit edilir. Kantitatif tahlil, iki monoklonal antikor kullanılarak bir ELISA elektrokemilüminesans tekniği ile

gerçekleştirilir. Roche tarafından geliştirilen test, Elecsys® teknolojisine dayanmaktadır. Sandviç immünolojik testi, biyotinlenmiş bir monoklonal antikorun yanı sıra, numunede bulunan analit ile bir immünokompleks oluşturan bir rutenyum Ru (bpy) 2+ kompleksine konjuge edilmiş bir monoklonal antikor içerir. Streptavidin ile işlevselleştirilmiş mikrokürelerin eklenmesi, bağışıklık kompleksinin katı faza bağlanmasına izin verir. Reaksiyon karışımı daha sonra ölçüm hücresine aktarılır ve mikrosferler bir mıknatısla elektrotta tutulur. Son olarak, bir potansiyel farkı, bir foto çoğaltıcı ile ölçülür kemilüminesans emisyonunu sağlayan, elektrot uygulanır (Sanchez *et al* , 1999).

2.5.5. HA-HAASE

Hyaluronik asit (HA), normal insan doku ve sıvılarında bulunan bir glikozaminoglikandır. Tümör hücrelerinin yapışmasına ve göç etmesine yardımcı olur. Hyaluronidaz (HAase) enzimi tarafından parçalara ayrılır. HA ve enzimi, mesane tümörlerinin anjiyogenezi ile ilişkilidir ve idrarda salgılanır. Ek olarak, hyaluronidaz seviyelerindeki artış, tümörün derecesi ile ilişkilidir. HA-HAase testi, ELISA benzeri adı verilen bir teknik kullanılarak bu iki markörün kantitatif bir testidir. İki test, bir saptama antikoru yerine bir HA (biyotinlenmiş) bağlayıcı protein kullanan bir ELISA'ya benzer. HA testi, numunede bulunan ve katı desteğe eklenen HA arasındaki rekabetçi bir testtir. HAase tayini gelince, numunede bulunan enzim katı desteğe sabitlenmiş HA'yı degrade eder ve inkübasyondan sonra kalan HA, proteine bağlanan HA tarafından tespit edilir (Droller, 2004).

2.5.6. SURVIVINE

Survivin, hücre ölümünü düzenleyen protein ailesinin bir parçasıdır, IAP'ler (apoptoz proteinlerinin inhibitörleri). Bazı kaspazların aktivasyonunu önleyerek apoptozun dışsal ve içsel yollarını inhibe eder. Fetal gelişim sırasında ifade edilir, ancak normal yetişkin dokularda bulunmaz. Mesane kanserinde, survivin idrarda tespit edilir ve tümör evresi, ilerlemesi, nüks ve ölüm oranı ile ilişkilidir (Vanet *et al*, 2009).

2.5.7. LEWIS X ANTİJEN

Lewis X antijeni, kan grubu sistemlerinden biri olan Lewis sisteminin bir parçasıdır. Kan grubu antijenleri, eritrositlerin yüzeyine bağlı karbonhidratlardır. Ayrıca ürotelyum dahil olmak üzere bazı epitel dokularında da bulunurlar. Ürotelyal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşümü sırasında, zarın karbonhidrat bileşimindeki değişiklikler, normalde mevcut olan belirli antijenlerin (antijen A, B ve H gibi) yokluğuna ve tersine Lewis X antijeni gibi diğer antijenlerin ekspresyonuna yol açar. Aslında, immünohistokimyasal çalışmalar, derece ve tümör aşamasından bağımsız olarak ürotelyal tümörlerin% 90'ından fazlasında Lewis X antijeninin (normal ürotelyumda yoktur) varlığını göstermiştir (Cordon, 1988).

2.5.8. PROTEİN OLMAYAN Belirteçler

Bu tezin ana odağı protein biyobelirteçleri olmasına rağmen, mesane kanserinde protein olmayan idrarla ilgilenen belirteçler de vardır. Bu bölüm, bu tür biyobelirteçlerin bazı örneklerini sunar.

2.5.9. UROVYSION™

Tümör mesane hücrelerindeki bazı kromozomların değişiklikleri vardır. Bu genetik anomaliler, flüoresan yerinde hibridizasyon tekniği veya FISH (floresan in situ hibridizasyon) ile idrarda pul pul dökülen hücrelerde vurgulanır. Abbott tarafından pazarlanan bir kit var; UroVysion™. Bu kit, kromozom 3, 7 ve 17'deki anöploidi ve idrar örneklerinden 9p21 lokus kaybını tespit eden DNA problemleri içerir. Çoğu karşılaştırmalı çalışmada, UroVysion™ testi sitolojininkinden daha yüksek bir hassasiyet gösterir. Duyarlılığı tümör evreleri ilerledikçe artar, ancak alt evrelerde (% 36 ila% 57) ve düşük derecelerde (% 62 ila% 65) düşük kalır. Ve onun özgüllüğü sitolojisine benzerdir. Gerçekte, FISH tekniği nükleer seviyede anormallikleri arar ve diğer tümör dışı patolojilerden etkilenmez (Shariat *et al*, 2007).

2.5.10. MİKROSATELLİLER

Mikrosatellitler, genom boyunca dağılmış kısa DNA dizilerinin (1 ila 4 nükleotid) tekrarlarıdır. Tümör gelişimi için bir belirteç olarak kullanılabilecek değişikliklere uğrayabilirler. Bu mutasyonlar bir gendeki iki allellerin normal oranda bir değişiklik aşağıdaki heterozigotluk bir kaybına neden olabilir. Kromozom 9, mesane kanserinde heterozigotluk kaybında en yaygın şekilde rol oynayan kromozomdur. Mutasyonlar ayrıca mikrosatellit istikrarsızlığının nedeni olabilir (Diamandis, 2010).

İleriye dönük bir çalışmada, mikrosatellit belirteçlerinin idrarındaki analiz (mikrosatellit analizi, MSA), 1. ve 2. derece tümörler için üriner sitolojiye üstün bir duyarlılık gösterdi. Gerçekten de düşük dereceli tümörler saptanması iyileştirilmesi için ilginçtir: G1-G2 dereceli tümörler için % 75 ile % 95 ve pTis ve pTa tümörler için % 75 ile % 100 duyarlılık tanımlanmıştır. Mikrosatellit analiz tekniği de yüksek özgüllüğe sahiptir. Prognostik ilgisine gelince, heterozigotluk kaybı ile tümör progresyonu riski arasında bir ilişki henüz kurulmamıştır.

Hedefler:

1. Irak nüfusu için ayarlanmış insidans oranlarını hesaplayarak mesane tümörü insidansının yüksek olduğu bir alan olup olmadığını kontrol etmek ve bunları mevcut bilimsel literatürdekilerle karşılaştırmaktır.
2. Kayıtlı ana klinik ve patolojik değişkenlerin tek değişkenli analizi yoluyla seçilen Irak popülasyonunu mesane tümörü ile karakterize etmektir.
3. İki değişkenli bir analiz yoluyla incelenen değişkenle (nüks, tümör ilerlemesi ve kansere özgü sağkalım) ilişkisini gösteren değişkenleri bilmek.
4. İnvazif olmayan moleküler belirteçlerin tanısal kullanımını araştırdığını iddia eden denemelerin değerlendirilmesiyle piyasada bulunan tümör belirteçlerinin performans özellikleri.
5. Monoklonal antikora dayalı yeni tümör markörünü incelemeyi amaçlayan mevcut araştırma, mesane kanserinin spesifik bir antijeninin erken tespiti için basit, hızlı ve invazif olmayan bir test olarak tanımlanmıştır.

6. Seçilen alanda sitolojiye kıyasla yeni geliştirilmiş bir tümör markörü olarak Mesane Tümörü Markerini (BTM) değerlendirmenin amacıdır.
7. Bu çalışma, mesane kanserinde gen ekspresyonu imzaları üzerine giderek artan bir çalışma kitlesine katkıda bulunmaktadır. Veriler, mesane kanserinde osteopontin için önemli bir rolü desteklemekte ve daha fazla araştırmaya değer birkaç yolu tanımlamaktadır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Irak Popülasyonunda Mesane Kanserinin Erken Saptanması

3.1. Çalışmanın popülasyonu

Medikal şehir Eğitim Hastanesi Arşiv Servisi tarafından ICD-10 sınıflandırmasına göre mesane tümörü olarak kodlananlardan oluşan taburculuk raporlarının kodlanmasıyla yapılan hastane kayıtlarından ilk kez mesane tümörü tanısı alan hastalar. Bu çalışma, Mart 2020'den Temmuz 2020'ye kadar 1 yıllık bir süre boyunca 101 prostat işgal eden mesane tümörü vakasının retrospektif Beş çalışmasıdır. Çalışma süresi boyunca Musul'daki Al-khansa Eğitim Hastanesi Nineveh sağlık departmanındaki üroloji Mesane kanseri erken teşhis merkezinde toplanan istilacı prostat mesanesinin tüm tümörlerinin tespit edilmesinden oluşuyordu.

a) Dahil Edilme Kriterleri:

- invaziv mesane kanseri nedeniyle takip edilen hastalar
- CPT ile tedavi edilen hastalar
- prostat istilası
- ilişkili bir prostatik ADK'nin tesadüfen keşfiyle birlikte mesane kanseri

b) Hariç Tutma Kriterleri:

Bunlardan, tekrarlanan geçmişler, çalışılan süre boyunca çeşitli kabuller için elenir. Mesane tümörünün teşhis edildiği tarih, mesanenin ilk transüretal rezeksiyonunun tarihi olması, görüntüleme çalışmaları ile teşhis edilen tüm hastaların, çeşitli nedenlerden dolayı, çok az istisna dışında, ameliyat edileceğinin anlaşılmasıyla, Hastanın komorbiditesi, transüretal rezeksiyon yapılmaz ve tanısal testin gerçekleştirildiği tarih belirlenir. Geçmiş yıllarda mesane tümörü tanısı alan veya çalışma sağlık alanına dahil olmayan tüm hastalar kayıt defterinden çıkarılır.

c) Verilerin toplanması:

Araştırmacı, Epidemiyolojik, klinik, paraklinik, anatomopatolojik ve terapötik verileri belirlemek için Ninova sağlık departmanı Al-khansa Eğitim Hastanesi üroloji hizmeti düzeyinde hasta dosyalarından yararlanmaya devam etmiştir. Takip verileri, hizmet için ayrılmış klinik kayıtlardan ve hastaların veya ailelerinin telefon görüşmelerinden toplandı.

d) Verilerin analizi:

Tablolar ve grafikler Excel 2010 ve Word 2010 hesap tablosu kullanılarak elde edildi.

e) Özgeçmiş veriler:

Epidemiyolojik özellikler sorgulama yoluyla toplandı ve yaş, cinsiyet, tarih, sigara kullanımı ve işlevsel belirtilerle ilgiliydi.

f) Fizik muayene:

Tüm hastalarımızın tam bir klinik muayenesi yapıldı.

g) Ameliyat öncesi değerlendirme:

Hastalarımızın biyolojik muayeneleri ve radyolojik incelemeleri yapıldı. Hastalarımızın hepsinde kan sayımı, böbrek fonksiyonu ve idrar sito-bakteriyolojik incelemesi yapıldı, ve tüm hastalarımıza abdomino-pelvik ultrason ve abdomino-pelvik bilgisayarlı tomografi (BT) taraması yapıldı (Benedetto, 1976).



Şekil 3.1. Seminal ve prostat yağını infiltre eden erken mesane tümörü (Benedetto, 1976)

Hastaların% 14.28'ine intravenöz ürografi (IVU) yapıldı. Son olarak, tüm hastalarımıza göğüs röntgeni çektirildi.

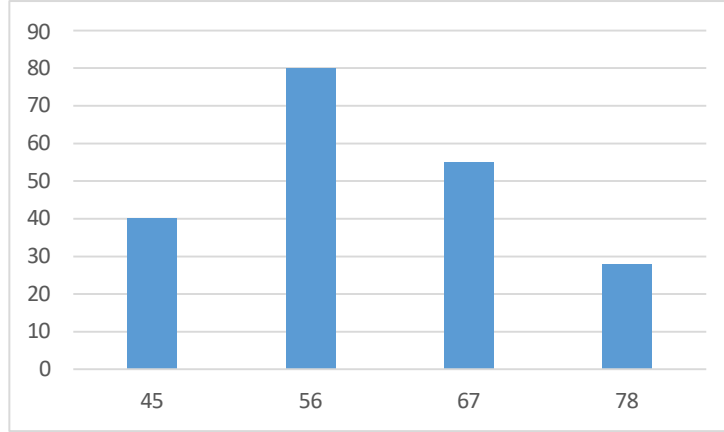
h) Patoloji verileri:

TNM sınıflandırması, T ön eki, mesanenin transüretal rezeksiyonunun patolojik sonucunu belirtmek için kullanıldı. Ve radikal sisto-prostatektomi kısmının patolojik sonucunu ifade etmek için ön ek PT.

3.2. Elde edilen veriler

Çalışma popülasyonunun tanımı:

Yaş: Sistoprostatektomi sırasında 101 hastanın ortalama yaşı 40 olup, 48 ila 65 yıl arasında değişen aşırı derecede.

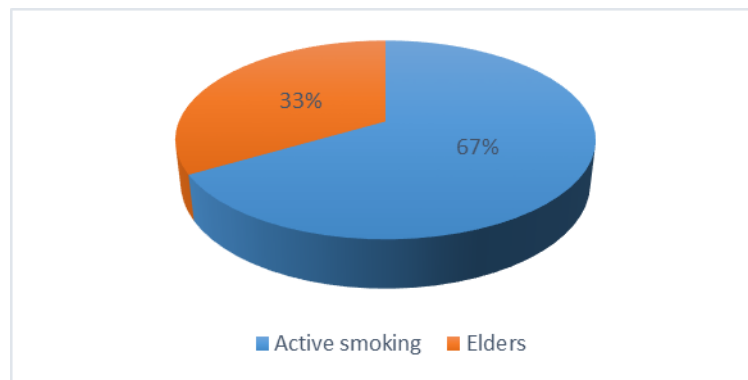


Şekil 3.2. 101 hastanın yaşa göre % dağılımı

Mesane kanseri ile ilişkili 4 prostat kanseri vakası bulduk (% 19). Çoğu yaşları 50 ila 65 yaş arasında.

3.2.1. Risk faktörleri

Sigara: Tütün, hastaların çoğunda bulunan ilk risk faktörü olmaya devam etmektedir. Serimizdeki hastaların tamamı sigara içiciydi (% 100), 70 hasta aktif sigara içiciydi ve 31 kişi daha önce sigara içiyordu ve sigara içme süresi 1 ila 10 yıl arasında değişiyordu, sigara içme süreleri 10 ila 50 yıl arasında değişiyordu. Yılda ortalama 30 paket ile. (10-60 paket-yıl) (Gonzalez , 1983).



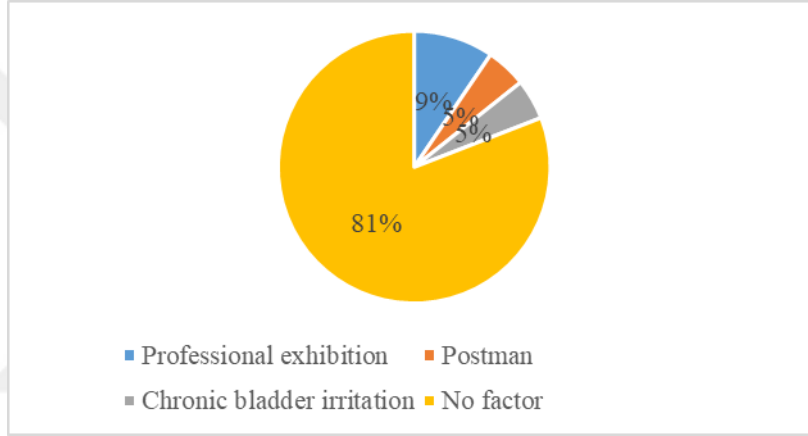
Şekil 3.3. 101 hastada sigara içme profili

Derneğin 20 vakasında tütün aynı zamanda ana risk faktörü idi. Sigara içme süresi ortalama 30 paket / yıl ile 10 ile 35 yıl arasında değişmektedir.

b) Diğer faktörler:

101 hastamızda ortaya çıkan diğer risk faktörleri (J. Ferris et al, 2013):

- 10 hastada mesleki maruziyet (% 9.5): bir hasta matbaada çalışıyordu ve bir hasta mesleği gereği (deri endüstrisi) bir zanaatkardı.
- Genetik faktör: bir hastanın mesane kanseri olan bir babası vardı.
- Bir hastada kronik mesane tahrişi vardı: mesane taşları.



Şekil 3.4. Hastaların diğer risk faktörlerine göre dağılımı (J. Ferris et al, 2013)

Risk faktörü olarak genetik faktörü taşıyan hasta 4 prostat kanseri vakası arasında yer aldı.

3.3 Analiz

3.3.1. Görüşme süresi

Ameliyat edilen 101 hastadan% 97.6'sı 4 ay (> 16 hafta) sonra konsültasyona başvurdu, semptomların başlangıcı ile konsültasyon arasındaki gecikme (klinik gecikme) 6 buçuk ile 1 yıl buçuk arasında değişiyor.

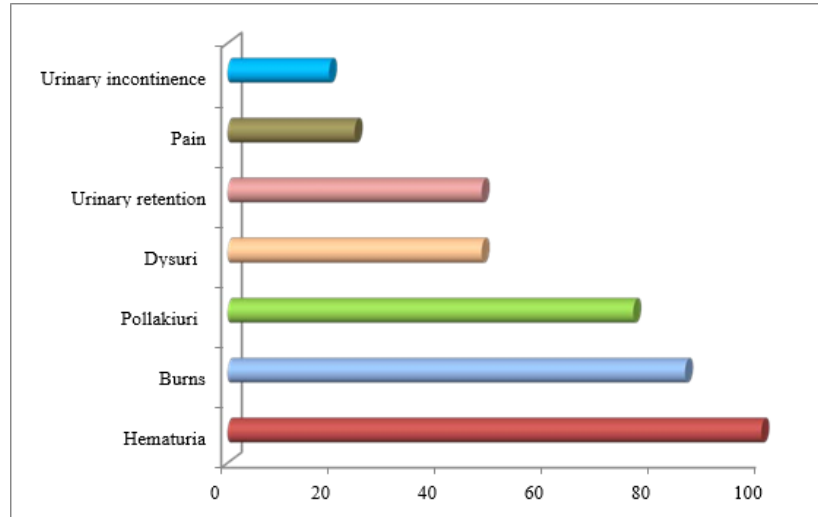
Geçmiş: Aşağıdaki tablo hastalarda bulunan geçmişini göstermektedir:

Çizelge 3.1. Hastaların geçmişine göre dağılımı

Geçmiş					
Tıbbi Geçmiş			Cerrahi Geçmiş		
Geçmiş	Numara	%	geçmiş	Numara	%
diyabet	29	28.5	apandis ameliyatı	5	4.8
HTA	33	33.3	VB liyazisi	5	4.8
Pulmoner TBK	5	4.8	Mesane liyazisi	5	4.8

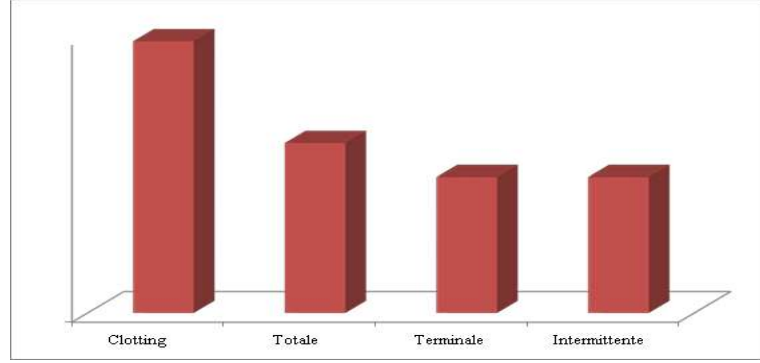
3.3.2. Fonksiyonel işaretler

Makroskopik hematüri ana semptomdu ve en çok temsil edilen semptomdu ve tüm hastalara danışmaya yol açtı. Bulunan diğer belirtiler polakiüri (% 76), işeme yanıkları (% 85.7), dizüri (% 47.6), pelvik ağrı (% 23.8), genel durumda kötüleşme (% 14.28), idrar retansiyonu (% 47.6) ve idrar kaçırmadır (% 19) (N. İsmaili, 2017).



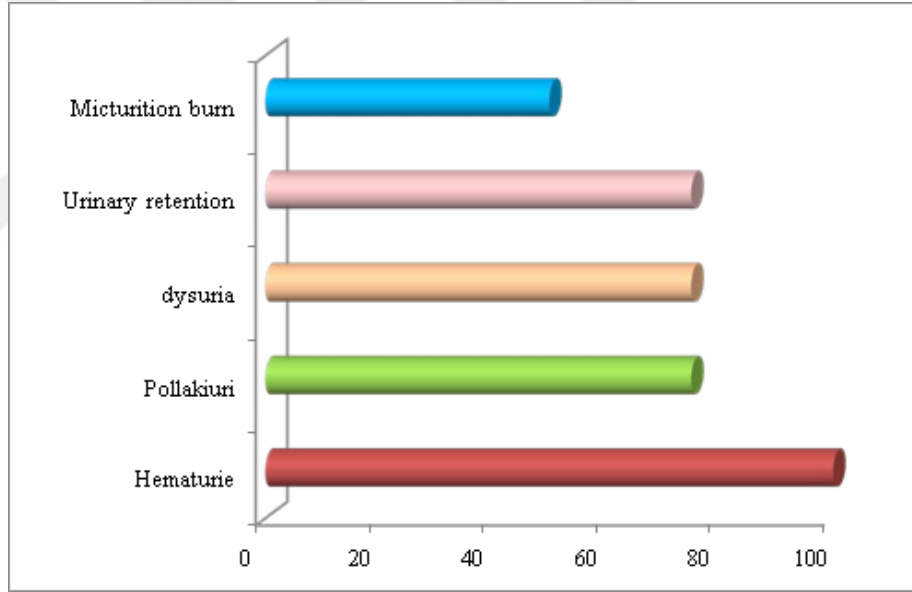
Şekil 3.5. Tüm hastalarda farklı fonksiyonel belirtilerin sıklığı (N. İsmaili, 2017)

Hematüri daha sık total ve pıhtılaşma idi.



Şekil 3.6. 101 hastada hematüri karakteri

- İlişkinin olduğu vakalarda hematüri de ana semptomdu. Aşağıdaki şekil, bu vakaların sunduğu klinik tabloyu açıklamaktadır:



Şekil 3.7. Prostat kanseri ile ilişkili hastaların klinik tablosu

3.3. Fizik Muayenenin Sonuçları

a) 101 hastada, dijital rektal muayene 59 hastada veya % 57'sinde mesane tabanının infiltrasyonunu, 10 hastada (% 9.5) hipogastrik kitle, 5 hastada (% 4.8) hepatomegali ve 10 hastada (% 9.5) kasık lenfadenopati saptandı. 39 hastada veya % 38'inde prostat

anormallikleri bulundu, bunların 24'ü prostat büyümesi, sadece bir hastada prostatik nodül ve 10 hastada prostat endüasyonu vardı.

b) 43 hastada (% 42,8) lomber hassasiyet, 34 hastada lomber temas saptandı.

c) 2 kanserin birlikteliği olan 19 vakada, 2 hastada (% 50) baz infiltrasyonu ortaya çıktı.

d) Dijital rektal muayenede ayrıca 1 hastada prostatik sertleşme, 2 hastada hacim artışı ve tek hastada bir nodül tespit edildi.

3.4. Paraklinik Muayeneler

3.4.1. Tanı amaçlı ek muayeneler

a) Biyolojik veriler

Anemi, 10 g / dl'nin altında veya buna eşit hemoglobinemi olarak tanımlanmıştır. 21 hastada (% 52,3) 11 hastada (% 52,3) ve böbrek yetmezliğinde serum kreatininin 8 hastada (% 38) 15 mg / l'den fazla olduğu saptandı.

İdrarın Sitobakteriyolojik incelemesi (CBEU) tüm hastalarda mikroskopik hematüri ve 5 hastada (% 23,8) idrar yolu enfeksiyonu gösterdi.

PSA seviyesi 8.9 ile 30 ng / ml arasında değişmiştir.

İlişkilendirilen 4 hastada tüm vakalarda anemi ve 1 vakada böbrek yetmezliği nesnelleştirildi. Ortalama PSA seviyesi 8.9 ng / ml idi ve oran 14 ile 30 ng / ml arasında değişiyordu.

b) Ultrason verileri:

Tüm hastalarımıza ultrason yapılır. Mesane tümörü 5 hastada (% 23.8) kalınlaşma ve 16 hastada (% 76.19) tomurcuklanma veya polip olarak tanımlandı ve 18 hastada

hidronefroz, 15 hastada bilateral veya (% 83.3) ve 3 hastada tek taraflı olarak tanımlandı veya (% 16.6).



Şekil 3.8. Mesane teşhis cihazı (Nishizuka , 2005)

Prostat tüm hastalarda büyümüş, 5 hastada (% 23,8) kalsifiye olarak tanımlanmıştır.

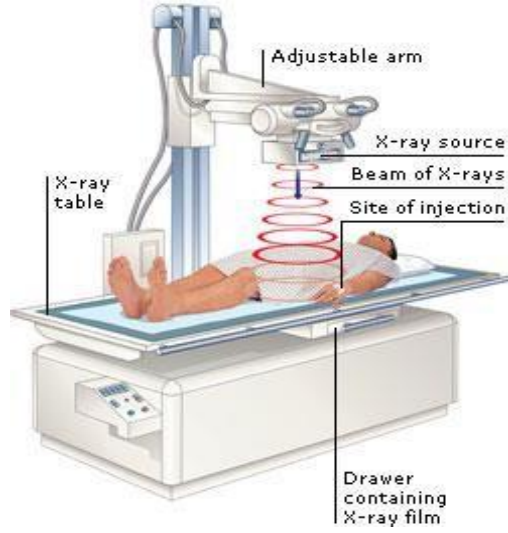
Serimizdeki en yaygın tümör yerleşimi mesanenin sağ yan duvarıdır (% 80) ve tabanla birlikte sol yan duvar tümör yerlerinin% 20'sini temsil etmektedir.

- Kombinasyonlu hastalarımıza 4 vakanın hepsine ultrason yapıldı ve tüm hastalarda mesane tümörü polip veya tomurcuklanma olarak tanımlandı. bir hastada prostat büyümüştü.

3 hastada bilateral üretero piyelokalis genişlemesi 1 hastada tek taraflı olarak saptandı.

c) İntravenöz ürografi (IVU)

Yeterince büyük bir mesane tümörü durumunda, tipik olarak kısmi duvar sertliği ile bir boşluk görüntüsü gösterir.



Şekil 3.9. Pek ultrason ve tarayıcının gelişiyle bu yana yapılmıştır. (Nishizuka , 2005)

Serimizde, biri mesane kanseri ile prostat kanseri ilişkisi olan 3 hastaya (% 14,28) İVU uygulandı. Üç vakada bilateral üretero-hidronefroz ile ilişkili düzensiz tomurcuklanan laküner bir görüntü göstererek tanıyı mesane tümörüne yönlendirdi.

3.4.2. Uzantının değerlendirilmesi

a) Tarayıcı verileri: BT taraması, duvar kalınlaşması ile intravezikal tomurcuklanma gösterdiği tüm hastalarda gerçekleştirildi.



Şekil 3.10. Doppler cihazı (Nishizuka , 2005)

- 20 hastada (% 95,23) tek veya iki taraflı üreteral piyelokalis genişlemesi saptandı.
- Tüm hastalarda perivesikal yağ infiltrasyonu saptandı.

- Seminal vezikül invazyonu 3 hastada veya % 14.3 oranında bulundu.
- Kalsifiye 17 hastada (% 80.95) prostat tümör süreci tarafından işgal edildi ve 5 olguda (% 23,8) büyümüş ve tümörle temas halindedir.
- Lenfadenopati 11 hastada (% 52.38) tespit edildi. Koltukları, dış ve ilkel iliak düğümleri ve iki taraflı aort arası ve kasık zincirlerini içeriyordu.
- Tek hastada pelvik üreterin infiltrasyonu.
- 2 hastada hepatik ve pulmoner metastaz bulundu.
- İlişki vakaları için, bilgisayarlı tomografi (BT) taraması 4 hastaya yapıldı ve 3 kitle veya kalınlaşmaya karşı tomurcuklanma nesneleştirildi. 4 hastada prostat büyümüş ve kireçlenmişti. Dört hastada perivesikal yağ infiltre edildi ve 3 hastada seminal vezikül, 2 hastada lenfadenopati saptandı.

b) Abdominopelvik ultrason

Gösterdiği serimizdeki tüm hastalarda yapılır:

- Prostat büyümesi ve heterojen görünüm ile mesane tümörü süreci.
- Vakaların çoğunda üreterohidronefroz (% 95,23).
- Bir hastada (% 4.8) metastazı düşündüren görünüm ile 2 hastada (% 9.52) hepatik anjiyomu düşündüren görünüm.
- 2 hastada (% 9.52) düşük miktarda periton efüzyonu.

c) Göğüs röntgeni (Göğüs x-ray):

Göğüs röntgeni, nesneleştirdiği 21 vakada çekildi:

- 2 hastada nonspesifik nodül (% 9,52).
- Tek hastada iki adet çok sınırlı yuvarlak opasite (% 4.8).

d) Kemik sintigrafisi:

Sadece bir klinik çağrı noktası durumunda gösterilir. Şüpheli salgınlar, geleneksel radyoloji veya en iyi ihtimalle MRI ile kontrol edilecektir. Şüphe devam ederse, CT altında rehberli biyopsi ponksiyonu son çare olarak düşünülmelidir.



Şekil 3.11. Hastayı muayene etme yöntemi (Nishizuka , 2005)

Serimizde 2 hastada (% 9,52) yapılmış, kemik anormalliği gösterilmemiştir. (Nishizuka , 2005)

3.5. Verilerin İrdelenmesi

3.5.1. Epidemiyoloji

3.5.1.1. Mesane kanserinden insidans ve mortalite

Test edilen mesane kanseri, tüm kanser vakalarının % 7 ile % 8'ini oluşturur. İnsanlarda 4. kanser ve 2. ürolojik kanserdir. Ürotelyal karsinom vakaların% 82.4'ünü temsil etmektedir. Dünya çapında mesane kanseri, en sık teşhis edilen 11. kanserdir. Her yıl 108.000 ölümle teşhis edilen 275.000 vaka var. Mesane kanseri insidansı ve ölüm oranları, farklı risk faktörleri, hızlı yönetim ve tedavinin mevcudiyeti nedeniyle ülkeden ülkeye değişir. Mesane kanseri genellikle kasın infiltrate olmayan bir aşamasında teşhis edilir. Vakaların sadece % 20'si sızma aşamasında teşhis edilir ve % 5'i hemen metastatiktir (Nishizuka , 2005).

3.5.1.2. Kas infiltre mesane tümörü (TVIM) tarafından prostat bezinin invazyonu insidansı

Çalışmalara göre, patoloji analizinden sonra ürotelyal karsinom tarafından prostat istilasının keşfi, CPT parçalarının % 25 ile 48'ini ilgilendirdi. İlgili ilk mekanizma, prostat kanallarının ve daha sonra prostatik stromanın istilası ile prostatik üretradan bitişik istiladır. Bahsedilen diğer mekanizma, prostatik stromanın ekstravezikal uzanım yoluyla istila edilmesidir, aslında, pT4a evresinin lokal olarak ilerlemiş bir mesane tümörüne karşılık gelir. Literatürde total sistoprostatektomi (CPT) sonrası prostat bezinin kas infiltratif mesane tümörü (TVIM) tarafından invazyon insidansı (Gladellet al, 2017).

Serimizde prostat kanseri görülme sıklığı % 19 idi, bu oran birçok seride bildirilenden daha düşüktür ve şu şekilde açıklanabilir: histolojik inceleme tekniği ve kesitlerin kalınlığı ile batı ülkelerine göre insidans farkı.

Önceki raporlar, mesane kanseri olan hastalarda birlikte ortaya çıkan prostat kanseri riskinin genel popülasyona kıyasla daha yüksek olduğunu göstermektedir. Chun için, invazif mesane tümörü olan hastalarda prostat kanseri prevalansı, hastalığın genel prevalansından 19 kat daha yüksekti ($p < 0.01$).

Bu farklı çalışmalar arasındaki uyumluluk bize, mesane kanserli hastalarda önemli ölçüde artan prostat kanseri insidansı hakkında bir tahminde bulunur, ancak kesinlik vermez ve ayrıca CPT kısmının anatomopatolojik çalışması gittikçe daha dikkatli ve ayrıntılı hale gelir. Daha sonra bu vakada gerçek bir artış olduğuna inanmaya başlarız. Bazıları bunu cilt ve kolon kanserinden sonraki ikinci çift malignite olarak kabul etmiştir.

3.5.2. Ortalama tanı yaşı

Çift maligniteli vakalar ile sadece mesane kanseri olan vakalar arasında büyük bir yaş farkı gözlenmedi.

3.5.3. Risk faktörleri

3.5.3.1. Tütün

Ana risk faktörü sigara içenler arasında riski 2-4 kat artırarak sigara içmektir. Sigara içme riski günlük sigara sayısına ve özellikle de süresine bağlıdır. Sigara dumanının solunması, mesane tümörlerinin% 30-40'ında doğrudan rol oynamaktadır. Tütünle ilgili bu kanserolojik risk, 43'ü kanserojen olarak kabul edilen 3500'den fazla kimyasal maddeden oluşan solunan dumandaki mesane kanserojenlerinin varlığı ile ilgilidir (Durduxet al ,1998).

Serimizde hastalarımızın% 100'ü sigara içen veya eski tütün kullanıcısıdır. Yılda ortalama 30 paket ile.

3.6.3.2. Karsinojenler

Tütün önemli bir rol oynamasına rağmen, çevrede ve işyerinde belirli kanserojen maddelere maruz kalma ile ilişkili riskleri maske olmamalıdır. Bu kanserojenler esas olarak endüstriyel kökenlidir. Boyama, kauçuk ve metalurji endüstrilerinde kullanılan başlıca aromatik aminler, hidrokarbon ve alanin türevleri olmak üzere 200'den fazla maddeden şüpheleniliyor. Tüm bu mesleki zehirlenmeler mesane tümörlerinin % 18 ile 34'ünden sorumludur. Serimizde iki hasta mesleki maruziyetle ilgili bir risk faktörü sundu (deri endüstrisi ve baskı).

3.6.3.3. Diğer faktörler:

Granülomatöz mesane enflamatuvar fenomeni yoluyla şistozomiyaz, Afrika'nın endemik bölgelerinde artan skuamöz hücreli karsinom insidansından sorumludur. Kronik veya tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları, kateterizasyon ve mesane taşlarının varlığı, mesane tümörü riski ile ilişkilidir. Diyabetin de bir risk faktörü olduğuna inanılıyor ve İdrar yolu enfeksiyonu (İYE) için bir predispozan faktör olarak kalır. Siklofosfamid gibi, 6 ile 13 yaş arası gecikmeli mesane tümörleri geliştirme riskini 6 kat artıracak bazı riskli idrar eliminasyon ilaçları da vardır. Pelvik radyasyon tedavisi de mesane tümörlerinin nedeni olabilir. Serimizde 6 hasta diyabetik vardı. Bir hastada kronik mesane tahrişi vardı (calculus) (Hong *et al* , 2005).

3.5.4. Patoloji

3.5.4.1. Makroskopik görünüşü

Mesane tümörlerinin makroskopik yönü endoskopi sırasında ve ayrıca parçanın tedavisi sırasında patolog tarafından belirlenir (Bouchot , 2002).

Aşağıdaki karakterler belirtilmelidir:

- Görünüş: Papiller, tomurcuklanma, ülser, ülseratif tomurcuklanma veya infiltrasyon;
- Genel Merkezi.
- Boyut.
- Tek veya çoklu odak
- Sayı.
- İmplantasyon tabanı: taban ne kadar genişse, infiltrasyon riski o kadar büyüktür.

3.5.4.2. Histolojik tipi

Histolojik olarak, aşağıda listeleyeceğimiz farklı mesane kanseri türleri ayırt edilir (Belasla , 2014).

- Mesane tümörlerinin% 90'ından fazlasını temsil eden ve alt tiplere ayrılan epitelyal tümörler;
- Ürotelyal veya para-malpighian karsinom olarak da adlandırılan geçiş hücre tümörleri (epitelyal tümörlerin % 75 ila 90'ı), dereceleri ve evreleri ile karakterize edilen ve vakaların % 60'ından fazlasında papiller karsinom olarak kabul edilen;
- Epid Skuamöz hücreli karsinomlar (% 5), en sık olarak üriner bilharziasis, kalıcı kateterizasyon veya mesane taşları öyküsü ile bağlantılıdır;
- Adenokarsinomlar (% 1);
- Farklılaşmamış karsinomlar.
- Epitelyal olmayan tümörler, nadiren: sarkomlar ve lenfomalar
- İkincil tümörler (özellikle rektum, yumurtalık ve hatta prostat kanserlerinin ikincil yerleri).

Bizim serimizde transizyonel karsinom en sık görülen histolojik tipti, vakaların % 95.23'ünde ve sadece bir adenokarsinom vakasında bulundu.

3.5.4.3. Tümör evresi

Tümör infiltrasyonu aşamasında (Coulange, 1977):

- Ana risk jeneralize kanserden ölümdür
- Spesifik sağkalım: Perivesikal yağa ulaşan ve aşan VT için 5 yılda % 30'dan az.

Bir CPT parçası üzerinde TVIM tarafından prostatın neoplastik invazyonunun keşfi nadir değildir, ancak bu durum anatomopatolojik analizin kalitesine bağlı olarak

çalışmalara göre değişiklik göstermektedir. Prostat bezinin TVIM tarafından istila edilmesi ciddi bir durumdur (pT4a) ve kötü prognoza sahiptir.

Serimizde sadece T4 evresini inceledik

3.5.4.4. Tümör derecesi

Nüks, tümör ilerlemesi ve hayatta kalmayı tahmin etmeyi mümkün kılar:

- Yüksek dereceli tümörler için nüks ve ilerleme riski, düşük dereceli tümörlere göre daha yüksektir.
- Yerinde karsinom, TV ile ilişkili ise kötü prognoz faktörüdür.

3.5.4.5. Tümörün görünümü

Bu korelasyon tümör infiltrasyonunun derecesi ile bağlantılıdır, papiller tümörler genellikle katı tümörlerden daha az invaziftir. Katı tümörler, vakaların % 70'inde III. Derece olduğu için derece ile de bağlantılı olacaktır.

Tümörün sağlamlığının zayıf prognostik önemi, hayatta kalma açısından doğrulanmıştır.

3.5.4.6. Sızan tümörün boyutu

Özellikle 3 cm'ye eşit veya daha büyük görünüyorsa, tekrarlama riskinde artış getirdiği bilinmektedir.

35.4.7. Tümörün lokalizasyonu

Hidronefrozu retral kanalların invazyonu ve böbrek fonksiyonunu etkilemesi, genellikle kötü prognoz faktörü olan önemli derecede infiltrasyonun tanığıdır (Benchekroun , 2003).

4. SEÇİLMİŞ BİYOBELİRTEÇLER ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

4.1. Malzemeler

4.1.1. Biyobelirteçler

E.N-2 hariç tüm belirteçler rekombinant insan proteinleridir (Linnet *al* , 2005).

- CD.H-1 (Kadherin 1)
- E.G.F.R (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)
- E.N-2 (Engrailed-2)
- Er.bB-2 (Epidermal büyüme faktörü için Reseptör 2)
- G.L.-6 (interlökin 6)
- I.L-8 (interlökin 8)
- I.L-10 (interlökin 10)
- M.M.P-9 (Matris metaloproteinaz 9)
- P.T.G.S-2 (Prostaglandin-endoperoksit sentaz 2) (AA 1-604)
- P.T.G.S-2 (AA 187-425)
- P.T.G.S-2.
- V.E.G.F (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü)

4.1.2. Örnekler

Çalışma dönemi boyunca, Musul'daki Al-khansa Eğitim Hastanesi Ninova sağlık departmanındaki Mesane kanseri erken teşhis merkezinden alınan idrar örnekleri.

4.2. Antikor

4.2.1. Antikor Yakalama:

IgG'li tüm antikorlar: Anti-C.D.H-1; Anti-E.G.F.R ; Anti-Er.bB-2; Anti-I.L-6 , Anti-I.L-8 , Anti-I.L-10 , Anti-M.M.P-9 , Anti-P.T.G.S-2 ve Anti-V.E.G.F

Algılama Antikorlar: Biotinlenmiş antikorlar gibi: Anti-C.D.H-1, Anti-E.G.F.R , Anti-Er.bB-2 ,Anti-I.L-6 , Anti-I.L-8, Anti-I.L-10, Anti-M.M.P-9, Anti-P.T.G.S-2 , Anti-V.E.G.F

Konjuge olmayan tespit antikorları: Anti-E.N-2 ve Anti-P.T.G.S-2 (Kopparapuet *al* , 2013).

İkincil Antikorlar:

- ✓ Alkalın fosfataza konjuge antikorlar:
- ✓ Anti-tavşan IgG'si (poliklonal, keçilerde gelişen)
- ✓ Anti-tavşan IgG (farelerde geliştirilen monoklonal klon R.G-96)
- ✓ Yaban turpu peroksidazına konjuge antikorlar:
- ✓ Anti-fare IgG'si
- ✓ Anti-tavşan IgG'si
- ✓

Diğer Reaktifler

4.2.2. Çözücüler, kimyasal reaktifler ve diğer ürünler

- Sigma-Aldrich'ten sığır serum albümini (B.S.A)



Şekil 4.1. Sigma-Aldrich'ten

- BCIP / NBT kullanıma hazır çözüm



Şekil 4.2. BCIP / NBT

- Tampon çözeltisi
- Horseradish streptavidin peroksidaz birleşmiş.
- Alkalın fosfataz konjuge streptavidin
- Biotin- (dT) 16-C6-NH2 oligonükleotid dizisi
- T.M.B için Reaktifi Durdurma
- SciCOLOR T2 Scienion kolorimetrik geliştirme çözümü
- T.M.B Sıvı Yüzey Sistemi
- Normal insan idrarı

4.2.3. Tamponlar

Prob biriktirme yastıkları:

- 2X AXO Bilim Sabitleyici Tamponu (0.1 M sodyum asetat, 0.1 M potasyum klorür);
- Bromofenol mavisi



Şekil 4.3. Bromofenol mavisi

- Fosfat tamponlu salin



Şekil 4.4. Fosfat tamponlu salin

4.2.3. Destekler

- TKL AXO Bilim Yapışkan
- Greiner Bio-One dipsiz 96-oyuklu plakalar
- • Bilimsel ısı 96 oyuklu düz tabanlı plakalar, şeffaf

4.3. ELISA Kitleri

Tüm ELISA kitleri, insan proteinlerinin saptanması için tasarlanmıştır.



Şekil 4.5. ELISA Kitleri

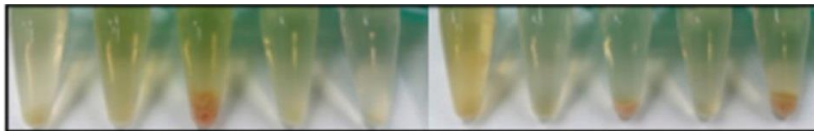
Kullanılan kitler AP1M2'dir; BIRC5; CD44; C.D.H-1; DCN; E.G.F.R; E.N-2 ve Er.bB-2 (HER2).

4.4. Yöntemler

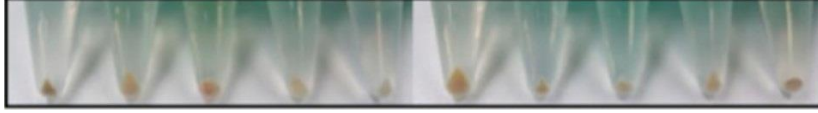
Çeşitli immünolojik testler gerçekleştirilmiştir. Testlerin çoğu sandviç formatındadır.

İlk bölüm, ELISA kitleri ile gerçekleştirilen klasik immünolojik testlerle ilgilidir.

İkinci bölüm, çeşitli destekler üzerinde çok parametrelili ve otomatik immünolojik testler için geliştirilen yöntemleri açıklamaktadır.



Şekil 4.6. İdrar Örnekleri



Şekil 4.7. Çöktürülmüş sonra

4.5. Genel prensip

Kullanılan tüm ELISA kitleri, aynı İmmünolojik test tipi prensibine dayanmaktadır, sağlanan mikrotitrasyon plakaları, yakalama antikorlarının kaplanması için bir aşamadan geçmiştir. Her bir kit ayrıca analiz için gerekli tüm reaktifleri içerir. reaktifler kullanılarak üreticinin talimatlarına göre hazırlandı ve seyreltilmiştir.

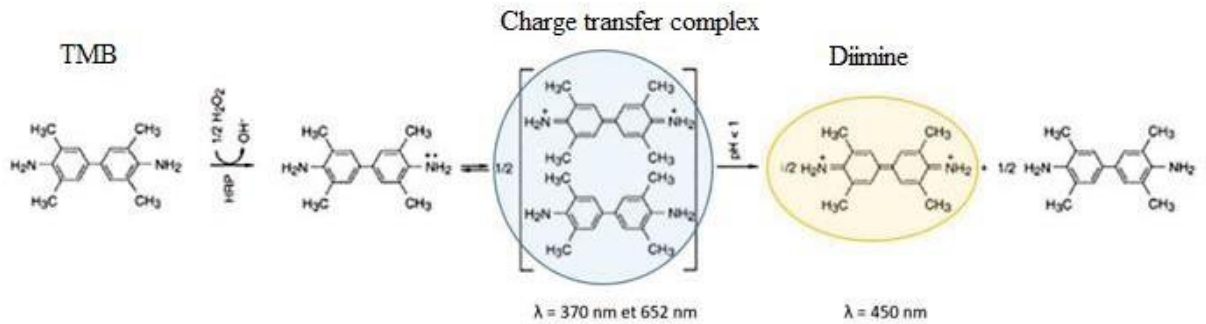
Testler, analiz edilecek örnek sayısına bağlı olarak özgürlük-100 pipetleme makinesi ile gerçekleştirildi. İkincisi, mikrotitre plakalarını ve kapaklarını hareket ettirmek için bir manipülatör koluna, solüsyonları rezervuarlardan emme ve çıkarma yoluyla plakaya aktarmak için bir pipetleme koluna ve plakaları kuluçka için bir ısıtma bloğuna sahiptir. Cihaz aynı zamanda kuyuların durulanması için bir yıkama istasyonu ve bir plaka okuyucu ile bağlantılıdır.

Plaka pipetleme makinesine yerleştirildikten sonra, protokol bu nedenle tamamen otomatiktir. Aşağıdaki adımları içerir: idrar örnekleri ve seyreltici mikrotitre plakasına aktarılır (her biri 50 μ L, toplam 100 μ L / kuyulu). İnkübasyon parametreleri kitlere göre değişir: oda sıcaklığında veya 37 ° C'de 30 dakika ile 2,5 saat. Biotinlenmiş tespit antikor çözeltisi daha sonra inkübe edilir (100 μ L / kuyulu, 30 dakika veya 1 saat, oda sıcaklığında veya 37 ° C'de), daha sonra yaban turpu peroksidazı ile etiketlenmiş streptavidin çözeltisinin inkübasyonu vardır (100 μ L / kuyulu, 30 dakika veya 1 saat, oda sıcaklığında veya 37 ° C'de). Son olarak, TMB substratının eklenmesi (50 μ L ile 100 μ L / kuyulu, 10 ile 15 dakika, oda sıcaklığında ve ışıktan korunmuş) kolorimetrik sinyalin üretilmesine izin verir. Enzimatik reaksiyon daha sonra 0.2 M, pH 1.5 (50 μ L ile 100 μ L / kuyulu) konsantrasyonunda bir sülfürik asit çözeltisi eklenerek durdurulur.

Protokolün her adımı arasında ve TMB eklenene kadar, yakalanmayan molekülleri çıkarmak için kuyuların PBS (3 x 300 µL / kuyulu) ile yıkanması gerçekleştirilir. Markörler seçildikten sonra, bunların saptanması için çok parametrelili bir immünolojik test platformu geliştirilir. Bu platforma tek bir seçilen işaretçi entegre edilmemiştir. E.N-2 işaretçisi gerçekten de doğrudan modda kendi parametrik olmayan immünolojik testine sahiptir. İlk adım, polistiren plakaların kuyu diplerinin idrar numunesi ile kaplanmasıdır (50 µL PBS / kuyulu içinde seyreltilmiş 50 µL). Böylece numune oda sıcaklığında iki saat inkübe edilir. Daha sonra yaban turpu peroksidazıyla etiketlenmiş tespit antikorlarının çözeltisi eklenir (Tampon içinde 1.5 µg / ml konsantrasyonda, 100 µL/kuyulu, oda sıcaklığında 30 dakika). Son olarak, TMB substratının eklenmesi (100 µL / kuyulu, 10 dakika, oda sıcaklığında ve ışıktan korumalı) kolorimetrik sinyalin üretilmesine izin verir. Enzimatik reaksiyon daha sonra bir sülfürik asit çözeltisi (50 µL / kuyulu) eklenerek durdurulur. Protokolün her adımı arasında ve TMB eklenene kadar, yakalanmayan molekülleri çıkarmak için kuyuların PBS (3 x 300 µL / kuyulu) ile yıkanması gerçekleştirilir.

4.5.1. Sinyal Üretimi ve Analizi

Kolorimetrik sinyal, TMB'nin oksidasyonunu katalize eden yaban turpu peroksidazı tarafından üretilir. Bu reaksiyon iki aşamada gerçekleşir: ara ürün, mavi bir yük aktarım kompleksidir. Sülfürik asit ilavesi, reaksiyonun durdurulmasına ve aynı zamanda mavi oksidasyon ürününün sarı bir türeve (diimine) dönüştürülmesine izin verir (Landman *et al* , 1998).



Şekil 4.8. Sinyal Üretimi ve Analizi (Landman *et al* , 1998)

Sarı rengin yoğunluğu Infinite® M200 plaka okuyucu kullanılarak ölçülür. Absorbans 450 nm 'lik bir dalga boyunda okunur. Optik yoğunluğun bir fonksiyonu olarak protein konsantrasyonu kalibrasyon eğrileri daha sonra oluşturulur. Bu eğriler 4 parametre ile lojistik regresyon ile ayarlanır.

Aşağıdaki denklem kullanılır:

$$y = a + \frac{(d-a)}{1+(x/c)^b}$$

a, b, c ve d modelin parametreleri olduğunda, x açıklayıcı değişkene (protein konsantrasyonu) ve y yanıt değişkenine (optik yoğunluk) karşılık gelir. A ve d parametreleri asimptot parametreleridir (sırasıyla minimum ve maksimum). B parametresi eğime ve c parametresi koordinatı (a + b) / 2 olan eğimin orta noktasının parametrelerine karşılık gelir.

Ayarlanan eğri daha sonra ters formülü kullanarak idrar örneklerinin protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılır:

$$x = c \left(\frac{a-d}{y-d} - 1 \right)^{1/b}$$

4.5.2. Multipara metrik immunoanalizler

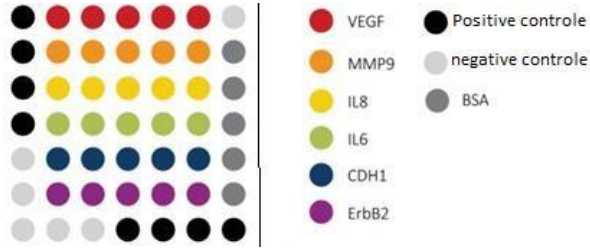
Protein çipi iki destek üzerinde geliştirildi: geliştirme, yapışkan tabanı olan 96-kuyulu bir mikrotitre plakası ile başladı ve ardından geliştirmenin ikinci kısmı, polistiren tabanlı bir 96-kuyulu mikrotitrasyon plakası ile yapıldı. Hazırlık yöntemleri ve protokoller, iki destek için benzerdir. Farklılıklar aşağıdaki bölümlerde detaylandırılmıştır.

4.5.2.1. Çipleri hazırlamak

Çizim matrisleri, sciFLEXARRAYER S3 temassız biriktirme makinesi kullanılarak mikrotitre plaka kuyularının dibinde yapılmıştır. Yapışkan tabanlı plakalar için, TKL

yapıştırıcısı, probalar yerleştirilmeden önce dipsiz 96 kuyulu bir plakaya monte edilir. Problar önceden hazırlanmış ve 384 kuyulu bir plakaya yerleştirilmiştir. Bir biriktirme tamponunda seyreltilirler: 2X hareketsizleştirme tamponu, yapışkan bir tabanı olan bir plaka üzerinde immünoanalizler için kullanıldı ve scion sciSPOT Protein tamponu, bir polistiren bazlı bir plaka üzerinde immünolojik testler için kullanıldı. Kalıplama daha sonra otomatik bir probun 384 kuyulu bir plakaya örneklenmesi ve önceden tanımlanmış ve doğru koordinatlarda desteğe çok küçük damlaların atılmasıyla gerçekleştirilir.

Her pedin ortalama hacmi 350 pL'dir ve tüm pedler birbirinden 400 µm aralıktır. Yakalama antikor grafiklerine ek olarak, her matris pozitif kontrol grafikleri içerir: 50 µM konsantrasyonda biriktirme tamponunda seyreltilmiş biotin- (dT) 16-C6-NH₂ oligonükleotidler. Biotin varlığı, immünolojik test sırasında streptavidin etiketli enzim ile etkileşime izin verir. Matris ayrıca, reaktiflerin belirli spesifik olmayan etkileşimlerini tanımlamak için negatif kontrol pedleri (biriktirme tamponunun su içinde seyreltilmesi) ve sığır serum albümini grafikleri (biriktirme tamponunda 0.5 mg / ml konsantrasyonda seyreltilmiş çözelti) içerir.



Şekil 4.9. Kuyunun dibine yerleştirilmiş bir matris örneği.

Kontrol ve B.S.A grafikleri haricinde, tüm grafikler belirtilen proteinlere yönelik yakalama antikorlarına karşılık gelir.

Kalıplar üretildikten sonra, plakalar kullanılana kadar 4 ° C'de saklanır.

4.5.2.2. Immunoassay Protokolleri

Sandviç tipi çok parametrelı immünolojik testler, Freedom EVO® 75 pipetleme makinesi ile gerçekleştirildi. Burada açıklanan protokol bu nedenle tamamen otomatiktir ve aşağıdaki adımları içerir:

Kuyucuklar önce Tampon ile doyurulur (200 µL / kuyucuk, 10 dakika, 37 ° C'de). Doygunluk, spesifik olmayan etkileşimleri en aza indirir. Numune (kalibrasyon proteini veya hasta idrar numunesi) ve biyotinlenmiş tespit antikorları daha sonra tek bir adımda (25 µL numune ve 50 µL antikor solüsyonu / kuyusu, 2 saat boyunca 37 ° C'de) inkübe edilir. Daha sonra enzim ile etiketlenmiş streptavidin inkübasyonu vardır: Yapışkan tabanlı bir plakadaki immünoanalizler için alkalın fosfataz ve polistiren bazlı bir plaka üzerindeki immünolojik testler için yaban turpundan peroksidazdır. Her iki tip immünolojik test için, enzim etiketli streptavidin 2 µg / mL konsantrasyonda kullanılır ve 100 µL çözelti, kuyucuk başına 37 ° C'de 30 dakika inkübe edilir. İnsan idrarında hazırlanan kalibrasyon proteinleri dışındaki tüm çözeltiler Tamponda hazırlanır.

Son adım, kolorimetrik sinyalin oluşturulması için substratın inkübasyonuna karşılık gelir. Kullanılan substrat, yapışkan arkalıklı bir plaka üzerinde immünolojik testler için BCIP / NBT ve polistiren arkalıklı bir plaka üzerinde immünolojik testler için sciCOLOR T2'dir (TMB içerir). Her iki immünolojik test türü için substrat kullanıma hazır bir solüsyondur ve her kuyucuğa 100 µL solüsyon inkübe edilir. BCIP / NBT için inkübasyon 37 ° C'de 30 dakika, sciCOLOR T2 için oda sıcaklığında 15 dakika sürer. Protokolün her aşaması arasında, yakalanmayan molekülleri çıkarmak için kuyuların P.B.S (3 x 300 µL / kuyu) ile yıkanması gerçekleştirilir. Polistiren tabanlı bir plakta immünolojik testler için, sciCOLOR T2 inkübasyonundan sonra yıkama olmaz, sadece solüsyonun aspirasyonu yapılır. Protokolün sonunda, görüntülerin alınmasından önce kuyular kurutulur (65 ° C'de 10 ile 15 dakika).

4.5.2.3. Sinyal üretimi ve analizi

Arkası yapışkanlı bir plaka üzerindeki immünoanalizler için kolorimetrik sinyal, BCIP'nin defosforilasyonunu katalize eden alkalın fosfataz tarafından üretilir. Bu şekilde oluşan ara ürün NBT tarafından oksitlenir. Daha sonra iki çözünmeyen ürün oluşur. Bu nedenle, iki reaksiyon ürününün kombinasyonu, üretim pozisyonunda, yani alkalın fosfataz ile işaretlenmiş pedlerde mavi-mor bir çökelti oluşturur. Polistiren tabanlı bir plaka üzerindeki immünolojik testlerle ilgili olarak, kolorimetrik sinyal, TMB'nin oksidasyonunu katalize eden yaban turpu peroksidazı sayesinde üretilir ve enzimle işaretlenmiş pedler seviyesinde mor bir çökelti oluşumuna izin verir. Protokolün sonunda, plakalar, her bir kuyunun görüntülerinin alınması için CLAIR plaka okuyucuya aktarılır. Bu görüntüler daha sonra, 0 ile 255 rasgele birim arasında değişen bir gri tonlama ölçeği kullanarak her bir grafiğin yoğunluğunu ölçen AXOware yazılımı tarafından analiz edilir. Her bir sonda için, yoğunluk daha sonra aşağıdaki formül ile düzeltilir:

$$\text{yoğunluk} = \left(\frac{(255 - \text{sondanın gri seviyesi}) - (\text{BSA'nın yerel gri seviyesi}) + 1}{\text{pozitif kontrolün okal gri tonlaması} - \text{pozitif kontrolün yerel gri tonlaması}} \right) \times 100$$

Sondanın gri seviyesi, bu sondanın saplamalarının gri seviyelerinin ortalamasına karşılık gelir. B.S.A kontrolünün yerel gri seviyesi, kuyudaki B.S.A pedlerinin ortalama gri seviyesine karşılık gelir ve pozitif kontrolün yerel gri seviyesi, kuyunun pozitif kontrol pedlerinin ortalama gri seviyesine karşılık gelir. Beyaz oyukların ortalaması, testin beyaz oyuklarındaki (protein ilavesiz normal insan idrarı içeren) sonda pedlerinin gri seviyelerinin ortalamasına karşılık gelir. Düzeltilmiş yoğunluğun bir fonksiyonu olarak protein konsantrasyonu kalibrasyon eğrileri daha sonra oluşturulur. Bu eğriler, 4 parametre ile lojistik regresyon ile ayarlanır ve idrar örneklerinin protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılır.

4.6. Sonuçlar ve Tartışma

Çok sayıda çalışma, sistoskopiye alternatif olarak idrar belirteçlerinin potansiyelini göstermiştir. Bununla birlikte, şu anda idrar sitolojisi veya sistoskopinin yerini alacak veya en azından bu takip muayeneleri arasındaki aralığı artıracak kadar etkili bir belirteç bulunmamaktadır. Bu nedenle, teşhis performansını iyileştirebilmek için, birkaç işaretleyiciyi bir panelde birleştirerek çoklu bir yaklaşım seçtik. Bu projenin çalışması iki bölümden oluşmaktadır: ilk adım, bir panel oluşturmak için işaretlerin seçilmesinden oluşur ve ikinci adım, panelin saptanması ve miktarının belirlenmesi için çok parametrelili bir immünolojik test platformunun geliştirilmesiyle ilgilidir (Morganet al , 2013).

4.6.1. Mesane kanseri için biyobelirteç seçimi

Üriner biyobelirteçlerin seçimi için iki çalışma yapılmıştır, birincisi, pilot çalışma, mesane kanseri teşhisi için belirteçlerin seçimine yöneliktir ve birinci panelin tanımlanmasına yol açarken, ikinci çalışma, mesane kanseri nükslerinin saptanması için belirteçlerin seçilmesini amaçlamaktadır.

4.6.1.1. Pilot alışma

Bu ilk çalışma iki aşamadan oluşmaktadır: belirteçler önce llebilirlikleri ve az sayıda örnekten saptanabilirlikleri açısından değerlendirildi, ardından ikinci bir değerlendirme, mesane kanseri için belirli belirteçlerin seçiciliğini belirlemeyi mümkün kıldı.

4.6.1.1.1 Değerlendirilecek belirteçlerin tanımlanması

Aday belirteçler, mesane kanseri literatürünün veri madenciliği yoluyla oluşturulmuş moleküler bir mesane kanseri modeli seçildi. Veriler, mesane kanserinin "omik" alışmalarından, yani transkriptomik, proteomik ve metabolomik çalışmalarından elde edilmiştir (Lehmannet al , 2009).

Bu moleküler model TVNIM ile ilgilidir ve 520 protein içerir. Bu proteinler arasında, mesane kanseri ile olan ilişki sayılarına göre 16 markör seçildi. Modelin bir parçası olmayan diğer dört belirteç de mesane kanseri ile bir bağlantı olduğuna dair bilimsel literatürde güçlü kanıtlar sundukları için seçildi. 20 aday belirteçleri Tablo 4-1'de listelenmiştir. Aday belirteçlerin belirlenmesinin ardından bunlar iki aşamada değerlendirildi.

4.6.1.1.2. İlk Değerlendirme

20 aday belirteç, mesane kanseri hastalarından ve sağlıklı donörlerden alınan idrar örneklerinde değerlendirildi. İlk olarak belirteçlerin ölçülebilirliği değerlendirildi. Gerçekte idrar, analiz yöntemi üzerinde, özellikle pH'ı, tuzların ve proteinlerin varlığı ile olumsuz bir etkiye sahip olabilen karmaşık bir biyolojik matristir. Bu ölçülebilirlik Tablo 4-1'de açıklanmaktadır. Her bir işaretleyici için, ELISA kitinin seyrelticiinde bir kalibrasyon aralığı ve insan idrarında bir kalibrasyon aralığı oluşturulmuştur.

20 ELISA tahlilinden dördü, idrarda hedeflerini tespit etmedi. Bunlar, aşağıdaki belirteçler için dozajlardır: CD44, AP1M2, C.D.H-1 ve Er.bB-2.

Seyrelticide bu deneyler için bir kalibrasyon aralığı oluşturulmuş olduğundan, idrardaki hedeflerin tespit edilmemesinin, hedefin veya antikorun biyolojik matris tarafından denatürasyonundan kaynaklanması mümkündür.

Çizelge 4.1. İdrar örneklerinde belirteçlerin ilk değerlendirmesi

Marker	Calibration range in the diluent	Calibration range in urine	Detection limits (urine) **	Detection of marker in patient samples
AP1M2	+	-	N/A	-
BIRC5	+	+	200 pg/mL	-
CD44	+	-	N/A	-
CDH1	+	-	N/A	-
DCN	+	+	25.9 pg/mL	+
EGFR	+	+	0.1 ng/mL	+
EN2	+	+	NA	+
ErbB2	+	-	N/A	-
FBLN3	+	+	> 3.12 ng/mL	+
FGFR3	+	+	> 250 pg/mL	-
IL8	+	+	0.1 ng/mL	+
MMP9	+	+	0.222 ng/mL	+
MYC	-	+	1 ng/mL	+
p53	+	+	2.5 ng/mL	-
PTGS2	+	+	2.5 ng/mL	+
RARB	+	+	0.625 ng/mL	-
TMOD1	+	+	1.25 ng/mL	-
UPK3A	+	+	100 pg/mL	+
VEGF	+	+	0.0625 ng/mL	+
VIM	+	+	28.1 ng/mL	-

+, bir kalibrasyon eğrisi veya işaretçi tespiti varlığı

-, kalibrasyon eğrisinin olmaması veya N / A işaretinin saptanmaması, uygulanamaz

* E.N-2, ELISA kiti ile tespit edilemedi ancak direkt mod immünolojik test ile tespit edildi

** Tespit sınırları, kalibrasyon eğrileri üzerinde grafik olarak belirlenmiştir.

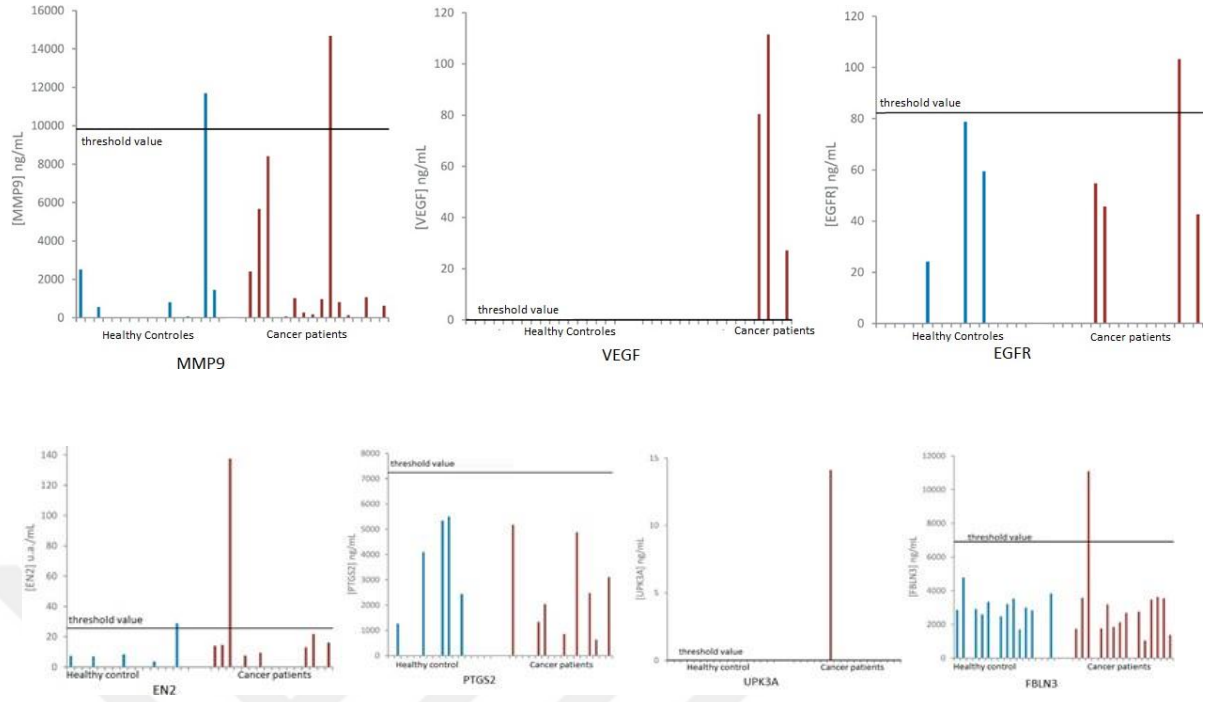
Fizibilite çalışmasının amacı, mesane kanseri olan hastalardan alınan idrar örneklerinde belirteçlerin saptanabilirliğini de değerlendirmektir. İdrarda ölçülebilirliği gösteren 16 testten 10'u hedeflerini hastaların idrarında tespit etti (Tablo 4-1): M.M.P-9, E.N-2, V.E.G.F, E.G.F.R, I.L-8, DCN, MYC, UPK3A, P.T.G.S-2 ve FBLN3. Diğer 6 test için

belirteçlerin saptanmaması, idrar örneklerinde bulunan in vivo proteinden farklı olabilen kalibrasyon proteininin özelliklerinden kaynaklanabilir (McGrath , 2007).

4.6.1.2. İkinci Değerlendirme

Böylece ilk değerlendirme sırasında on işaretçi önceden seçildi: M.M.P-9, E.N-2, V.E.G.F, E.G.F.R, I.L-8, DCN, MYC, UPK3A, P.T.G.S-2 ve FBLN3. Daha sonra mesane kanseri teşhisi için ilgilenilen belirteçleri belirlemek için mesane kanseri hastalarından 16 numunede ve sağlıklı vericilerden 16 numunede ikinci bir değerlendirme aşaması geçirdiler (Mahnken , 2005).

Elde edilen işaretlerin konsantrasyonları Şekil 4-2'de sunulmuştur. Dozu doğrudan mod immünolojik test olan E.N-2 markörü dışında ELISA kitleri kullanılarak belirlendi (kalibrasyon aralığı hasta idrar numunesi ile belirlenir, elde edilen konsantrasyonlar rastgele birimler halinde verilir). Daha sonra her numunenin idrar kreatinin düzeyine göre normalize edildi. Her işaretçi için bir eşik değeri hesaplandı. Standart sapmasının üç katına eklenen sağlıklı vericilerden alınan numunelerin konsantrasyonlarının ortalamasına karşılık gelir. Bu formül, sağlıklı vericilerin % 99,7'sinin eşik değerin altında olmasını mümkün kılar (Gogalicet *al* , 2015).



Şekil 4.10. Mesane kanseri hastaları ve sağlıklı vericilerden alınan örneklerdeki işaret konsantrasyonları (Gogalicet *al* , 2015)

Değerlendirilen on belirteç arasında, sekizi en az bir pozitif hasta örneğine, yani eşik değerinin üzerinde bir belirteç konsantrasyonuna sahiptir. Bu belirteçlerin üçü için (V.E.G.F, DCN ve UPK3A), protein sağlıklı vericilerden alınan örneklerde tespit edilmedi ve sonuç olarak sıfır eşik değeri elde edildi. Böylece bu üç belirteç için,, belirteç konsantrasyonu sıfırdan büyük olan herhangi bir hasta numunesi pozitif olarak kabul edilir. Diğer dört belirteç (M.M.P-9, I.L-8, MYC ve E.N-2), eşik değerin üzerinde bir belirteç konsantrasyonuna sahip sağlıklı bir verici örneği sunar. Bu numuneler bu nedenle yanlış pozitif olarak kabul edilir. Son olarak, P.T.G.S-2, eşik değerin üzerinde bir konsantrasyona sahip (sağlıklı bir vericiden veya bir hastadan) numune sunmayan tek işaretleyicidir (Mahnken , 2005).

belirteçlerin tanısal performansı daha sonra PanelomiX yazılımı kullanılarak bir alıcı işletim özelliği (ROC) analizi ile değerlendirildi. OCR analizi, testin kendine özgü özelliklerini (duyarlılığı ve özgüllüğü) değerlendirerek, tanısal test gibi bir

sınıflandırıcının performansının bir ölçüsüdür. Bu şekilde elde edilen ROC eğrisi, farklı pozitiflik eşikleri için bir testin kendine özgü özelliklerinin grafik bir temsiliyi verir. Birkaç sınıflandırıcının karşılaştırmasını kolaylaştırmak için, ROC eğrisinin (A.U.C) altındaki alan hesaplanır. Bu, testin kendine özgü özelliklerinin özet bir istatistiğidir. Değeri 0,5 ile 1 arasındadır (veya% 50 ile% 100 arasındadır): A.U.C değeri 1, testin mükemmel bir şekilde ayırt edici olduğu anlamına gelirken, 0.5 değeri testin şanstan daha iyi olmadığı anlamına gelir.

Bu yöntemle elde edilen işaretlerin bireysel performansları Tablo 4-2'de açıklanmaktadır. Duyarlılık ve özgüllük değerleri, optimum eşik değeri için yazılım tarafından verilmektedir. M.M.P-9, 0.742 A.U.C,% 68.8 özgüllük ve % 86.7 duyarlılık ile en iyi iç özelliklere sahiptir. V.E.G.F ve DCN belirteçleri, yalnızca hasta numunelerinde tespit edildikleri için yüksek bir özgüllüğe (% 100) sahiptir. Ancak duyarlılıkları düşüktür (V.E.G.F için % 20 ve DCN için % 13.3). Son olarak, UPK3A belirteci bu analize dahil edilememiştir çünkü yalnızca tek bir örnekte tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. A.U.C değerine göre sınıflandırılan biyobelirteçlerin bireysel performansı

Marker pen	% A.U.C (95% CI)	% Sp (95% CI)	% Se (95% CI)
M.M.P-9	74.2 (56.0-92.3)	68.8 (43.8-87.5)	86.7 (66.7-100.0)
E.N-2	66.0 (47.8-84.3)	87.5 (68.8-100.0)	53.3 (26.7-80.0)
I.L-8	65.4 (48.9-81.9)	81.2 (62.5-100.0)	46.7 (20.0-73.3)
V.E.G.F	60.0 (49.5-70.5)	100.0 (100.0-100.0)	20.0 (0.0-40.0)
P.T.G.S-2	57.7 (38.7-76.7)	68.8 (43.8-87.5)	53.3 (26.7-80.0)
DCN	56.7 (47.8-65.6)	100.0 (100.0-100.0)	13.3 (0.0-33.3)
E.G.F.R	54.0 (38.5-69.4)	87.5 (68.8-100.0)	26.7 (6.7-46.7)
FBLN3	47.5 (26.1-68.9)	56.2 (31.2-81.2)	60.0 (33.3-86.7)
MYC	47.1 (36.5-57.7)	93.8 (81.2-100.0)	6.7 (0.0-20.0)

ROC eğrisinin altındaki alan; CI, güven aralığı; Sp, özgüllük; Se, hassasiyet

PanelomiX yazılımı ayrıca işaretleyici kombinasyonlarının performans değerlendirmesine izin verir. Yazarlar, biyobelirteçlerin ve eşiklerin yinelenmeli

kombinasyonunu (ICBT, biyobelirteçlerin ve eşiklerin yinelemeli kombinasyonu) kullanarak bireysel belirteç eşiklerine dayalı bir algoritma geliştirdiler. En verimli paneli belirledikten sonra yazılım, panel performansını ve modelin sağlamlığını test etmeyi mümkün kılan bir çapraz doğrulama gerçekleştirir. Bunu yapmak için çapraz doğrulama k-katlama tekniği kullanılır: orijinal örnek olarak adlandırılan veri seti rastgele olarak eşit büyüklükte ($k = 10$) 10 alt gruba (veya örneğe) bölünür. 10 numuneden dokuzu ($k-1$) model eğitim seti olarak kullanılırken, geri kalan örnek model doğrulama için kullanılır. İşlem 10 kez tekrar edilir, her numune bir kez doğrulama seti olarak kullanılır. Bu nedenle tüm markör kombinasyonları PanelomiX tarafından test edilmiştir (UPK3A markörü hariç). Performans açısından en iyi kombinasyon altı işaret içerir: Çapraz doğrulama sonrası 0,871 ve 0,810 A.U.C ile M.M.P-9, V.E.G.F, I.L-8, P.T.G.S-2, FBLN3 ve E.N-2 (Tablo 4.2).

4.6.1.3. İlk çalışma üzerine tartışma

Bu ilk çalışma, mesane kanseri olan hastalardan ve sağlıklı vericilerden alınan idrar örneklerinde birkaç aday belirtecin değerlendirilmesi sayesinde mesane kanseri tanısı için bir biyobelirteç paneli tanımlamayı mümkün kılmıştır. belirteçlerden oluşan bu BCPC iyi bireysel performans gösteren M.M.P-9 işaretleyici kıyasla daha üstün bir performansa sahiptir. Aslında, BCPC'nin A.U.C'si 0,865'tir (% 95 güven aralığı (% 95 CI) 0,727 ile 1,0) iken, M.M.P-9 0,742'lik bir A.U.C değerine sahiptir (0,560 ile 0,923 arasında % 95 CI). BCPC'nin duyarlılığı, M.M.P-9'a kıyasla azalmıştır (sırasıyla % 80.0 ve % 86.7). Bununla birlikte, bu klinik bağlamda en ilgili parametre olan özgüllük önemli ölçüde artmıştır (% 68,8'e kıyasla % 93,8). Çalışmanın küçük olması nedeniyle güven aralıklarının geniş olduğuna dikkat etmek önemlidir (32 örnek). Mesane kanserinde hasta takibi çok önemlidir çünkü IMDT'nin % 50 ile % 70'i olası kas infiltrasyonu ile birinci basamak tedaviden sonra tekrar eder. Böylece, ortaya çıkan biyo geliştirme şirketi ile işbirliği içinde, BCPC belirteçlerinin tümör ilerlemesini tahmin etme potansiyelini inceledik. Belirteçlerin tümör invazivitesindeki rolü, bu nedenle mesane kanseri için tanımlanan moleküler model ve belirteçlerin etki mekanizmalarına ilişkin bilimsel literatür araştırması kullanılarak değerlendirildi (Lokeshwaret *al* , 2000).

Bir çalışma, M.M.P-9 dahil olmak üzere matriks metaloproteinazların mikro ortamı değiştirmedeki ve tümör istilasını artırmadaki rolünü ve dolayısıyla bunların invazif mesane kanseri ile ilişkisini göstermiştir. Ek olarak, M.M.P-9'un aktivasyonu, EGF / E.G.F.R sinyal yollarının yanı sıra I.L-8'in ekspresyonunu içerir. Anjiyogenik aktivite ayrıca, V.E.G.F'nin ve tümör istilasını ve proliferasyonunu destekleyen VE.G.F.R1 / 2 reseptörlerinin ekspresyonunu içerir. Son olarak, P.T.G.S-2, anjiyogenezdeki rolü aracılığıyla mesane kanserinin gelişimi ve istilasını ile de bağlantılıdır. BCPC, invaziv ürotelyal tümörlerin gelişimi için yolların diyagramına dahil edilen dört işareti içerir: M.M.P-9, I.L-8, V.E.G.F ve P.T.G.S-2. Beşinci işaret olan E.N-2'nin invazivlikle belirgin bir bağlantısı yoktur, ancak mesane kanseri için umut verici bir belirteçtir.

Son olarak, E.G.F.R, BCPC'ye dahil edilmeyen invazivlik şemasında bulunan tek işarettir. panelin genel performansını artırmadığı için dahil edilmesi faydalı olmamıştır. Böylece, BCPC tümör istilasını tahmin etme potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, bu paneli tümör istilasını tahmin etmek için ve bir araca yönlendirmek için daha büyük numuneler üzerinde başka çalışmalar gereklidir. Bu ilk çalışma aynı zamanda idrarla ilgili sorunları da vurguladı. İlginç bir biyolojik belirteç kaynağı olmasına rağmen, alınan numuneler hacim, protein konsantrasyonu (özellikle böbrek yetmezliğinde) veya pH açısından büyük değişkenlik gösterebilir. Hastanın yaşı, sağlığı ve diyeti dahil olmak üzere birçok faktör idrar bileşimini etkiler. Ek olarak, numunelerin depolanması sırasında bozulmalar mümkündür (Gogalic et al, 2015). Proteomik çalışmaların sonuçları bu nedenle idrar numunelerini işleme yöntemlerine bağlı olarak değişebilir. Bu nedenlerden dolayı, bu tür bir çalışma için yöntemlerin standardizasyonu istenebilir. INCa, araştırma için idrar örneklerinin toplanması, paketlenmesi ve depolanması aşamalarının standardizasyonunu iyileştirmek için 2013 yılında öneriler yayınlandı.

Ayrıca, proteinlerin miktarının veya konsantrasyonunun, kreatinin veya albümin gibi böbrek tarafından atılan küçük moleküllerin konsantrasyonuna oranını hesaplayarak normalize edilmesi de sıklıkla tavsiye edilir. Bu nedenle, bu ilk çalışma sırasında elde edilen konsantrasyonları, her numune için daha önce ölçülen idrar kreatinin seviyesi ile normalleştirmeyi seçtik.

Son olarak, idrar numunesini seyrelterek tahliller sırasında bu matrisin girişimini sınırlandırmak mümkündür. Bu nedenle, immünolojik test protokolümüz, her test için kullanılan örnek hacmini sınırlamayı mümkün kılan bir ilk seyreltme adımını içerir. Ancak bu strateji, dozajların duyarlılığında bir azalmaya yol açabilir; tespit limitine yakın konsantrasyonlara sahip bazı işaretçiler tespit edilmemiş olabilir.

4.6.2. İkinci Çalışma

Mesane kanseri hastalarından alınan idrar örnekleri, sağlıklı vericilerden (kontroller) alınan idrar örnekleriyle karşılaştırılarak, pilot çalışmada mesane kanserinin yalnızca birincil tanısal yönü araştırılabilir (ancak tümör istilasının tahmin potansiyeli de değerlendirilmiştir). Bu pilot çalışmayı takiben, mesane kanseri bağlamında biyobelirteç seçiminin hedeflerini daha kesin olarak tanımladık. Mesane kanserinin doğal seyrini ve takipleri sırasında hastaların bakımını kişiselleştirme ihtiyacını dikkate alınarak, tekrarlayan mesane kanserli hastalardan ve monitörize edilmiş ancak nüks göstermeyen hastalardan alınan idrar örneklerini değerlendirerek bu ikinci çalışmanın ürotelyal tümör invazyonunun nüks (ve muhtemelen) risklerine doğru yönlendirilmesine karar verildi. Bu ikinci çalışmada toplam on dokuz belirteç değerlendirildi. Değerlendirilecek belirteçlerin seçimi birkaç faktöre dayanırdı: proje ortaklarından temin edilebilen testler, önceki çalışmanın sonuçları (BCPC'deki beş belirteç çalışmaya dâhil edilmiştir) ve belirteçlerin tekrarlayan mesane kanseri ile bağlantısı.

4.6.2.1. Çalışmanın tasarımı

Çalışmaya mesane kanseri olan iki hasta grubu dahil edildi: rekürrensli hastalar ve rekürrenssiz hastalar. Bu hastaların idrar örneklerinde on dokuz belirteç iki farklı platform kullanılarak ölçüldü: ELISA kitleriyle ve otomatik bir şekilde (pilot çalışmaya benzer) on iki markörü değerlendirdik. Daha sonra, iki platformun sonuçları ve hastaların klinik parametreleri dâhil olmak üzere çok değişkenli bir istatistiksel analiz gerçekleştirildi ve tekrarlayan mesane kanseri teşhisi için bir işaretler paneli ve klinik parametrelerin seçilmesine yol açtı.

4.6.2.2. Hasta seçim süreci

Çalışma başlangıçta 80 hasta örneğini içeriyordu (her grupta 40 örnek). İlk dahil edilme kriterleri aşağıdaki gibiydi: hastaya mesane kanseri teşhisi kondu (sistoskopi ve histopatolojik inceleme ile), hasta numune alınmadan önce tedavi edildi ve hastanın TVIM öyküsü yoktu. Bu nedenle numune, bir takip ziyareti sırasında toplandı. Bu ziyaret sırasında diğer klinik parametreler toplandı. Bu nedenle çalışma sırasında değerlendirilen klinik parametreler şunlardır: cinsiyet, tanı anındaki yaş, örnek toplama anındaki yaş, ilk tanı ile örnek toplama arasındaki ay sayısı, ilk tanı ile örnek toplama arasındaki BCG tedavilerinin sayısı, ilk tanı ile örnek toplama arasındaki mitomisin tedavilerinin sayısı ve ilk teşhis ile numune toplama arasındaki RTUV sayısı.

İstatistiksel analizden önce, ikinci, daha titiz bir hasta seçimi gerçekleştirildi. Bu nedenle eksiksiz bir hasta geçmişi mevcut olmalıdır (klinik parametre eksik değildir). Bu ek kriterlere dayanarak, ilk 80 hastadan 48'i dâhil edildi. Ek olarak, istatistiksel analize dahil edilen belirteçlerin tüm numuneler için geçerli ölçümlere sahip olması gerekiyordu. Bu nedenle, bu seçim sırasında diğer üç hasta dışlandı. Bu nedenle son kohort 45 hastadan oluşuyordu: 27 nüks olmayan hasta ve 18 nüksü olan hasta.

4.6.2.1.2. Sonuç Analizi

Verilerin istatistiksel analizi, acil biyolojik geliştirme ile gerçekleştirildi. Çok değişkenli analiz ile ilgili olarak, iki stratejiye göre çoklu doğrusal regresyon modelleri oluşturulmuştur: tek tek parametrelerin seçilme olasılığını belirlemek için LASSO yöntemini (En Az Mutlak Büzülme ve Seçim Operatörü) kullanarak bireysel parametrelerin ilişkisine ve otomatik seçimine dayalı manüel seçim. Modellerin performansı ve sağlamlığı, bir dışarıda bırakma çapraz doğrulama tekniği (LOOCV) kullanılarak çapraz doğrulama ile değerlendirilir.

4.6.2.3. Belirteçlerin tahlili

On dokuz belirteçten on ikisi, ELISA kitleri kullanılarak otomatik platformumuz tarafından değerlendirildi. Sonuçlar Çizelge 4.3 te özetlenmiştir. U.P.K.3.A için teknik bir zorluk nedeniyle tam analizi yapılamadığı için sonuç alınamadı (analiz sırasında 96 kuyulu plaka pipetleme makinesi tarafından hasar gördü). İdrarda kalibrasyon eğrileri F.B.L.N3 haricinde tüm diğer belirteçler için elde edilebilir. İkincisinin konsantrasyonları bu nedenle seyreltici içindeki kalibrasyon eğrisi aracılığıyla belirlendi. On bir geçerli testten üçü, idrar örneklerinde hedeflerini saptamadı (V.I.M, M.Y. C ve p53).

Çizelge 4.3. İkinci çalışmadan biyobelirteç tahlilleri

Marker pen	Calibration range in the diluent	Calibration range in urine	Detection limits (urine) **	Detection of marker in patient samples
BIRC5	+	+	1000 pg/mL	+
EN2	+	+	1.25 ng/mL	+
FBLN3	+	-	25 ng/mL (diluant)	+
FGFR3	+	+	1000 pg/mL	+
IL8	+	+	125 pg/mL	+
MMP9	+	+	666.7 pg/mL	+
MYC	+	+	1.25 ng/mL	-
p53	+	+	10 ng/mL	-
PTGS2	-	+	5 ng/mL	+
TMOD1	+	+	2.5 ng/mL	+
UPK3A	-	-	N/A	N/A
VIM	+	+	112.5 ng/mL	-

+, bir kalibrasyon eğrisinin veya işaretçi saptamanın varlığı; -, kalibrasyon eğrisinin olmaması veya işaret tespiti olmaması; N / A, uygulanamaz;

** Tespit sınırları, kalibrasyon eğrileri üzerinde grafik olarak belirlenmiştir.

Hasta seçim sürecine göre ve eksik değerlerin neden olduğu artefaktlardan kaçınmak için istatistiksel analiz için işaretlerden sadece üçü seçildi (I.L-8, M.M.P-9 ve FBLN3). Gerçekten de, her numune için mevcut olan sınırlı hacim nedeniyle, tüm numunelerde birçok işaret analiz edilememiştir. İstatistiksel analize dâhil edilen diğer işaretler, AIT protein çipi tarafından değerlendirilenlerdir. Bu nedenle, on dokuz ilk belirteçten on üçü istatistiksel analize dâhil edilebilir.

İki analiz tekniği arasındaki korelasyonu değerlendirmek için iki platform tarafından iki işaret (I.L-8 ve M.M.P-9) ölçüldü. I.L-8 için 0.83 ve M.M.P-9 için 0.70 Pearson korelasyon katsayısı ile iki belirteç için anlamlı derecede pozitif korelasyonlar gözlemlendi.

Çizelge 4.4. Parametrelerin bireysel performansı

Clinical parameter	Pr(> z)	AUC	Marker	Pr(> z)	AUC
<i>diagnostic sample</i>	0.42	0.5	DCN _{puce}	0.67	0.57
<i>sex</i>	0.89	0.51	VEGF _{puce} *	0.05	0.67
<i>age.diagnosis</i>	0.7	0.48	IL8 _{puce} *	0.08	0.69
<i>sample age</i>	0.45	0.57	CDH1 _{puce}	0.66	0.53
<i>grade.diagnosis (G2 / G3)</i>	0.32 / 0.48	0.57	IL6 _{puce}	0.65	0.48
<i>stage.diagnosis</i>	0.52	0.55	EN2 _{puce} *	0.09	0.65
<i>number of previous recurrences *</i>	0.08	0.63	EGFR _{puce}	0.86	0.53
<i>therapy.BCG *</i>	0.1	0.65	ErbB2 _{puce} *	0.06	0.73
<i>therapy.mitomycin</i>	0.49	0.54	MMP7 _{puce}	0.9	0.5
<i>nr.RTUV. previous *</i>	0.33	0.58	MMP9 _{puce}	0.72	0.58
			IL8 _{PA}	0.74	0.47
			MMP9 _{PA}	0.46	0.5
			FBLN3 _{PA}	0.54	0.52

* Klinik parametreler ve en iyi bireysel A.U.C, Marker biten markörleri protein çipi ile ölçüldü.

PA ile biten belirteçler otomatik platform tarafından ölçüldü. Tanı örneği, ilk tanı ile örneğin alınması arasındaki ay sayısı; yaş. Tanı, tanı yaşı; yaş. Örnek, örnek toplama sırasındaki yaş; derece. Tanı, tanı anındaki tümör derecesi; tanı aşaması, tanı anında tümörün aşaması; önceki nükslerin sayısı, ilk tanı ile numunenin toplanması arasındaki nükslerin sayısı; tedavisi. BCG, ilk tanı ile numune toplama arasındaki BCG

tedavilerinin sayısı; tedavi. Mitomisin, ilk tanı ile numune toplama arasındaki mitomisin tedavilerinin sayısı; nr.RTUV. Önceki, ilk tanı ile örneğin alınması arasındaki RTUV sayısı.

4.6.3. İdrar kesesi kanseri biyobelirteçlerinin miktar tayini

4.6.3.1. Giriş

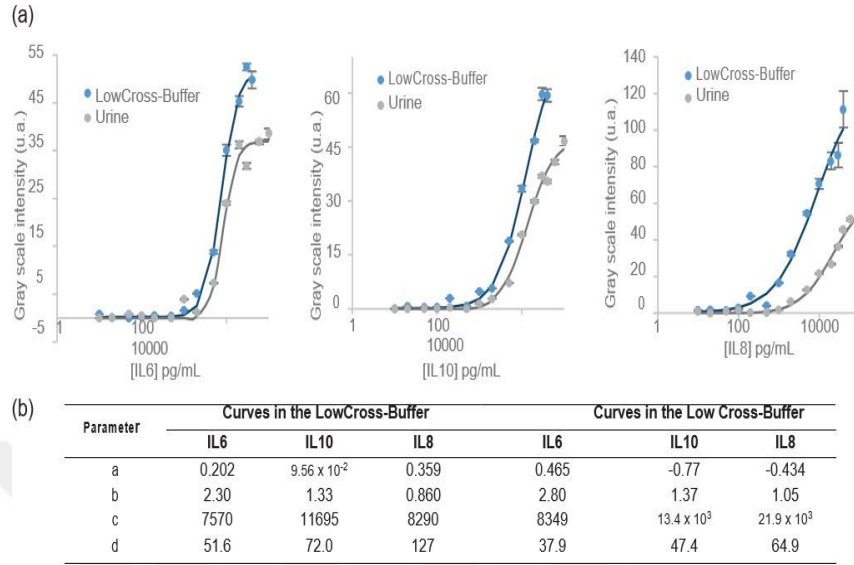
Projenin son amacı, mesane kanseri olan hastaların, özellikle üriner biyobelirteç profillerine göre bir tabakalaşma kavramı oluşturmaktır. Bunun için, seçilen biyobelirteçlerin kantifikasyonu için çok parametrelili bir test geliştirdik.

4.6.3.2. Kavramın ispatı

Böyle bir platformun uygulanabilirliğini göstermek için, üç rekombinant interlökinin kantitatif deneyi gerçekleştirildi. Bu nedenle, alt kuyu matrisleri, pozitif ve negatif kontrollere ve B.S.A'ya ek olarak, I.L-6, I.L-10 ve I.L-8 için yakalama antikorları içeriyordu. Test, önceki bölümlerde açıklanan protokole göre, özellikle I.L-6, I.L-10 ve I.L-8'e yönelik biyotinlenmiş antikorları içeren bir yakalama antikorları çözeltisi ile gerçekleştirildi.

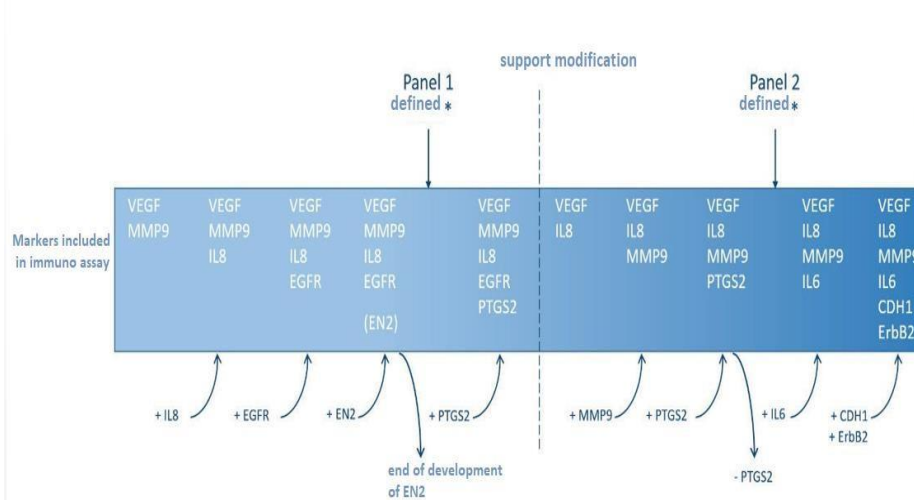
Kalibrasyon aralıkları bir seyreltici (Tampon çözelti) içinde ve ardından ilgili matriste oluşturulmuştur: insan idrarı (Şekil 4.4). Seyreltici ve insan idrarındaki üç interlökinin konsantrasyon aralıkları için elde edilen yoğunluklar, kullanılan protein konsantrasyonları aralığında platosu görülemeyen bir sigmoid eğri verir. Bu nedenle, biyolojik bir matris olarak insan idrarını kullanarak interlökin aralıklarını gerçekleştirmek mümkündür ve sonuçlar, Tampon çözeltisi ile elde edilenlere benzerdir. Bununla birlikte, kullanılan matrise bağlı olarak duyarlılıkta bir fark vardır. Bu, parametreleri optimize edilmemiş bir test olduğundan, idrardaki immünoanaliz duyarlılığı optimizasyon adımları ile iyileştirilebilir. Daha sonra ve aksi belirtilmedikçe, geliştirme sadece insan idrarı kullanılarak yapılacaktır. Genel olarak, birkaç protein için deneyler geliştirirken, analiz edilen her bir kuyucuk, tüm yakalama antikorlarını (grafik

matrisi) içerir ve tüm saptama antikorları, ancak yalnızca bir protein ile temas ettirilir. Spesifik çapraz reaksiyon testleri sırasında aynı oyukta birkaç protein analiz edilir.



Şekil 4.11. Kavramın ispatı. (a) I.L-6, I.L-10 ve I.L-8 kalibrasyon eğrileri (b) Düzeltilmiş eğri parametreleri. (Hata çubukları 8 ped standart sapmalarını temsil etmektedir. U.a., keyfi birim)

Şekil 4.3 çok parametrelili immünolojik testlerin geliştirilmesine genel bir bakış sunar. Bu, biyobelirteçlerin seçimi ve panellerin tanımlanmasıyla paralel olarak yapıldı. Bu nedenle, BCPC veya HCC'nin parçası olmayan bazı belirteçler hala immünolojik teste dâhil edilmektedir. Şekil 4.5 ayrıca geliştirme sırasında yapılan bir ortam değişikliğini gösterir. Gelişimin farklı aşamaları aşağıdaki bölümlerde detaylandırılmıştır.



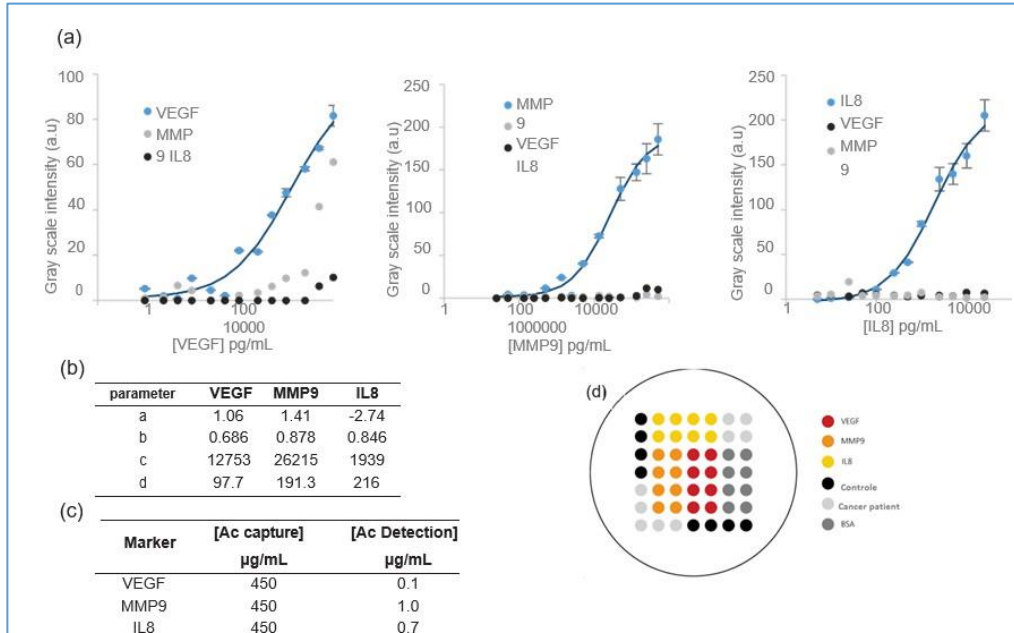
Şekil 4.12. Çok parametrelili immünolojik testlerin geliştirilmesine genel bakış

2. BCPC'nin Geliştirilmesi (PANEL-1)

Multiparametrik immünolojik testin gelişimi V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8 markörleri ile başladı ve ardından teste E.G.F.R markörü eklendi. BCPC daha sonra pilot çalışmanın ardından tanımlandı. Aşağıdaki işaretleri içerir: V.E.G.F, M.M.P-9, I.L-8, P.T.G.S-2 ve E.N-2. Böylece, immünolojik testin gelişimi, P.T.G.S-2 ve E.N-2 markörlerinin entegrasyonu ile devam etmiştir.

4.6.3.2.1 V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8'in kantifikasyonu için multipara metrik immünoassay

Şekil 4.13 V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8 markörlerini içeren çok parametrelili test tasarımının ana sonuçlarını açıklamaktadır. Üç protein için bir kalibrasyon eğrisi elde etmek mümkün olmuştur (Şekil 4.6). Saptama antikorlarının optimal konsantrasyonunu belirlemek için, sabit bir protein konsantrasyonu varlığında antikorların her biri için bir aralık yapılır. Saptama antikor konsantrasyonunun belirlenmesinin bir örneği aşağıda E.G.F.R.



Şekil 4.13. V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8'in kantifikasyonu için multiparametrik immünoassay. (a) Kalibrasyon eğrileri (b) Ayarlanmış eğri parametreleri (c)

Immunoassay koşulları (d) komplo matrisi Hata çubukları, 8 pedin standart sapmalarını temsil eder. Ac, antikor

4.6.3.2.2 Çapraz reaksiyon

Yukarıda sunulan eğriler, belirli çapraz reaksiyon türlerini değerlendirmeyi mümkün kılar. Aslında, analiz edilen plakanın her bir kuyusu bir protein konsantrasyonuna karşılık gelir: kuyu bu nedenle tek bir proteinle temas halindedir. Bununla birlikte, tüm yakalama antikorlarını içerir ve tüm tespit antikorları ile temas ettirilmiştir. Bu nedenle, çapraz reaksiyonların büyük bir çoğunluğunu, özellikle antijenlerin antikorlara spesifik olmayan bağlanmasını tespit etmek mümkündür. Bununla birlikte, bu konfigürasyon, proteinler arasında çapraz reaksiyonların değerlendirilmesine izin vermez.

V.E.G.F ile ilgili olarak, M.M.P-9 ve I.L-8 markörlerini yakalamak için antikor blokları seviyesinde bir sinyalin varlığına dikkat ediyoruz. Bu yoğunluk I.L-8 için oldukça düşüktür ve yalnızca en yüksek iki V.E.G.F. M.M.P-9 için yoğunluk yüksektir ve V.E.G.F konsantrasyonu arttıkça artar. Bu nedenle, V.E.G.F proteininin anti-M.M.P-9 yakalama antikorları ile etkileşime girmesi muhtemeldir. Benzer bir fenomen, anti-I.L-8 yakalama antikorları ile de mümkündür, ancak bu grafiklerin sinyal yoğunluğu çok düşüktür.

Bu çok parametrelili testin çapraz reaksiyonu, aynı kuyudaki birkaç protein tarafından verilen sinyal analiz edilerek yeniden değerlendirildi. Bu değerlendirme üç kısma bölünmüştür: her kısım için, üç proteinden birinin konsantrasyon aralığı gerçekleştirilirken diğer iki protein sabit bir konsantrasyonda mevcuttur (değerler histogramın çubuklarında görüntülenir). Bir karşılaştırma yapabilmek için, diğer iki proteinin yokluğunda her proteinin yüksek konsantrasyonu da değerlendirildi.

V.E.G.F'nin anti-M.M.P-9 ve anti-I.L-8 yakalama antikorları ile etkileşimi, V.E.G.F proteini tek başına ve yüksek konsantrasyonda olduğunda bu iki tip grafikte bir sinyalin varlığı ile doğrulanır (histogram a) hem de, anti-M.M.P-9 yakalama antikor

Çizimlerinde bir sinyalin varlığıyla, sadece V.E.G.F ve I.L-8 proteinleri ortalama bir konsantrasyonda mevcuttur (histogram b).

Bununla birlikte, ortalama bir konsantrasyonda (histogram c) yalnızca V.E.G.F ve M.M.P-9 proteinleri mevcut olduğunda anti-I.L-8 yakalama antikoru çizimlerinde spesifik olmayan bir sinyal yoktur. Bu nedenle, bu spesifik olmayan sinyal yalnızca yüksek V.E.G.F. konsantrasyonlarında mevcuttur.

Aynı yüksek I.L-8 konsantrasyonu için, sinyal yoğunluğunun diğer iki proteinin varlığına veya yokluğuna göre farklılık gösterdiğini not etmek ilginçtir. Aslında, I.L-8 tek başına olduğunda, I.L-8 sinyaline göre, V.E.G.F ve M.M.P-9 varlığında, sinyalde yaklaşık % 35'lik bir artış gözlenir (histogram c). Bu spesifik olmayan sinyal, V.E.G.F'nin anti-I.L-8 yakalama antikorumla ile spesifik olmayan etkileşimi ile ilgili olabilir. Ortalama bir V.E.G.F konsantrasyonu için, bu etkileşim düşük veya hatta sıfır I.L-8 konsantrasyonlarında görülmez veya neredeyse hiç görülmez, ancak yüksek I.L-8 konsantrasyonlarının varlığında vurgulanır.

4.6.3.2.3 Performans iyileştirme

Testlerin hassasiyetini etkileyebilecek parametrelerden biri, proteinlerin inkübasyon süresi ve antikorumların saptanmasıdır. Aslında, optimal inkübasyon süresi, reaksiyonun dengesinin elde edilmesine izin verir. Çok parametrelili immünolojik testin başlangıçta bir saatlik bir inkübasyon süresi vardı ve daha sonra iki saate çıkarıldı. İnkübasyon süresi daha uzun olduğunda, problemler ve hedefler arasındaki temas süresi artırılarak testin hassasiyeti artırılır. Ek olarak, algılama sınırları daha düşük görünmektedir. Maksimum sinyal gücü de M.M.P-9 için büyük lde artırılmıştır: değeri iki saatlik bir inkübasyon süresi için neredeyse üç katına çıkarılmıştır.

4.6.4. E.G.F.R İşaretleyicisini entegre etmek

Çok parametrelili teste yeni bir markörün entegrasyonu ile geliştirme devam etti: E.G.F.R. İkincisi, son BCPC'ye dahil edilmedi, ancak BCPC'nin tanımı, E.G.F.R entegrasyonu sırasında bilinmiyordu. Bu nedenle biyobelirteçlerin seçimi için pilot çalışmanın ön sonuçlarına göre seçilmiştir. E.G.F.R ve anti-V.E.G.F yakalama antikorları arasında, ikincisinin pedleri üzerinde bir sinyalin varlığı ile gösterilen bir çapraz reaksiyon mümkündür. Bununla birlikte, sinyal zayıf kalır ve yalnızca yüksek E.G.F.R. konsantrasyonlarında tespit edilebilir. Önceki belirteçlere benzer şekilde, saptama antikorlarının konsantrasyonu, sabit bir E.G.F.R konsantrasyonunda ikincisinden bir konsantrasyon aralığı yapılarak optimize edilmiştir. Daha sonra, sinyal yoğunluğunun en yüksek antikor konsantrasyonlarında (2 ve 1 µg / ml) maksimum olmadığı, ancak 0,7 µg / ml'ye kadar arttığı ve ardından azaldığı not edilir. Bu nedenle bir "tarama" etkisi vardır: yüksek konsantrasyonlarda poliklonal antikor fazladır ve antijeninin birkaç epitopuyla etkileşime girerek ikincisinin yakalama antikoru ile etkileşime girmesini önler. Bu nedenle, tespit antikorlarının optimum konsantrasyonu 0,5 µg / mL olarak tanımlanmıştır. Sonuçların önceki konsantrasyon olan 0,2 µg / mL ile karşılaştırılmasıdır.

Son olarak, bu dördüncü işaretleyicinin çok parametrelili teste eklenmesinin etkisi, üç işaretli bağışıklık tahlili ile V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8 için elde edilen sonuçların dört işaretli bağışıklık tahliliyle elde edilenlerle karşılaştırılmasıyla değerlendirildi. I.L-8 kalibrasyon eğrileri için birkaç farklılık gözlenirken, dört işaretli immünolojik test sırasında V.E.G.F için daha güçlü bir sinyal yoğunluğu gösterildi (bu, V.E.G.F sisteminin reaktiflerinden biri ile anti-E.G.F.R saptama antikoru arasındaki çapraz reaksiyona bağlı olabilir). M.M.P-9'a gelince, E.G.F.R markörünün entegrasyonundan sonra, özellikle hassasiyet kaybıyla sinyal yoğunluğu azalır. Son olarak, üç işaretli bağışıklık tahliliyle gözlenen V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8 ile ilgili çapraz reaksiyonlar, E.G.F.R işaretinin eklenmesiyle değiştirilmedi.

P.T.G.S-2 İşaretleyici Entegrasyonu

BCPC'nin son tanımını takiben, çok parametrelili teste entegre edilecek beşinci işaret P.T.G.S-2'dir. BCPC'nin bir parçası olmamasına rağmen, E.G.F.R işareti, sonuçlar tatmin edici olduğu için çok parametrelili testten hemen çıkarılmadı. P.T.G.S-2 işaretçisi, bir çift antikor (yakalama ve saptama) ve bir sandviç ELISA için tedarikçi tarafından doğrulanmış bir kalibrasyon proteini bulmanın mümkün olmadığı tek işarettir. Bu nedenle çeşitli reaktif kombinasyonları test edilmiştir. Seçilen yakalama antikor, ELISA'nın tedarikçi tarafından belirtilen olası uygulamalardan biri olduğu bir monoklonal antikordur. Bu yakalama antikor ile birkaç tespit antikor test edildi. İlk test edilecek poliklonal bir antikordur. Ancak sinyal alınamadı. Bu nedenle ikinci bir anti-P.T.G.S-2 saptama antikor test edildi. İkincisi biyotinlenmemiş olduğundan, saptama için alkaline fosfat ile konjüge edilmiş ikincil bir poliklonal antikor kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, P.T.G.S-2 için spesifik bir sinyal göstermedi. Tüm kuyucuklarda anti-P.T.G.S-2, anti-I.L-8, anti-M.M.P-9 ve anti-V.E.G.F yakalama antikor grafiklerinde aynı sinyaller gözlemlendi.

4.6.5.E.N-2 İşaretleyicisinin Özel Durumu

BCPC'de çok parametrelili immünolojik teste dâhil edilecek son işaret E.N-2'dir. Bu nedenle, ayrı bir doğrudan modlu tek parametrelili immünolojik test geliştirdik. Ancak bu immünolojik test, bir E.N-2 proteini veya peptit ile herhangi bir sinyal vermedi. Bununla birlikte, mesane kanseri olan bir hastadan alınan bir idrar numunesi kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi elde edilebilir. Bu nedenle, bir sinyalin yokluğunun anti-E.N-2 antikorundan değil, kullanılan proteinden geldiği gösterildi. Bu eğri, özellikle biyobelirteçlerin seçimine ilişkin pilot çalışmada kullanılmıştır. Daha sonra bu immünolojik testin geliştirilmesini platformumuzda durdurmaya karar verildi çünkü çok parametrelili sandviç tipi immunoassay formatımızla uyumsuz.

4.6.6. V.E.G.F, M.M.P-9 VE I.L-8'in Kantifikasyonu için Multipara metrik İmmünoassay

BCPC'nin kantifikasyonu için çok parametrelili immünolojik test, yeni ortamda daha da geliştirilmiştir. Geliştirme V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8 belirteçleri ile başladı (desteğin modifikasyonundan önce kullanılan matris ayrıca anti-P.T.G.S-2 yakalama antikorlarının bloklarını da içerir). Eski destek üzerinde ilk immunoassay sırasında gözlemlenenin aksine, çapraz reaksiyon yoktur.

İlk testler, eski destek üzerinde belirlenen en uygun tespit antikor konsantrasyonları ile gerçekleştirildi. Bununla birlikte, yakalama antikorlarının konsantrasyonları, eski tamponla yapılanlar gibi düşük seyreltmelere izin vermeyen bir sonda biriktirme tamponunun kullanılması nedeniyle değiştirildi. Ek olarak, geliştirmenin bu ilk aşaması, daha önce kullanılan ticari monoklonal antikorun yerini alan Lionex tarafından üretilen bir anti-I.L-8 poliklonal yakalama antikoru ile gerçekleştirildi. Bununla birlikte, I.L-8 kalibrasyon eğrisi için elde edilen sinyaller zayıftır. Saptama antikorlarının konsantrasyonunu artırarak (0.7 µg / mL'den 2 µg / mL'ye) sinyal yoğunluğunda bir iyileşme mümkün olmuştur, ancak bu artış yetersizdir ve kabul edilebilir bir saptama sınırının (500 pg / mL'den az) elde edilmesine izin vermez. . Ticari anti-I.L-8 yakalama antikoru ile elde edilen sinyallerle karşılaştırıldıktan sonra Lionex tarafından üretilen antikorun seçilmemesine karar verildi.

Son olarak, yeni desteğin kullanılmasının ardından, anti-I.L-8 saptama antikorlarının optimum konsantrasyonunun yeni bir tespiti gerçekleştirildi. Gerçekten de, en yüksek I.L-8 konsantrasyonlarında ve bir platonun oluşumunda güçlü bir sinyal vardır. İmmünolojik test performansında kayıp olmaksızın antikor konsantrasyonunu düşürme olasılığını değerlendirmek için bir dizi saptama antikoru üretilmiştir. Anti-I.L-8 tespit antikorunun konsantrasyonunun azalmasının sinyal gücünde bir azalmaya neden olmadığı tespit edildi. Bu nedenle, daha fazla geliştirme için 0,1 µg / mL'lik bir konsantrasyon kullanmaya karar verildi. I.L-8 kalibrasyon eğrilerinin 0.7 µg / mL ve 0.1 µg / mL'lik bir saptama antikor konsantrasyonu ile karşılaştırılması, önemli bir fark göstermez.

4.6.7. P.T.G.S-2 İşaretleyici Entegrasyonu

Eski ortamda olduğu gibi, P.T.G.S-2 işaretini çok parametrelili immünolojik teste dâhil etmek için birkaç test gerçekleştirdik. İmmünolojik test, yakalama antikorlu olarak monoklonal antikora karşılık gelen Lionex tarafından belirlenen antikorların en iyi kombinasyonunu ve tespit antikorlu olarak konjuge olmayan poliklonal antikorlu içerdiğinde bile anti-PTGS-2 yakalama antikor pedlerinde spesifik bir sinyal elde etmek mümkün değildi. Bu nedenle, P.T.G.S-2 işaretleyicinin entegrasyonu henüz kesinleşmiş değildir. Lionex tarafından antikorların değerlendirilmesi, immünolojik testin belirli bir çift antikor ve Lionex'in rekombinant proteini ile çalışabileceğini göstermesine rağmen, platformumuzda tatmin edici sonuçlar elde edemedik. Ek olarak, antikorların en iyi kombinasyonu da hasta örneklerinde P.T.G.S-2 proteinini tespit edemedi. Bu nedenle, bu reaktifleri çok parametrelili immünolojik teste entegre etmeyi istemeye devam etmek uygun görünmemektedir. Bu nedenle P.T.G.S-2 markörünün entegrasyonu, Lionex tarafından yeni bir antikor çiftinin üretilmesi için beklemeye alındı.

Taşıyıcıdaki değişiklik, immünolojik testin bazı parametrelerinde (özellikle yakalama antikorlarının konsantrasyonlarında) değişiklikler getirmesine rağmen, V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8 markörleri için tatmin edici sonuçlar elde edildi. Ek olarak, yeni desteğin çeşitli avantajları vardır. Ana ilgi alanı, kullanılabilirliği ve iki farklı referans kullanma imkânıdır. Aynı zamanda yongaların hazırlanmasını da kolaylaştırır: plakalar olduğu gibi kullanılabilirken eski destek, yapıştırıcıyı 96 oyuklu dipsiz bir plakaya monte etmek için bir adım gerektirir. Son olarak, bu yeni destek, şeritler halinde yapılandırılması sayesinde kullanım esnekliğine sahiptir. Bu yapılandırma, daha sonra kullanılmak üzere hazırlanan çipin bir kısmını tutmak mümkün olduğundan, immünolojik testin geliştirilmesi için faydalı olmuştur.

BCPC'nin gelişmesine paralel olarak, biyobelirteçlerin seçimine yönelik ikinci çalışma gerçekleştirildi ve ikinci bir panel tanımlandı. Dolayısıyla, HCC'nin nihai tanımı, BCPC için çok parametrelili immünolojik testin geliştirilmesinin durması ve bunun HCC'ye yönelmesi ile sonuçlandı.

4.6.8. Sağlıklı Kontroller Kategorisi (HCC) için Biyolojik Belirteçlerin Geliştirilmesi

HCC şu belirteçleri içerir: V.E.G.F, I.L-8, I.L-6, C.D.H-1, Er.bB-2 ve E.N-2. Bu markörlerden üçü (V.E.G.F, I.L-8 ve E.N-2) ayrıca BCPC'nin bir parçasıydı ve bunlardan ikisi çok parametrelili immünolojik teste entegre edildi. Bu iki panel arasında bir geçiş oluşturmak için, P.T.G.S-2 markörü, çok parametrelili immünolojik testten çıkarıldı ve I.L-6 ile değiştirildi.

Bu nedenle, HCC için immünolojik testin geliştirilmesi, V.E.G.F, M.M.P-9, I.L-8 ve I.L-6 markörleri ile başladı. M.M.P-9 markörü, HCC'nin bir parçası değildir, ancak çok parametrelili immünolojik testteki analitik performansı tatmin edici olduğu için immünolojik testten çıkarılmamasına karar verilmiştir. Ek olarak, ikinci çalışmada seçilmemesine rağmen, pilot çalışmada iyi tanı performansı gösterdi ve bireysel performans açısından en iyi belirteçti.

Daha sonra, C.D.H-1 ve Er.bB-2 markörleri de immünolojik teste dahil edildi.

4.6.9. V.E.G.F, M.M.P-9, I.L-8 VE I.L-6 Kantifikasyonu için Multipara metrik İmmünoassay

V.E.G.F, M.M.P-9, I.L-8 ve I.L-6 markörlerini içeren çok parametrelili test tasarımının ana sonuçları. Dört protein için bir kalibrasyon eğrisi elde etmek mümkündür. Başlangıçta seçilen tespit antikor konsantrasyonları, BCPC'nin geliştirilmesi sırasında belirlenenlerdi. Bu sonuçlar, çok parametrelili immünolojik testte P.T.G.S-2 markörünün I.L-6 ile değiştirilmesinin etkisini değerlendirmek için BCPC'nin geliştirilmesinin sonunda elde edilenlerle karşılaştırıldı. V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8 eğrileri iki test yapılandırmalarında benzerdir. Bu nedenle, I.L-6 markörünün diğer analizlerin performansında herhangi bir değişiklik yaptığı görülmemektedir.

4.6.10. Çapraz Reaksiyon

O zaman çok az çapraz reaksiyon olduğunu fark ederiz. V.E.G.F kalibrasyon aralığının kuyucuklarında anti-M.M.P-9 yakalama antikör grafiklerinde spesifik olmayan bir sinyal var. V.E.G.F konsantrasyonu azaldığında sinyal azalır, bu nedenle V.E.G.F proteini ile anti-M.M.P-9 yakalama antikörleri arasında bir etkileşim olabilir. Bu reaksiyon, BCPC'nin geliştirilmesinin başlangıcında zaten gözlemlenmişti. Bununla birlikte, burada çok daha düşüktür: 100.000 pg / mL'lik bir VEGF protein konsantrasyonu için, anti-MMP-9 yakalama antikör pedleri üzerindeki sinyal, BCPC'nin geliştirilmesi sırasında (eski destekte) 18 au yoğunluğa sahiptir, yoğunluk 61 au idi.

V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8 için çapraz reaksiyon, üç proteinin aynı kuyuya getirilmesiyle de analiz edildi. Bu değerlendirme, BCPC'nin geliştirilmesi sırasında gerçekleştirilene benzer şekilde gerçekleştirildi. Anti-M.M.P-9 yakalama antikör grafiklerinde V.E.G.F proteininin spesifik olmayan sinyali, histogram (a) ve histogram (b) üzerinde bulunur. İkincisi, 490.000 pg / mL'lik M.M.P-9 konsantrasyonunda M.M.P-9 sinyalinin yoğunluğu, V.E.G.F (ve I.L-8) varlığında, M.M.P-9 proteininin tek başına olduğu duruma göre daha yüksektir.

Aynı zamanda, V.E.G.F proteininin eşit bir konsantrasyonundaki V.E.G.F sinyalinin yoğunluğunun, M.M.P-9 konsantrasyonu yüksek olduğunda (490.000 pg / mL), sıfıra eşit veya daha düşük olduğu duruma göre yaklaşık olarak iki kat daha yüksek olduğu da belirtilmektedir. Bu fenomen, proteinler her kuyucukta yalnız olduğunda kalibrasyon eğrilerinde görülmez. Bu nedenle, M.M.P-9 proteininin (yüksek konsantrasyonda) V.E.G.F proteini ile etkileşime girmesi mümkündür; bu, anti-V.E.G.F yakalama antikör pedleri seviyesinde, ikincisi V.E.G.F ile etkileşime girdiğinde lokalize sinyali artırır. Son olarak, son histogram, tek başına I.L-8 varlığında anti-V.E.G.F yakalama antikör grafikleri üzerinde spesifik olmayan bir sinyali vurgular. Kalibrasyon eğrileri oluşturulurken bu çapraz reaksiyon gözlenmemiştir.

4.6.11. C.D.H-1 ve ER.BB-2 belirteçlerinin Entegrasyonu

HCC çok parametrelili immünolojik testin geliştirilmesindeki son adım, C.D.H-1 ve Er.bB-2 belirteçlerinin eşzamanlı entegrasyonudur. Önceden optimizasyon yapılmadan bu nedenle iki yeni markör için bir kalibrasyon eğrisi gerçekleştirmek mümkündür. Bununla birlikte, C.D.H-1 markörünün zayıf bir sinyale sahip olduğuna dikkat edin: en yüksek konsantrasyonda maksimum yoğunluğu 20 au'dan azdır. Ek olarak, sinyal yoğunluğu zayıf kalmasına rağmen diğer test işaretçileriyle çapraz reaksiyon görülebilir. Bu, daha özel olarak anti-I.L-6 yakalama antikor grafikleriyle ilgilidir. C.D.H-1 tahlil reaktiflerinden biri ile anti-I.L-6 yakalama antikorları arasındaki etkileşim, bu nedenle çok parametrelili immünolojik tahlilin daha da geliştirilmesi sırasında izlenmelidir. V.E.G.F, M.M.P-9, I.L-8 ve I.L-6 markörlerinin sonuçları, C.D.H-1 ve Er.bB-2 entegrasyonundan önce elde edilenlerle karşılaştırıldı. İki yeni entegre belirteçlerin dozajlarını optimize etmenin ilk adım, tespit antikorlarının optimum konsantrasyonunu belirlemektir. Bu nedenle her bir saptama antikoru için bir dizi konsantrasyon üretildi. C.D.H-1 ile ilgili olarak, diğer tüm yakalama antikorlarının grafiklerinde spesifik olmayan sinyaller belirir. Bu sinyaller, anti-C.D.H-1 saptama antikorlarının en yüksek konsantrasyonunda en yüksektir ve konsantrasyon azaldıkça azalır. I.L-6 dışındaki tüm belirteçler için, 0.1 µg / ml anti-C.D.H-1 yakalama antikorları konsantrasyonundan kaybolurlar (veya sıfıra yakın bir yoğunluğa sahiptirler). Anti-I.L-6 yakalama antikor pedleri güçlü bir sinyal sergiler. Bu yoğunluk, 2 ila 0.5 µg / ml'lik anti-C.D.H-1 saptama antikor konsantrasyonları için spesifik C.D.H-1 sinyalinin yoğunluğundan bile daha büyüktür. Antikor konsantrasyonu azaldığında bu sinyalin azaldığını bildiğimizde, anti-C.D.H-1 saptama antikorusunun anti-I.L-6 yakalama antikoru ile çapraz reaksiyonu olması muhtemeldir. Bu çapraz reaksiyonu sınırlandırmak için, bu nedenle 0.1 ug / mL'ye eşit veya daha düşük bir antikor konsantrasyonunun kullanılması tercih edilir. Her neyse, bu konsantrasyondaki bir artış testin performansını iyileştirmezdi çünkü C.D.H-1'e karşılık gelen sinyal yoğunluğu 0, 1 µg / mL'den daha büyük antikor konsantrasyonlarında önemli ölçüde daha yüksek değildir. Bu nedenle, başka bir performans iyileştirme stratejisinin oluşturulması gerekli olacaktır. Er.bB-2 markörüne gelince, maksimum sinyal yoğunlukları en yüksek antikor konsantrasyonlarında (2 ve 1 µg / mL) değil, ancak daha düşük konsantrasyonlarda (0,5 ile 0,07 µg / mL arasında)

gözlenir. Ardından yoğunluk 0,7 µg / mL ile 2 µg / mL arasında azalır. Bu nedenle, yüksek konsantrasyonlarda antijenin yakalama antikoru ile etkileşimini önleyen tespit antikorunun bir "tarama" etkisi olabilir. Dolayısıyla optimum konsantrasyonu 0,1 µg / mL olarak tanımlanmıştır (bu başlangıçta kullanılan konsantrasyondur).

4.6.11.1. C.D.H-1 Testi için Optimizasyon Stratejileri

İlk C.D.H-1 tahlil testleri tatmin edici olmadığından ve anti-C.D.H-1 saptama antikorlarının konsantrasyonunu artırarak sinyal yoğunluğu iyileştirilemediğinden, kalibrasyon proteini seçiminin önemi araştırıldı. Marker seçim çalışmaları sırasında C.D.H-1 proteininin tespit edildiği hastalardan alınan idrar örnekleriyle ilk test gerçekleştirildi. Üç numune (B014P, B004H ve B013H) bu nedenle test edildi. İlk örnek seyreltilerek her biri kullanılarak bir aralık oluşturulabilir. Bu örneklerden ikisi için, C.D.H-1 konsantrasyonu biliniyordu. Örnek aralıkları için daha yüksek yoğunluklu sinyaller çok belirgin bir şekilde gözlemlenir. İkincisi, kalibrasyon protein aralığından daha iyi performans gösterir. Eğrilerin şekli, daha iyi bir hassasiyetin (eğrinin eğimi) yanı sıra daha iyi bir algılama sınırını vurgular: numuneler için 200 ile 250 pg / mL arasında iken kalibrasyon proteini için yaklaşık 10.000 pg / mL'dir. Ek olarak, maksimum sinyal, 3816 pg / mL ve 3340 pg / mL konsantrasyon için B013H ve B004H numuneleri için 42 AU ve 27 AU yoğunluğa ulaşırken, kalibrasyon proteininin maksimum sinyali daha yüksek bir konsantrasyon için (100,000 pg / mL) yalnızca 18 ua'dır. Bu test, immünolojik testin, C.D.H-1'in saptanması için uygun bir çift antikor içerdiğini doğrular. Performans eksikliği bu nedenle kullanılan kalibrasyon proteininden kaynaklanmaktadır.

4.6.11.2. Özel Durum E.N-2 Markörü

E.N-2 markörü için bir tahlil yönteminin geliştirilmesi, BCPC çok parametrelili bağışıklık tahlilinin geliştirilmesinin başlangıcında durdu. Doğrudan mod tek parametrelili immünolojik teste dayalı yöntemimizin aksine, bir protein çipi üzerinde

sandviç tipi bir yöntem geliştirmeyi başardılar. Yakalama molekülü bu sefer bir antikör değil, bir DNA aptameridir (Lin et al , 2005).

Aptamerler, üç boyutlu yapıları sayesinde diğer molekülleri tanıyabilen ve spesifik olarak bir hedefe bağlanabilen nükleik asitlerdir. Ve bu aptamerler kararlı ve kolay sentezlenebilme ve yüksek özgüllüğe sahip olma avantajına sahiptirler. Son zamanlarda E.N-2 proteini için bir tahlil, spesifik diziyi içeren bir DNA probu ile birleştirilmiş elektrokimyasal tespit kullanılarak geliştirilmiştir. Bu yöntemle ulaşılan algılama sınırı 5,62 fM'dir.

Ortaklarımız, bir destek ve bir saptama antikoru üzerinde hareketsizleştirilmiş bir DNA aptameri kullanarak E.N-2 proteini tahlilinin konseptinin kanıtını oluşturdu. Bu yöntem, bir yakalama antikoru içeren geleneksel bir sandviç yöntemine kıyasla daha yüksek hassasiyet ve daha geniş bir dinamik aralık sağlar. Artık, E.N-2 markörünü platformumuza ve HCC'deki diğer markörler dahil olmak üzere çok parametrelili immünolojik teste entegre etmek mümkündür.

E.N-2 işaretçisi haricinde, tüm HCC işaretleyicileri, çok parametrelili immünoassay'e entegre edilebildi. Bu nedenle ikincisi, V.E.G.F, I.L-8, I.L-6, C.D.H-1 ve Er.bB-2'yi içerir, ayrıca HCC'nin bir parçası olmayan M.M.P-9'u da içerir. Ancak bu testin geliştirilmesi bitmedi. Şimdi mümkün görünen E.N-2 markörünün entegrasyonuna ek olarak, özellikle C.D.H-1 markörü için immünolojik tayini optimize etmek de gereklidir.

Ek olarak, çok parametrelili bir sandviç bağışıklık tahlilinin çapraz reaksiyonuna karşı savunmasızlık fikrini unutmamak önemlidir. Sayısal değeri, reaktif çifti başına olası etkileşim sayısına karşılık gelir ve hedeflerin sayısı ile ikinci dereceden artar. Bu nedenle, altı belirteç içeren bir test için güvenlik açığı 120'dir. Bir işaretçi eklenirse (E.N-2 için sağlandığı gibi), güvenlik açığı daha sonra 168 değerine ulaşacak şekilde artırılacaktır. Çapraz reaksiyonların değerlendirilmesi bu nedenle önemli bir adımdır. Şimdiye kadar sadece üç markör için uygulanmıştır (V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8).

Gerçekte gözlemlenmiş olan çapraz reaksiyon fenomeni, uygun performans ile markörlerin çoklu tespitini engellemiyor gibi görünmektedir. Bununla birlikte, C.D.H-1 işaretçisi, I.L-6 işaretçisi ile önemli bir çapraz reaksiyon gösterir. Etkisinin daha fazla değerlendirilmesi gerekecektir.

Testin optimizasyonunun ve çapraz reaksiyonların değerlendirilmesinin ardından, analitik bir doğrulama gereklidir. Metodumuzun kesinliği ve doğruluğunun yanı sıra her bir markörün tespit ve kantifikasyon limitlerinin belirlenmesi özellikle gerekli olacaktır.



5. MESANE KANSERİ HASTALARINDA GENETİK DEĞİŞİKLİKLER

5.1. Giriş

Herhangi bir çevresel moleküler hastalık gibi mesane kanseri, tütün gibi farklı kanserojen ajanlara çevresel maruziyetten sonra ve mesleki maruziyetin yanı sıra çoklu genetik ve epigenetik değişikliklerin ardışık birikimi nedeniyle ortaya çıkar. Bu moleküler değişiklikler, kontrolsüz hücre çoğalması, hücre döngüsünün deregülasyonu ve farklılaşması, hücre ölümü veya apoptozda azalma, istila bloğu ve metastaz ile sonuçlanır (Mahnken, 2005). Belirli genetik değişiklikler, epigenetik ve protein ekspresyonu, bu sinyal yollarının etkileşimi gibi bir çift olarak ortaya çıkar ve büyüme, çare, ilerleme ve metastaz yapma yeteneği dâhil olmak üzere tümörün biyolojik davranışını belirler. Genetik profile, klinik davranışa bağlı olarak mesane tümörleri iki ana alt gruba ayrılabilir. Tümör kaslarında en sık görülen değişiklikler Papiller invazif düşük dereceli FGFR3 mutasyonel aktivasyonu, kromozom 9'un heterozigotluk kaybı (LOH), PIK3CA ve RAS genlerinin mutasyonel aktivasyonu ve TSC1'in mutasyonel inaktivasyonunu içerir. Kas invaziv tümörlerde yaygın değişiklikler arasında TP53 ve RB1 inaktivasyonu, PTEN ekspresyonunun azalması (mutasyon, LOH, homozigot delesyon veya diğer mekanizmalar yoluyla), ERBB2 amplifikasyonu, 6p22 amplifikasyonu, kromozom delesyonları 8 ve hedefleri olan diğer Genomik değişiklikler yer alır. CpG adalarının hipermetilasyonu, sıklıkla tümör baskılayıcılar da dahil olmak üzere kanserdeki kritik genlerin transkripsiyonel susturulmasıyla ilişkilidir (Chenet al, 2013).

Hipermetilasyon ve miRNA'lar ile epigenetik inaktivasyon, tümörijeniz ve mesane kanseri ilerlemesinde rol oynayan genler için tarif edilmiştir. Hipermetilasyon ile inaktive edilen genler arasında, diğerleri arasında CDKN2A, RUNX3 veya RASSF1 bulunur. Bu projede, mesane kanserinde tanısallık ve prognostik biyobelirteçler olarak klinik değer katan SOX9, PMF1, miyopodin ve KiSS-1 gibi mesane kanserinde birkaç genin metilasyonunu belirledik. Bu projenin stratejisinin, bu değişikliklerin hâlihazırda bilinen diğer genetik ve epigenetik değişikliklerle nasıl bütünleştiğini karakterize

etmeye ve risk popülasyonunda tanımlanan ve mesane kanserinde değerlendirilen yeni epigenetik değişikliklerin, tümörlerin klinik sınıflandırmasını iyileştirmeye izin vereceğine inanıyoruz. Mesane ve invaziv olmayan bir örnekte yüksek riskli popülasyonlarda hastalığın erken tespitine izin verir, idrarda.

5.2.Mesane kanserinde tanısal, prognostik faktörler ve kişiselleştirilmiş alternatif tedaviler

Mesane tümörleri klinik olarak, kas tabakasını istila ettiklerinde yüksek nüks oranları ile karakterizedir. T1G3 ve in situ ürotelyal tümörler, tekrarlayan ve kas-iskelet sistemi ve metastatik hastalığa ilerleyen yüksek yayılmaları nedeniyle yüksek riskli kabul edilir. Calmette-Guinin Bacillus (BCG) ile intravezikal immünoterapi, rekürrens ve progresyon oranlarındaki düşüşten yararlanarak bu hastalarda oldukça başarılı bir deneysel tedaviyi temsil eder (Kamatet al, 2016). BCG'nin tek başına veya intravezikal quimioterapia ile transüretal rezeksiyon üzerindeki üstün etkinliğine rağmen, tümörlerin% 50'den fazlası invazif olmayan nüks eder veya kalıcıdır. CIS, submukoza invazyonu (evre T1) ve yüksek dereceli papiller olan yüksek riskli hastalarda, progresyon riskini artırdığı ve konservatif mesane cerrahisi ile iyileşme olasılığını azalttığı ve sistektomiden kaçındığı için bu önemli bir sorundur. Bu hastaların büyük bir kısmı BCG immünoterapisine yanıt vermez ve tümörleri sadece kalıcı ve nüksetmekle kalmaz, aynı zamanda yatırım yaparak ve metastaz yaparak ilerler. Mesane kanseri olan hastaların% 80'ini temsil eden kas invazif olmayan bu üç tip yüksek riskli hastada BCG'ye yanıtı tahmin etmek için umut verici duyarlılığa ve özgüllüğe rağmen, Şimdiye kadar açıklanan öngörücü biyobelirteçlerin hiçbiri rutin klinik uygulamaya tam olarak sokulmamıştır. (Sanchez- Carbayo 2012). Bu arada, hastalığı tespit etmek için yalnızca tanısal belirteçlere ihtiyaç duyulmaz, aynı zamanda her tümörün bireysel saldırganlığına uyarlanmış terapötik prosedürler sağlayabilmek için küçük yaralanmaları bu ölümcül tümörlerden ayıran prognostik ve öngörücü olanlara da ihtiyaç vardır.

Bu anlamda, Myopodin veya PMF1 gibi mesane kanserinde metillenmiş adayları, doku dizilerinde bu genlerin veya ezrin gibi yüksek etkili tekniklerle tanımlanan diğerlerinin

immünohistokimyası ile hem metilasyonu hem de proteinin ekspresyonu olarak tanımladık. T1G3 tümörlü yüksek riskli hastalarda BCG'ye yanıtın prognostik ve öngörücü belirteçleri olarak önemli bir rol oynar.

5.3. Mesane kanserinde epigenetik değişikliklerin belirlenmesi için yüksek etkili teknolojiler

Tümörlerin moleküler analizi için yüksek etkili teknolojilerin ilerlemesi, genetik profillerin, epigenetik ve protein karakteristiğinin farklı tümör alt tiplerinin araştırılmasına ve belirli bir klinik davranışı tanımlayan hedeflerin ve moleküler yolların tanımlanmasına izin verir. Bizimki de dâhil olmak üzere farklı gruplar, farklı mesane kanseri alt tiplerinin yanı sıra mesane kanseri tümör oluşumu ve ilerlemesinde yer alan moleküler yolları sınıflandırmamıza izin veren bireysel profilleri ve adayları tanımlamak için tümörlerin ve biyolojik sıvıların transkript, genomik ve proteomik profillerini kullandı (Wanget *al* , 2014).

5.4. Metodoloji

5.4.1. İdrar toplama

Kaynaklardan keyfi olarak idrar örnekleri toplanmaya çalışılmıştır. Üroloji servislerinde hasta örneklerinden 100 idrar örneği alınmıştır. Numuneler, IP'nin polistiren kutularda aylık olarak toplamak için karbondioksit karı taşıdığı hastanelerde -80oC'de yerinde dondurulmuştur. İstedığımız spesifik hedef, hematüri ve mesane kanseri ile idrarda farklı şekilde ifade edilen 100 gen ve miRNA adayının yüksek etkiye sahip epigenetik teknik dizilerinde kullanılması onaylanmış seçilmesidir. Kullanılan CpG ve miRNA dizileri, 0.001'den daha düşük anlamlı p değerleri olan gruplar arasında farklı şekilde ifade edilen en az 80-90 adayı tanımlayacak kadar yüksek sayıda aday içerir (Garcia *et al*, 2013). Bu nedenle, analiz edilen 100 numunenin sayısı kabul edilebilirdir ve numune boyutunu hesaplamak için bilinen bir formülle tutarlıdır. 0.001'lik bir tip I hata ve 0.45'lik bir standart sapma varsayıldığında, 50'lik bir örnek boyutu, % 95'lik bir

istatistiksel güce sahip gruplar arasında en az > 2 'lik bir varyasyon aralığının ekspresyonundaki farklılıkları tespit edebilir.

5.4.2. Mikrohematüri değerlendirmesi

İdrarda toplanan tüm idrarda gizli kan varlığı, mesane kanserinin varlığından şüphelenmenin ilk işareti olduğu için belirlenmiştir. İdrarda hemoglobin varlığının değerlendirilmesi, kolorimetrik yöntemin hemoglobinüri varlığına bağlı olarak mikrohematüri derecesini ölçen idrar test şeritleri olan Roche çubuklar kullanılarak gerçekleştirildi. Bu test şeritleri ayrıca, olası bir idrar enfeksiyonunun belirtileri olarak lökosit ve nitritlerin varlığının tespit edilmesini sağlar (Messing , 1990).

5.4.3. İdrar örneklerinde DNA metilasyon profilleri

100 idrarın genel DNA metilasyon profillerini oluşturmak için, 6,900 CpG adasını (Illumina) ölçen bir oligonükleotid dizisinde rekabetçi etiketleme ve hibridizasyon ile idrar örneklerinden ekstrakte edilen DNA'nın bisülfıt işleminin bir kombinasyonunu kullandık. Bunun Cy-3 (yeşil) ve Cy-5 (kırmızı) ile hibridize olması arasındaki ilişki, vakaları ve kontrolleri ayırt etmek için her CpG adasının metilasyon durumunu belirler (Lopez *et al* , 2013).

5.4.4. İdrar örneklerinde miRNA ekspresyonunun profilleri

Önceki bölümde metilasyonla analiz edilen aynı örnekleri kullanarak, ticari bir miRNA oligonükleotid dizisi (Agilent) kullanarak 850 miRNA'nın profillerini analiz etmeyi amaçlıyoruz. Bu durumda miRNA'ların bulunduğu toplam RNA kullanılacaktır. Analizler, her idrar için ayrı ayrı, iki kopya halinde ve etiketlemenin ters çevrilerek yapılacaktır. Bireysel örneklerin derecesini karşılaştırmak için normal urotelios'tan en az 2 örnek ve noninvaziv derece altında 2 tümör, iki yüksek noninvaziv ve 2-invaziv kas içeren bir karışım kontrol örneği oluşturacaktır.

5.4.5. Aday genlerin hipermetilasyonunu susturma ile ilişkilendirmek için fonksiyonel analiz

İdrarda ve tümörlerde CpG dizileri kullanılarak keşif fazı ile bu genlerin susturulmasıyla birleştirilerek epigenetik profilde belirlenen adayların metilasyonunun mesane kanseri tümör hatlarında değerlendirilmesi için başlanmıştır. 40-50 aday geni değerlendirip optimize edebilmek istiyoruz, ancak hem zaman hem de bütçe sınırlamaları nedeniyle en az bir geni karakterize etmeye başlamak mümkün oldu. Metilasyon durumu, bisülfite ile muamele edilmiş DNA üzerinde iki metilasyon polimeraz zincir reaksiyonu (PCR'ler) optimize edilerek belirlenmiştir. Primerler, iki prosedürü gerçekleştirmek için tasarlanmıştır (Aleman *et al*, 2008).

5.4.6. Epigenetik profilli miRNA'ların hedeflerinin belirlenmesi ve hedeflerin susturulmasını düzenleyici miRNA'larla ilişkilendirmek için fonksiyonel analiz

İdrarda miRNA dizilerini kullanarak tanımlama fazını aday hedeflerin susturulmasıyla birleştirdikten sonra tanımlanan epigenetik profilin 40-50 miRNA adaylarının ilişkisi, birkaç mesane kanseri çizgisini değerlendirmek istiyoruz. Önceki bölümde analiz edilen numune karışımlarından elde edilen analizlere kıyasla bu miRNA'ların mutlak bolluğunu ve profilini belirlemek için bu hücre hatlarının kitlesel sekanslamasının (katı sistemi kullanan Uygulamalı Biyosistemlerden) kullanılması arzu edilir. MiRNA dizileri miRBase veritabanı kullanılarak analiz edilebilir. CpG ada bulma programı, CpG adalarında aynı yerde bulunan miRNA'lar için kullanılacaktır, çünkü insan miRNA'larının promoterlerinin % 90'ının olgun miRNA'ların 1000 bp yukarı akışını bulacağı tahmin edilmektedir.

5.4.7. Doku dizilerinde (T.M.A) immünohistokimya ile epigenetik profilin tümörjenezinde kritik genlerin susturulmasını değerlendirin

Bu proje öncesinde geriye dönük olarak toplanan dokular üropatolog tarafından incelenmiştir. T.M.A'ları oluşturmak için, bu tümörlerin ve normal ürotelyumların temsili alanları seçildi ve en azından üç kopya dâhil edildi ve mümkün olduğunda

normal ve displastik ürotelyum dâhil edildi. Gelecekte bu projede incelenen tümörlerden eşit olarak eşleşen idrarlardan doku elde etmek mümkün olursa, bu örneklerle de doku dizileri oluşturacaktır. TMA'larda immünohistokimya ile analiz edilen laboratuvar ortamında gen geçerliliğinin susturma etkileri ve MS-PCR metilasyonu ile elde edilen sonuçlarla ilgili olacaktır. MiRNA'lar spesifik Q-RT-PCR ile analiz edilecektir. İmmünohistokimya tamamen IP'nin gözetimindeki Translasyonel Onkoloji Laboratuvarı'nda yürütülmektedir.

5.4.8. Mesane kanseri hücre dizilerinde epigenetik profilde tanımlanan genlerin biyolojik ilgisini değerlendirin

Epigenetik profilde gen modülasyonunun sonuçlarını ve transkripsiyonel fenotipini aydınlatmak için hücre hatlarını epigenetik profillere dayalı olarak sınıflandırmak istediğimiz bu hedefe hitap edildi. CpG adaları ve miRNA dizileri kullanılarak moleküler düzeyde 10 mesane kanseri çizgisinden oluşan bir panel incelenecektir. En ilgili adayların biyolojik işlevini karakterize etmek ve seçilen aday genlerin laboratuvar ortamında ekspresyonunu modüle etmenin etkisini araştırmak için işlevsel tahliller yapılacaktır.

Mesane kanseri hastalarının idrar serilerinde epigenetik profil testlerini optimize edin ve değerlendirin

Amaç, mesane kanseri varlığının teyit edildiği ve hastalığı olmayan kontrollerin sistoskopi ile teyit edildiği mikrohematüri hastalarında 50 metillenmiş aday arasından seçim yapan bir MS-MLPA tahlili tasarlamaktır. Fonksiyonel Laboratuvar çalışmalarında ve tümörlerin bağımsız seri klinik doğrulaması dikkate alınarak seçilen adayların idrarda metillenmesi gerekecektir. MiRNAS için, aynı kriterlere sahip en farklı şekilde ifade edilen 50 aday, q-RT-PCR'ye dayalı bir multiparametrik deney tasarlamak için seçilecektir. Bu testler, önceki bölümlerde CpG dizileri ve miRNA dizilerinin gerçekleştirildiği dahil olmak üzere risk altındaki endüstrilerde çalışan bireylerden en az 100 örnek ile toplanacak idrar serilerinde değerlendirilecektir. Duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif tahmin değerleri ve adayların tanısal doğruluğu

Bireysel ve çok parametrelili profiller vakaları ve kontrolleri (hastalıklı ve risksiz) birlikte değerlendirecektir.

5.5. Verilerin Yorumlanması

Aşağıda stratejinin bir özeti ve bu projede uygulamak için zaman verdiği sonuçlar bulunmaktadır. İdrar örneklerinin toplanmasını organize ettikten ve mikrohematürilerini karakterize ettikten sonra, epigenomik metilasyon profilleri ilk olarak toplanan idrar örneklerinin 100'ünde 6900 CpG adası içeren bir metilasyon dizisi kullanılarak analiz edildi. Bu profillerin analizi, seçilen idrar örneklerinde mesane kanseri varlığıyla ilişkili aday genlerin tanımlanmasına hizmet etmiştir. Daha sonra MS-PCR ile metilasyonu karakterize etmek ve seçilen genlerin hem hücresel tümör çizgileri hem de gelecekteki idrar serilerinde zaten toplanmış olanlardan bağımsız teknik alternatiflerle metillenip metillenmediğini belirlemek için optimize edilmiş epigenetik metodolojisi. Seçilen genlerin hipermetilasyonunun, seçilen genlerin ekspresyon kaybıyla ilişkili olup olmadığını değerlendirmek için, mesane kanseri hücre çizgileri, metillenmişlerse genlerin ekspresyonunu geri almak için bir demetile edici ajan olan azasitidin ile tedavi edildi. Seçilen gen olan BDNF'ye, metilasyonun varlığı sadece CpG dizisi tarafından değil, aynı zamanda PCR metilasyonu, bisülfidin dizilenmesi ve gen ekspresyonunun RT-PCR, western blot (WB) ile geri kazanımının doğrulanması ve immüno Floresans.

5.5.1. Muhtemel numune toplama: idrarın karakterizasyonu

Bu süre içinde 100 idrar toplamayı başardık. Üroloji servisini ziyarete gelen mesane kanseri ile ilgili belirti ve semptomları olan bireylerin bu örneğinde. Vaka veya kontrol grubuna ait bir idrarı atmak için mesane kanserinin varlığı veya yokluğu, hem uygun olduğunda hem de üriner sitolojinin sistoskopi bilgisini aldığı için tanısal referans yöntemi olan sistoskopi ile doğrulanmıştır. Toplanan 100 idrardan, 84 idrarda sistoskopi ile mesane kanserinin varlığı doğrulandı; bunlardan 91'i invazif olmayan mesane tümörü ve 9 muskularis propria (pT2 +) tümörü bulunan hasta bulundu. Bu mesane kanseri hastalarından 32'si sigara içiyor ve 8 kişi mesane kanseri olup mesleki maruziyet riski olarak değerlendirilebilecek bir işe bağlanmıştır. Bu bireyler, düşük

dereceli pTA ve PT1 kas invazif olmayan başlangıç aşamalarına sahip tümörler sunmuşlardır. Mesane kanseri riski taşıyan mesleki maruziyeti olan bireylerden idrar toplamaya devam edebilmesi ve yeterli sayıda örnekle tespit edilen aday genlerin istatistiksel analizlerini yapabilmesi beklenmektedir.

Yaşla ilgili olarak, değerlendirilen mesane kanseri olan tüm bireylerin mesane kanseri prevalansı ve insidansını takiben 40 yaşın üzerindedir ve 40 yaşın altındaki bireylerde Mesane kanseri nadir görüldüğünden, ortalama 59,2 +/- 6,8 yıl (44-82) arasındadır. Cinsiyetle ilgili olarak, beklentiler doğrultusunda her kadın örnekleminde 6 erkekten örnek alınmıştır. Aşağıdaki analizler için hastalığı olmayan kontrol denekleri, mesane kanseri olan vaka grubuna eşit cinsiyet ve yaş ile seçilmiştir.

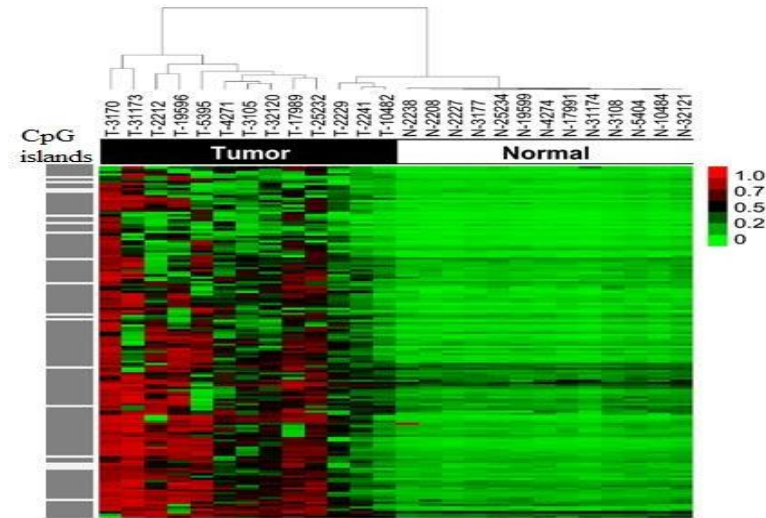
5.5.2. Mikrohematüri değerlendirmesi

Makroskopik veya mikroskopik hematüri varlığı ile ilgili olarak, çalışılan tüm idrarda test şeritleri değerlendirilmiştir. Mesane kanseri hastalarında (n = 100) 73 hastada makroskopik hematüri, 11 hastada mikroskopik hematüri, 14 hastada patolojik bulgu saptanmadı. Ve mesane kanseri olmayan bireylerde (n = 100), 10 hastada makroskopik hematüri bulundu ve sırasıyla benign prostat hiperplazisi ve idrar yolu enfeksiyonu süreçleri ile ilişkili 15 hastada mikroskopik hematüri bulundu. Çalışmaları için riskli mesleki maruziyet ile ilişkili bireyler olarak kabul edilen 98 kişiyi seçerken, hiçbir makroskopik hematüri göstermedi, 10 hastada mikroskopik hematüri sunuldu, bunlardan 6'sında mesane kanseri tespit edildi, geri kalan 4 hastada üriner enfeksiyon tanısı kondu. Mesleki riske maruz kalan 100 kişiden oluşan bu popülasyonda, 6'sı mikroskopik hematüri gösteren ve 2'si hemoglobüri ile ilişkili olarak idrar çubuğunda değişiklik göstermeyen 8 mesane kanseri hastası bulunmuştur.

5.5.3. İdrar örneklerinde DNA metilasyon profilleri

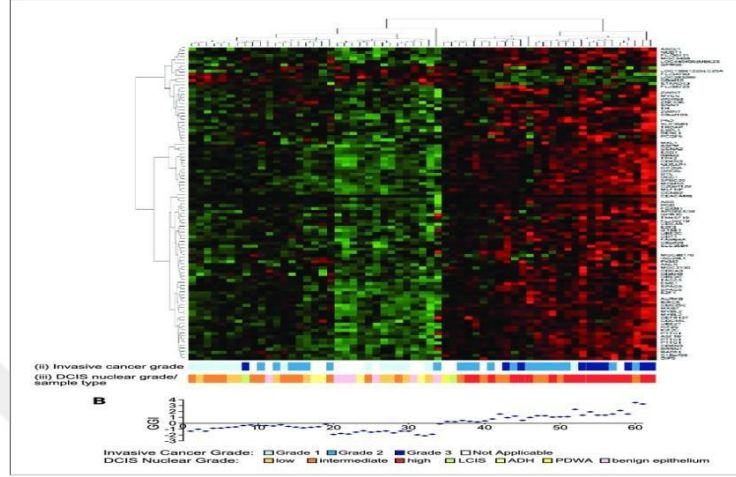
Küresel DNA metilasyon profilleri oluşturmak için, 6,900 CpG adasını (Illumina) ölçen bir oligonükleotid dizisi kullanıldı; burada 88 idrar örneği işlendi, bunlardan 44'ü

mesane kanseri ve 49'u mesane kanseri olmayan bireyi dâhil etti. Mesane kanseri hastaları 25 olguda düşük dereceli, 19 olgu yüksek ve evreleri pTa (n = 19), pT1 (n = 17) ve pT 2 + (n = 8) idi. İdrar örneklerinde kullanılacak protokolün optimizasyonundan sonra toplanan ve seçilen idrardan alınan 500 ng DNA etiketlendi ve hibridize edildi. Tüm idrarlardan DNA'yı çıkardıktan ve bir NanoDrop'ta kalitelerini değerlendirdikten sonra, idrarların DNA'larının ve hibridizasyon dizilerinin işaretlenmesine geçtik. İlk olarak, dizilerin işlenmesi, işaretlenmesi ve hibridizasyonunda gerçekleştirilen farklı işlemlerin kalite kontrol analizi ve aşağıdaki panellerde aşağıda gösterilen bazı ilk analizler gerçekleştirildi: A) alele özgü uzantının doğrulanması; B) bisülfite dönüşümünün doğrulanması; C) cinsiyete özgü genlerin metilasyonunun doğrulanması (X ve Y kromozomları ile ilişkili); D) Uzantının kontrolü; E) ilk hibridizasyonun kontrolü; F) ikinci hibridizasyonun kontrolü; G) negatif kontrol; H) kontaminasyon kontrolü I) dizinin yoğunluğunun kontrolü. Kullanılan CpG dizilerinin kullanımının tüm prosedürlerinde doğru bir süreci gösteren tüm kontrollerin olumlu olduğu ortaya çıktı. Bu ilk biyoinformatik analiz, Illumina'nın Beadstudio programlarıyla gerçekleştirildi. Aşağıda, analiz edilen tüm numunelerdeki dizilerde analiz edilen tüm CpG adalarının metilasyon profillerinin denetimsiz bir kümeleme analizi bulunmaktadır. Bu analizler Stanford Eisen'de geliştirilen programlarla ve mikrodizilerin analizi için yapılmıştır (Şekil 5.1). Yatay olarak gösterilen örneklerin her biri boyunca genlerin her biri dikey olarak gösterilir. Cy-3 (yeşil) ve Cy-5 (kırmızı) ile hibritlenenler arasındaki ilişki, vakaları ve kontrolleri ayırt etmek için her CpG adasının metilasyon durumunu belirleyecektir.



Şekil 5.1. Tüm CpG adalarının metilasyon profillerinin kümeleme analizi

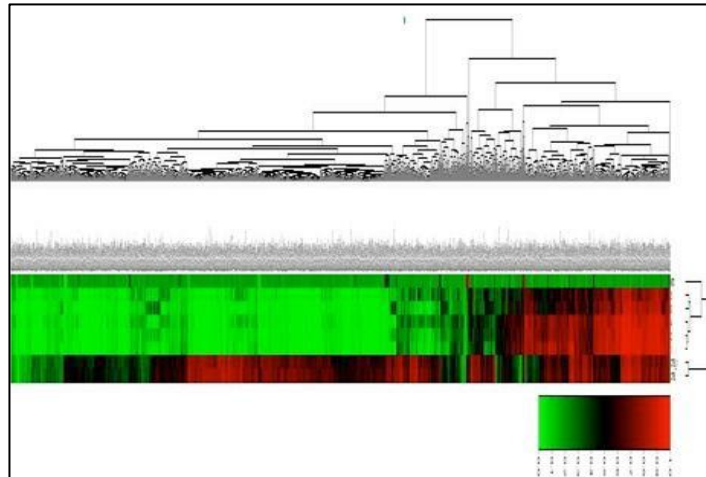
Örneklerin farklı kategorilere göre gruplandırıldığı denetimli hiyerarşik kümelerin analizi de aşağıda gösterilen örnek tipine, patolojik dereceye veya histolojik aşamaya göre ilginç genleri ortaya çıkarmak için gerçekleştirilmiştir. (Şekil 5.2)



Şekil 5.2. Denetimli hiyerarşik kümelerin patolojik derecesi veya histolojik aşaması analizi

Bu tür analizler, numunelerin menşei tarafından da yapılmıştır.

Metillenmiş genler, hastalığın başlangıcı ve ilerlemesi boyunca farklı mesane kanseri örneklerinde tanımlanmıştır. Seçilen 8 örnek boyunca farklı şekilde metillendikleri için seçilen farklı genlerin yoğunluğundaki varyasyonlar gösterilmektedir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. Farklı şekilde metillenmiş farklı genlerin yoğunluğundaki varyasyon

Seçilen genler tümör baskılayıcı fonksiyona (BRCA1, SFRP1) sahiptir veya mezenkimal epitel geçiş sürecine (EDRNB, E-CADHERIN) ve apoptoz (CFTR, DAPK1) ve hücresel adhezyon (TIMP3, MT1A) süreçlerine katılır.). Aynı zamanda birçok geni eşzamanlı olarak karakterize etmek için kullanılan ve bireysel karakterizasyonu onu hedefleyen oldukça odaklanmış çalışmalar gerektiren yaklaşımın büyük faydasını da yansıtır. Tanımlanan genlerin karakterizasyonu, en iyi teşhis doğruluğunu sağlayabilen aday genleri seebilmenin anahtarıdır.

5.5.4. Aday genlerin hipermetilasyonunu susturma ile ilişkilendirmek için fonksiyonel analiz

İdrarda CpG dizileri kullanılarak keşif fazı ile bu genlerin susturulması birleştirilerek epigenetik profilde tanımlanan adayların metilasyonunun ilişkisi mesane kanseri tümörleri satırlarında değerlendirilmeye başlanmıştır. Tamamlayıcı bir analiz olarak, iki mesane kanseri soyunun moleküler profili, ifade dizileri (Agilent) kullanılarak demetile edici ajan olan azasitidin ile tedavi edildikten sonra gerçekleştirildi. Aşağıda, mesane kanserinin iki hücre dizisi olan RT4 ve J82'de olduğu gibi, daha önce bahsedilen genlerin ekspresyonu, bu hücre hatlarının, genin metillenmiş olması koşuluyla gen ekspresyonunu geri alan bir demetile edici ajan olan azasitidine çıkarılması için artar ve metillenmemişse genin ifadesini değiştirmez.

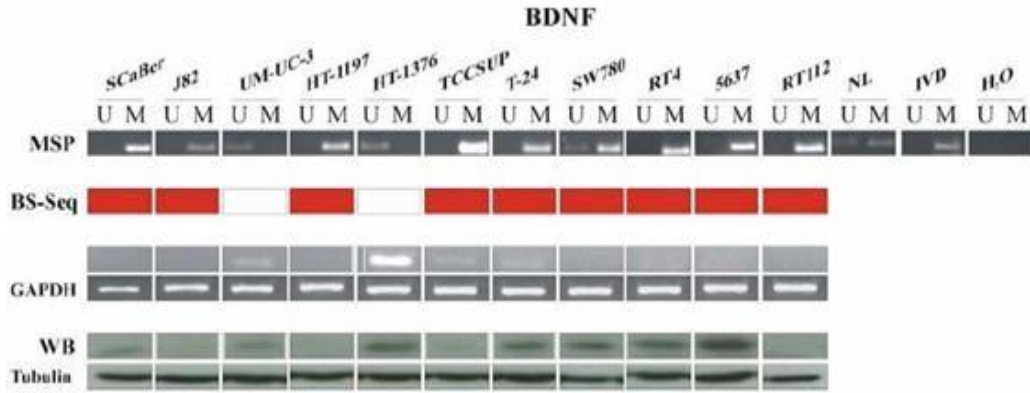
5.5.5. BDNF metilasyonunun biyolojik ve klinik ilgisinin karakterizasyonu

İdrarda CpG dizileri kullanılarak keşif fazı birleştirilerek epigenetik profilde tanımlanan adayların metilasyonu ile bu genlerin susturulması arasındaki ilişki, mesane kanseri tümör hatlarının bilgileri tümörlerle ve idrarla bütünleştirilerek değerlendirilmeye başlanmıştır. Polimeraz metilasyondaki reaksiyon (MS-PCR) gibi bağımsız yöntemlerle örneklerdir. 40-50 aday geni optimize edebilmek istiyoruz, ancak hem zaman hem de bütçe sınırlamaları nedeniyle, en azından karakterizasyonu aşağıda gösterilen seçilmiş bir gen olan BDNF için karakterize etmeye başlamak mümkün olmuştur. CpG metilasyon ada dizisinde analiz edilen seçilmiş idrarda BDNF geninin nasıl farklı şekilde metillendiği görülebilir (Nawrockis, 2002).

5.5.6. Metilasyon durumu bisülfite işlenmiş DNA üzerinde iki metilasyon PCR'sinin optimize edilmesiyle belirlenmiştir

Primerler, hem hücre hatları ile in vitro hem de insan dokusu ve idrar numuneleri ile BDNF metilasyonunu daha uygun fiyatlı, ucuz ve hızlı metodolojilerle karakterize etmek için iki prosedür gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır. Primerler, hem hücre hatları ile laboratuvar ortamında hem de insan dokusu ve idrar numuneleri ile BDNF metilasyonunu daha uygun fiyatlı, ucuz ve hızlı metodolojilerle karakterize etmek için iki prosedür gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır. Bir yandan metilasyon durumu, DNA bisülfite (BS-Seq) içindeki CpG adalarının sekanslanmasıyla analiz edildi ve diğer yandan metillenmiş DNA için spesifik olan veya metillenmemiş primerlerle P CR metilasyon (MSP) tasarlandı. Sekanslama yoluyla metillenmiş çizgilerin de MSP ile metillendiği ve WB ile ekspresyonlarını yitirdikleri görülebilir.

Aşağıdaki panel, farklı mesane hücre çizgilerinde BDNF promotörünün bisülfite dizilmesi ile karakterizasyonunu göstermektedir.



Şekil 5.4. BDNF promotörünün bisülfite dizilmesi ile karakterizasyonunu göstermektedir

Üst kısım, kırmızı ve turuncu ile gösterilen r sekanslama primerlerini tasarlamak için incelenen ve karakterize edilen BDNF promoter sekansını ve mavi ile gösterilen metilasyon PCR'lerinde analiz edilen alanı gösterir. CpG adalarının her biri, laboratuvarında sahip olduğumuz 11 mesane hücre dizisinden DNA'da dizilenmiş 1'den 35'e kadar numaralandırılmıştır. Bir CpG adasının metillenmesi durumunda karelerde siyah olarak, metillenmemişse beyaz karelerde yansıtıldığı görülebilir. Metillenmemiş

hatlar (UM-UC-3 ve HT1376) ve az ya da çok metillenmiş hatlar vardır. Metillenmiş (RT4) bir hücre hattının temsili bir kromatogramının alt kısmında, bisülfid muamelesi urasillerdeki ve iminlerdeki CpG adalarını değiştirdikçe metillenmemiş başka bir hücre çizgisi (UM-UC-3) gözlenebilir Hücre hattına göre, metillenmiş ya da değil (Koshikawa *et al*, 1989). Son olarak, BDNF metilasyonu, vakaların% 81,2'sinde metilasyonun bulunduğu 98 mesane tümöründen oluşan bir dizi ile karakterize edilmiştir. Bu tümörlerde histolojik evrenin dağılımı, pTa (n = 23), pT1 (n = 31), pT2 (n = 17), pT3 (n = 24) ve pT4 (n = 4) şeklindedir. Düşük dereceli (n = 25) ve yüksek dereceli (n = 75) histolojik derece. Sırasıyla Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney'in istatistiksel yöntemleri kullanılarak BDNF metilasyonu ve histolojik evre (p = 0.027) ve tümör derecesi (p = 0.005) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu.

Son olarak, ELISA'lar kullanılarak dizide tanımlanan bazı adayların ölçümünü optimize etmek için çaba sarf edilmektedir.

Mesane kanseri olan hastalardan ve mesleki maruziyet riski taşıyan kişilerden idrar numunelerinin toplanması mümkün olmuştur. Şimdiye kadar toplanan örnek serilerinde, DNA ve RNA ekstraksiyon protokolleri yeni Translasyonel Onkoloji laboratuvarında optimize edildi, böylece idrardaki nükleik asitlerin miktarı ve kalitesi önerilen analizler için yeterince yüksek. Açıklanan MS-PCR tekniklerine ek olarak.

CpG dizilerini idrar örneklerinde ve hatta tümörlerde 500 ng başlangıç genomik DNA kullanarak 1500 CpG adasından oluşan bir dizide uygulamak başardı. Bu çalışmalar, bu proje için açıklanan yenilikçi stratejileri önermek için bu yüksek etkili analizleri idrar örnekleri üzerinde gerçekleştirmenin mümkün olduğunu doğrulamaktadır. Gelecekteki bir miRNA analizi projesinde kullanabileceğimiz 40-50 ml hacimli idrar örneklerinden 250 ile 2000 ng arasında değişen miktarlarda toplam RNA elde etmeyi başardık.

İdrarın hücresel fraksiyonu ile çalışarak, idrarın hücreliliği değişken olmasına rağmen, RNA miktarının sınırlayıcı olabileceğini bulamadık, çünkü toplam miktardan başlayarak miRNA'ların çok parametrelili ölçümünün optimizasyonunu başardık, 100

ng'den az RNA. Bu alışmalar, bu yüksek etkili analizleri, talep edilecek gelecekteki projede çok sayıda adayın bulunduğu miRNA dizileri ile önermenin uygun olduğunu doğrulamaktadır. Teknikleri optimize edebilmemize rağmen, miRNA'ların daha büyük bir karakterizasyonuyla devam edebilmek istediğimiz için sonuçlarımızın başlangıç niteliğinde olduğunu düşünüyoruz.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1.Sonuçlar

Bu tezde sunulan araştırma, mesane kanseri için üriner biyobelirteçlerin multiparametrik analizi için bir protein çipinin geliştirilmesine odaklanmıştır. İşaretçilerin seçimine ve seçilen işaretleyicilerin tespiti ve miktarının belirlenmesi için çok parametrelili bir immünoassay platformunun geliştirilmesine karşılık gelen iki bölüme ayrılırlar.

Başlangıçta, ilgilenilen belirteçlerin seçimi iki çalışma ile gerçekleştirildi. İlk pilot çalışma, mesane kanseri teşhisi için bir belirteç paneli tanımlamayı mümkün kıldı. Bunu yapmak için, değerlendirilecek belirteçler ilk olarak proje ortaklarından biri tarafından oluşturulan bir moleküler mesane kanseri modeli (acil durum biyolojik geliştirme) kullanılarak tanımlandı. Tanımlanan belirteçler daha sonra ticari ELISA kitleri kullanılarak değerlendirildi ve idrar örneklerinde kantifikasyonlarına izin verildi. Değerlendirme, ölçülebilirlik ve tespit edilebilirliğe ve ardından mesane kanserli hastalardan alınan idrar örneklerindeki belirteçlerin seçiciliğine odaklandı. İlk yirmi belirteçten yalnızca on tanesi hem idrarda ölçülebilirlik, hasta örneklerinde saptanabilirlik hem de mesane kanseri için seçicilik gösterdi. Bireysel tanısal performansların değerlendirilmesinin ardından ve belirteçlerin kombinasyonunda beş tanesi BCPC'yi oluşturmak için seçildi: V.E.G.F, M.M.P-9, IL8, PTGS2 ve E.N-2. Gerçekten de markörlerin en etkili kombinasyonlarından biridir. Ek olarak, en iyi bireysel performansı sunan M.M.P-9 marköründen daha üstün bir genel performansa sahiptir.

Pilot çalışmanın aksine, ikinci çalışma mesane kanseri teşhisi ile ilgili değildi, ancak nüksüne yönelikti. Daha spesifik olarak, ikinci çalışmanın amacı, tekrarlayan mesane kanseri teşhisi için idrar belirteçlerinin potansiyelini ve klinik parametreleri değerlendirmektir. Bu nedenle bu değerlendirme iki hasta grubu üzerinde yapılmıştır: nükseden mesane kanseri olan hastalar ve mesane kanseri ile izlenen ancak nüksetmeyen hastalar. Daha sonra, en iyisi 0,91 A.U.C değerine ulaşan ve aynı zamanda bireysel parametrelerden daha iyi performans gösteren birkaç çoklu regresyon modeli

tanımlandı. Bu modele dayanan HCC, bu nedenle aşağıdaki klinik ve moleküler parametreleri içerir: önceki nökslerin sayısı, BCG tedavilerinin sayısı, tanı anında tümörün evresi, CDH-1, IL-8, Er.bB -2, IL-6, EN-2 ve VEGF.

İkinci bir adımda, seçilen markörlerin kantifikasyonu için çok parametrelili bir test geliştirildi. 96 oyuklu mikrotitre plak formatında otomatik, yüksek hızlı bir platformdur. Daha özel olarak, seçilen yöntem, bir sandviç tipi bağışıklık tahlilidir. İkincisi, AXO Science'ın uzmanlığı sayesinde protein çip formatında geliştirildi. Yakalama antikor grafiklerinin matrisleri, otomatik bir biriktirme makinesi kullanılarak mikrotitre plakalarının kuyusunun dibinde üretildi. Yakalama antikorları, analitler ve saptama antikorları arasındaki etkileşimin tespiti için enzimatik ve kolorimetrik bir yöntem kullanıldı.

Bu platformun geliştirilmesi BCPC ile başladı. Markörlerden üçü (V.E.G.F, M.M.P-9 ve I.L-8), çok parametrelili immünolojik teste başarıyla entegre edildi, ancak P.T.G.S-2 saptaması için yüksek performanslı bir immünolojik test elde etmek mümkün değildi. Son olarak, BCPC'deki son belirteç E.N-2, başka bir immünolojik test formatının konusuydu.

İkinci biyobelirteç seçim çalışması paralel olarak gerçekleştirildi. Bu çalışmanın sonu ve HCC'nin son tanımı, bu nedenle, BCPC'den HCC'ye çok parametrelili immünolojik testin geliştirilmesinden geçişi işaret etti. E.N-2 işaretçisi haricinde, tüm HCC markörleri, çok parametrelili immünoassay'e entegre edilebildi. Ayrıca, HCC'ye dahil olmayan bir markör olan M.M.P-9'u da içerir. İlk optimizasyon adımları, farklı reaktifler arasında sınırlı bir çapraz reaksiyon ile tatmin edici sonuçlar elde etmeyi mümkün kıldı. Bununla birlikte, analitik doğrulama oluşturmada önce, özellikle teste entegre edilecek son belirteçler olan C.D.H-1 ve Er.bB-2 için daha fazla optimizasyon yapılması gereklidir. Ayrıca, yakalama antikoru spesifik olarak E.N-2 proteinini tanıyan bir aptamer ile değiştirilerek E.N-2 markörünü sandviç formatında platforma entegre etmek de mümkündür. Son olarak, doğrulanmış analitik platform ve daha fazla sayıda hasta idrar numunesi üzerinde (yaklaşık 150) HCC'nin klinik doğrulaması

planlanır. Tez, mesane kanseri hastalarını biyobelirteç profillerini kullanarak katmanlara ayırmak için yeni bir kavram geliştirmeyi amaçlamaktadır. HCC'ye yol açan çalışma, sadece tekrarlayan mesane kanserinin tanısall yönünü değerlendirdi. Ancak, sonraki klinik değerlendirmeler rekürrensi tahmin etmeye yönelik olacaktır. Bu nedenle, son hale getirilmiş platform, klinik bir bağlamda belirteç profillerinin belirlenmesini ve patolojinin, daha özel olarak nüksün ilerlemesini tahmin etmek için bir dizi kural geliştirmeyi mümkün kılmalıdır.

Böyle bir tahmin aracı, mesane kanseri olan hastaların yönetimi için faydalı olacaktır. Aslında, ikincisi yüksek bir nüks oranına sahiptir ve nüks riskinin belirlenmesinin iyileştirilmesi, her hasta için optimal ve kişiselleştirilmiş bakıma izin verecektir. Son olarak, platformumuzda çeşitli parametrelerin analiz edilmesi ile elde edilen bilgiler sayesinde bu kişiye özel tıp kavramı diğer kanserlere veya patolojilere uygulanabilir.

Bireysel belirteçler önemli bir tanı veya öngörücü rol oynayabilir ve bu klinik kullanım laboratuvarlarda klinik otomatikleştirilmiş şekilde olabilir. CpG metilasyon adalarının dizileri, hastalığın erken tespiti için faydalı olan, mesane kanserinin tümörjenez ve ilerlemesiyle klinik ve biyolojik olarak ilgili olan yeni bireysel epigenetik profillerin ve adayların tanımlanmasına izin vermiştir.

BDNF'nin doku örneklerinde, idrarda ve hücre dizilerinde entegre bir şekilde karakterizasyonu, metilasyonla epigenetik olarak sürdürülmüş ve mesane kanseri olan hastaların teşhisi ve tümör katmanlaşması için klinik faydası olan yeni bir genin tanımlanmasına olanak sağlamıştır.

Daha fazla sayıda riskli birey belirlemek ve hâlihazırda elde edilen sonuçları pekiştirmek için örnek toplamayı artırmak gereklidir.

Hem metilasyon hem de miRNA seviyelerinde tanımlanan diğer adayları karakterize etmek ve aynı zamanda erken invazif olmayan saptamaya izin veren işaretçileri tanımlamak için tamamlayıcı ve bağımsız doğrulamalar gerçekleştirmek gereklidir.

6.2. Öneriler

Tez, hastalığın başlangıcı bağlamında yeni tümörijenik değişikliklerin biyolojik, fonksiyonel ve klinik karakterizasyonunda, risk altındaki çalışan popülasyonun örneklem büyüklüğünü artırarak genelleştirilmiş erken teşhis için yararlı olabilecek yenilikçi bulgulara izin vermiştir. Önerilen yaklaşımı tamamlayabilmeyi diliyoruz ve bunun için bir sonraki çağrıda finansman talep edeceğiz, çünkü bu, profil tanımlanmış erken teşhis için diğer adayların klinik yararlarını karakterize etmek, kanserojenlerle olası değişiklik ilişkilerini tanımlamak ve yeni belirteçler geliştirmek için adreslenmemiş hedefler uygulamamıza izin verecek. Non-invaziv, risk altındaki Irak nüfusu için faydalı ve daha küresel ölçekte toplumdaki hastalıkları önlenmesi gerekiyor.

KAYNAKLAR

- A. Benchechrone, HA El Alj, H. Essayegh, A. Iken, Y. Nouini, A. Lachkr, et al. Invasive bladder tumors: retrospective study of 225 cases *Annals of urology*. 2003; 37: 279–283.
- A. Loskog, C. Ninalga, G. Paul-Wetterberg, M. de la Torre, P.-U. Malmstrom, T.H. Totterman, Human bladder carcinoma is dominated by T-regulatory cells and Th1 inhibitory cytokines, *J Urol*, 177 (2007), pp. 353-358.
- Ahram M, Petricoin EF (2008) Proteomics discovery of disease biomarkers. *Biomark Insights* 3: 325– 333.
- Aleman A Cebrian V, Alvarez M, Lopez V, Orenes E, Lopez-Serra L, Algaba F, Bellmunt J, Lopez-Beltran A, Gonzalez-Peramato P, Cordon-Cardo C, Garcia J, del Muro JG, Esteller M, Sanchez-Carbayo M. Identification of PMF1 methylation in association with bladder cancer progression. *CCR* 2008, 814: 8236-43.
- Anthony J. Brown. Delayed surgery for bladder cancer increases mortality (full article available in Spanish). *Reuters Health Information*, March 2009. Last accessed March 28, 2009.
- Babjuk M, Kostirova M, Mudra K, Pecher S, Smolova H, Pecan L, Ibrahim Z, Dvoracek J, Jarolim L, Novak J, Zima T (2002) Qualitative and quantitative detection of urinary human complement factor H-related protein (BTA stat and BTA TRAK) and fragments of cytokeratins 8, 18 (UBC rapid and UBC IRMA) as markers for transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 41: 34–39.
- Beatriz Suarez-Baena^{1,4}, Nikaury Encarnacion-Encarnacion^{2,4}, Beatriz Valladares-Lobera^{3,4}, *Medicina y Seguridad del Trabajo*, version On-line ISSN 1989-7790 version impresa ISSN 0465-546X, *Med. segur. trab.* vol.61 no.239 Madrid abr./jun. 2015.
- Belasla Nacer, chu tizi-ouzou: Cystectomies In Locally Advanced Bladder Tumors 2014.
- Benedetto P, Masselli G, Spagnoli U, Terracini B. *The Cancer Factory The IPCA of Cirie*. Turin: Einaudi; 1976.
- Billerey C, Sibony M, Gattegno B, Chopin D (2001) Anatomie pathologique des tumeurs superficielles de la vessie. *Prog En Urol* 11: 805–863.
- Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff AS, Bossard N (2013) National estimate of the incidence and mortality from cancer in France between 1980 and 2012. Part 1 - Solid tumors (Institute for Monitoring sanitary).
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69: 89–95.
- Bouchot O, Zerbib M. Diagnosis of an invasive bladder tumor. *Progress in urology* (2002), 12, No:5, (769-772).
- Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y (2013) Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 63: 234–241.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma, *Nature*, 507 (7492) (2014), pp. 315-322.

- Chen M-F, Lin P-Y, Wu C-F, Chen W-C, Wu C-T (2013a) IL-6 expression regulates tumorigenicity and correlates with prognosis in bladder cancer. *PLoS ONE* 8: e61901.
- Chopin D, Gattegno B (2001) Superficial tumors of the bladder. *Prog Urol* 11: 1045–1064.
- Chou R, Buckley D, Fu R, Gore JL, Gustafson K, Griffin J, Grusing S, Selph S (2015) Emerging approaches to diagnosis and treatment of non-muscle-invasive bladder cancer (Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US)).
- Clark PE, Agarwal N, Biagioli MC, Eisenberger MA, Greenberg RE, Herr HW, Inman BA, Kuban DA, Kuzel TM, Lele SM, Michalski J, Pagliaro LC, Pal SK, Patterson A, Plimack ER, Pohar KS, Porter MP, Richie JP, Sexton WJ, Shipley WU, Small EJ, Spiess PE, Trump DL, Wile G, Wilson TG, Dwyer M, Ho M (2013) Bladder cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 11: 446–475.
- Cordon-Cardo C, Reuter VE, Lloyd KO, Sheinfeld J, Fair WR, Old LJ, Melamed MR (1988) Blood group-related antigens in human urothelium: enhanced expression of precursor, LeX, and LeY determinants in urothelial carcinoma. *Cancer Res* 48: 4113–4120.
- Coulange C, ROSSI D. Epidemiology and diagnosis of bladder tumors. *Rev Prat* 1997; 47: 369-73.
- D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144 (2011), pp. 646-674.
- D.A. Solomon, J.S. Kim, J. Bondaruk, S.F. Shariat, Z.F. Wang, A.G. Elkahouloun, et al. Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer *Nat Genet*, 45 (12) (2013), pp. 1428-1430.
- DefiLippo NP, Fortunato RP, Means H.z: Intravenous urography: important adjuvant for diagnosis of bladder tumor. *Br. J. Urol.* 1984: 502–505.
- Diamandis M, White NMA, Yousef GM (2010) Personalized medicine: marking a new epoch in cancer patient management. *Mol Cancer Res* 8: 1175–1187.
- Droller MJ (2004) Urothelial Tumors (BC Decker Inc).
- Durdux C. et al: Prognostic factors of infiltrating bladder tumors. *Cancer radiothe.*, 1998 Sep-Oct, 2 (5), pp. 491-499.
- E. Mylona, A. Zarogiannos, A. Nomikos, I. Giannopoulou, I. Nikolaou, A. Zervas, et al. Prognostic value of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of hMSH2 and hMSH6 in urothelial carcinoma of the bladder, *APMIS*, 116 (1) (2008), pp. 59-65.
- Edwards NJ, Oberti M, Thangudu RR, Cai S, McGarvey PB, Jacob S, Madhavan S, Ketchum KA (2015) The CPTAC Data Portal: A resource for cancer proteomics research. *J Proteome Res* 14: 2707–2713.
- F.M. Platt, C.D. Hurst, C.F. Taylor, W.M. Gregory, P. Harnden, M.A. Knowles Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer, *Clin Cancer Res*, 15 (19) (2009), pp. 6008-6017.
- Felix AS, Soliman AS, Khaled H, Zaghloul MS, Banerjee M, El-Baradie M, El-Kalawy M, Abd-Elsayed AA, Ismail K, Hablas A, Seifeldin IA, Ramadan M, Wilson ML (2008) The changing patterns of bladder cancer in Egypt over the past 26 years. *Cancer Causes Control* 19: 421–429.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources,

- methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136: E359–E386.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D, Forman D, Bray F (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 <http://globocan.iarc.fr/> (consulte le 09.01.2016).
- Fossa SD, Ous S, Berner U. Clinical significance of the "palpable mass" in patients with muscle infiltrating bladder cancer undergoing cystectomy after preoperative radiotherapy. *Br. J. urol.* 1991 Jan; 67 (1): 54-60.
- Frangogiannis NG (2012) Biomarkers: hopes and challenges in the path from discovery to clinical practice. *Transl Res J Lab Clin Med* 159: 197.
- Freidlin B, McShane LM, Korn EL (2010) Randomized clinical trials with biomarkers: design issues. *JNCI J Natl Cancer Inst* 102: 152–160.
- Fuge O, Vasdev N, Allchorne P, Green JS (2015) Immunotherapy for bladder cancer. *Res Rep Urol* 7: 65–79.
- G. Sjodahl, M. Lauss, S. Gudjonsson, F. Liedberg, C. Hallden, G. Chebil, et al. A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1, *PLoS One*, 6 (4) (2011), p. e18583.
- Garcia-Baquero R, Puerta P, Beltran M, Alvarez M, Sacristan R, Alvarez- Ossorio JL, Sanchez-Carbayo M. A novel panel of tumor suppressor genes in urine brings forward non-invasive diagnosis and prognosis of bladder cancer: a two center prospective study. *J Urol*, 190: 723-30, 2013.
- Gattegno B, Chopin D. Diagnosis. *Progres en urologie* (2001), 11, No: 5: 993 –1019.
- Gladell P. Paner, MD, Rodolfo Montironi, MD, W and Mahul B. Amin, Challenges in Pathologic Staging of Bladder Cancer: Proposals for Fresh Approaches of Assessing Pathologic Stage in Light of Recent Studies and Observations Pertaining to Bladder Histoanatomic Variances, *Adv Anat Pathol* 2017; 24: 113–127).
- Gogalic S, Sauer U, Doppler S, Preininger C (2015) Bladder cancer biomarker array to detect aberrant levels of proteins in urine. *The Analyst* 140: 724–735.
- Gonzalez CA. Occupation, work, coffee, and bladder cancer in the Maresme region. Barcelona: Autonomous University of Barcelona; 1983.
- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wings PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50:7-33.
- HAS, INCa (2010) ALD Guide Bladder cancer. GUIALDVESSMD10.
- Hong SK, Kwak C, Jeon HG, Lee E, Lee SE. Do vascular, lymphatic, and perineural invasion have prognostic implications for bladder cancer after radical cystectomy? *Urology*. 2005 Apr; 65 (4): 697-702.
- <https://www.worldlifeexpectancy.com/es/arab-emirates-bladder-cancer>.
- <https://www.worldlifeexpectancy.com/es/iraq-bladder-cancer>.
- InfoCancer (2015b) The different stages of bladder tumors <http://www.arcagy.org/infocancer/localizations/kidney-and-urinary-tract/cancer-bladder/forms-of-the-disease/the-different-stages.html>.
- J, Topham P (2007) Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *CMAJ Barratt Can Med Assoc J* 177: 361–368.
- J. Ferris, J. Garcia, O. Berbel and J.A. Ortega. Constitutional and occupational risk factors associated with bladder cancer. Systematic review. *Actas Urol Esp*. 2013; 37 513-522.

- J.D. Wolchok, H. Kluger, M.K. Callahan, M.A. Postow, N.A. Rizvi, A.M. Lesokhin, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma *N Engl J Med*, 369 (2) (2013), pp. 122-133.
- J.S. Ross, K. Wang, R.N. Al-Rohil, T. Nazeer, C.E. Sheehan, G.A. Otto, et al. Advanced urothelial carcinoma: next-generation sequencing reveals diverse genomic alterations and targets of therapy, *Mod Pathol*, 27 (2) (2014), pp. 271-280.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69–90.
- Kader AK, Liu J, Shao L, Dinney CP, Lin J, Wang Y, Gu J, Grossman HB, Wu X (2007) Matrix metalloproteinase polymorphisms are associated with bladder cancer invasiveness. *Clin Cancer Res* 13: 2614–2620.
- Kamat AM, Briggman J, Urbauer DL, Svatek R, Nogueras Gonzalez GM, Anderson R, Grossman HB, Prat F, Dinney CP (2016) Cytokine Panel for Response to Intravesical Therapy (CyPRIT): Nomogram of changes in urinary cytokine levels predicts patient response to Bacillus Calmette-Guerin. *Eur Urol* 69: 197–200.
- Kamat AM, Briggman J, Urbauer DL, Svatek R, Nogueras Gonzalez GM, Anderson R, Grossman HB, Prat F, Dinney CP (2016) Cytokine Panel for Response to Intravesical Therapy (CyPRIT): Nomogram of changes in urinary cytokine levels predicts patient response to Bacillus Calmette-Guerin. *Eur Urol* 69: 197–200.
- Kelloff GJ, Sigman CC (2012) Cancer biomarkers: selecting the right drug for the right patient. *Nat Rev Drug Discov* 11: 201–214.
- Kinders R, Jones T, Root R, Bruce C, Murchison H, Corey M, Williams L, Enfield D, Hass GM (1998) Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder. *Clin Cancer Res* 4: 2511–2520.
- Kluth LA, Black PC, Bochner BH, Catto J, Lerner SP, Stenzl A, Sylvester R, Vickers AJ, Xylinas E, Shariat SF (2015) Prognostic and prediction tools in bladder cancer: a comprehensive review of the literature. *Eur Urol* 68: 238–253.
- Konety BR, Nguyen T-ST, Dhir R, Day RS, Becich MJ, Stadler WM, Getzenberg RH (2000) Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4. *Clin Cancer Res* 6: 2618–2625.
- Kopparapu PK, Boorjian SA, Robinson BD, Downes M, Gudas LJ, Mongan NP, Persson JL (2013) Expression of VEGF and its receptors VEGFR1/VEGFR2 is associated with invasiveness of bladder cancer. *Anticancer Res* 33: 2381–2390.
- Koshikawa T, Leyh H, Schenck U.: Difficulties in evaluating urinary specimens after local mitomycin therapy of bladder cancer. *Diagn Cytopathol* 1989; 5: 117.
- Kulasingam V, Diamandis EP (2008) Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol* 5: 588–599.
- Landman J, Chang Y, Kavalier E, Droller MJ, LIU BC.: Sensitivity and specificity of NMP22, telomerase, and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology* 1998; 52 (3): 398-402.
- Lehmann S, Roche S, Allory Y, Barthelaix A, Beaudeau J-L, Berger F, Betsou F, Borg J, Dupuy A, Garin J, Quillard M, Lizard G, Peoc'h K, Riviere M, Ducoroy P (2009) Recommandations preanalytiques pour les analyses de proteomique clinique des fluides biologiques. *Ann Biol Clin (Paris)* 67: 629–639.

- Lin J, Kadlubar FF, Spitz MR, Zhao H, Wu X. A modified host cell reactivation assay to measure DNA repair capacity for removing 4-aminobiphenyl adducts: a pilot study of bladder cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005;14(7):1832–1836.
- Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, Wei D, Young MJ, Duncan, Soloway MS, Block NL.: Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol* 2000; 163 (1): 348-356.
- Lopez V, Gonzalez-Peramato P, Sole J, Serrano A, Algaba F, Cigudosa JC, Vidal A, Bellmunt J, Heir O, Sanchez-Carbayo M. Identification of Prefoldin amplification in bladder cancer using comparative genomic hybridization (CGH) arrays of urinary DNA and fluorescent in situ hybridization (FISH) in tissue arrays. *J Transl Med*, 11: 182, 2013.
- Lotan Y, Bensalah K, Ruddell T, Shariat SF, Sagalowsky AI, Ashfaq R. Pro-spective evaluation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder. *J Urol* 2008; 179: 2164-9.
- M. Castillo-Martin, J. Domingo-Domenech, O. Karni-Schmidt, T. Matos, C. Cordon-Cardo, Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis; *Urol Oncol*, 28 (2010), pp. 401-408.
- Mahnken A, Kausch I, Feller AC, Kruger S (2005) E-cadherin immunoreactivity correlates with recurrence and progression of minimally invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Oncol Rep* 14: 1065–1070.
- McGrath M, Wong JY, Michaud D, Hunter DJ, De Vivo I. Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007;16(4):815–819.
- Messing EM, Valencourt A. Hematuria screening for bladder cancer. *J Occup Med* 1990; 32: 838.
- Morgan R, Bryan RT, Javed S, Launchbury F, Zeegers MP, Cheng KK, James ND, Wallace DMA, Hurst CD, Ward DG, Knowles MA, Pandha H (2013) Expression of Engrailed-2 (EN2) protein in bladder cancer and its potential utility as a urinary diagnostic biomarker. *Eur J Cancer* 49: 2214–2222.
- Mueller J, von Eggeling F, Driesch D, Schubert J, Melle C, Junker K (2005) ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *Eur Urol* 47: 885–894.
- N. Ismaili; Mr. Mesmoudi; H. Ras Bladder cancer in Morocco, *Cancer Manual / Moroccan Cancer Society / January 2017.*
- Nawrockis S, Skacel T, Skoneczna I.: Pharmacotherapy of bladder cancer - practice and prospects. *Expert Opin Pharmacother* 2002; 3 (6): 671-679.
- Nishizuka SS, Mills GB (2015) New era of integrated cancer biomarker discovery using reverse-phase protein arrays. *Drug Metab Pharmacokinet* 31: 35-45.
- P. Sanchez-Seco Higuera, *Cancer de vejiga, SEMERGEN - Medicina de Familia*, Volume 30, Issue 6, 2004, Pages 286-293.
- Pfister C, Roupret M, Neuzillet Y, Larre S, Pignot G, Quintens H, Houede N, Comperat E, Colin P, Roy C, Davin JL, Guy L, Irani J, Lebreton T, Coloby P, Soulie M (2013) CCAFU 2013 Onco-Urology Recommendations: Bladder tumors. *Prog En Urol* 23, Supplement 2: S105 – S125.
- Poste G (2011) Bring on the biomarkers. *Nature* 469: 156–157.

- Ramachandran N, Srivastava S, LaBaer J (2008) Applications of protein microarrays for biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl* 2: 1444–1459.
- Reddy G, Dalmaso EA (2003) SELDI ProteinChip® Array Technology: protein-based predictive medicine and drug discovery applications. *J Biomed Biotechnol* 2003: 237–241.
- Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, Müller M (2013) PanelomiX: A threshold- based algorithm to create panels of biomarkers. *Transl Proteomics* 1: 57–64.
- Rosser CJ, Chang M, Dai Y, Ross S, Mengual L, Alcaraz A, Goodison S (2014a) Urinary protein biomarker panel for the detection of recurrent bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23: 1340–1345.
- Sanchez-Carbayo M. Hypermethylation in bladder cancer: biological pathways and translational applications. *Tumor Biol* 33: 347-61, 2012
- Sanchez-Carbayo M, Espasa A, Chinchilla V, Herrero E, Megias J, Mira A, Soria F (1999) New electrochemiluminescent immunoassay for the determination of CYFRA 21-1: analytical evaluation and clinical diagnostic performance in urine samples of patients with bladder cancer. *Clin Chem* 45: 1944– 1953.
- Sanchez-Carbayo M, Schwarz K, Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Mundel P. Tumor suppressor role for myopodin in bladder cancer: the s of nuclear expression of myopodin is cell-cycle dependent and predicts clinical outcome. *Oncogene* 2003; 22: 5298-305.
- Schrohl A-S, Holten-Andersen M, Sweep F, Schmitt M, Harbeck N, Foekens J, Brunner N, European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Receptor and Biomarker Group (2003) Tumor markers: from laboratory to clinical utility. *Mol Cell Proteomics* 2: 378–387.
- Schrohl A-S, Holten-Andersen M, Sweep F, Schmitt M, Harbeck N, Foekens J, Brunner N, European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Receptor and Biomarker Group (2003) Tumor markers: from laboratory to clinical utility. *Mol Cell Proteomics* 2: 378–387.
- Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y (2007) Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer* 109: 1106–1113.
- Shariat SF, Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI (2008) Critical evaluation of urinary markers for bladder cancer detection and monitoring. *Rev Urol* 10: 120–135.
- Sharma S, Ksheersagar P, Sharma P (2009) Diagnosis and treatment of bladder cancer. *Am Fam Physician* 80: 717–723.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 5-29.
- Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, Hennenlotter J, Kruck S, Stenzl A (2009) Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol* 27: 295– 300.
- Van Tilborg AA, Bangma CH, Zwarthoff EC (2009) Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol* 16: 23–30.
- Van Tilborg AA, Bangma CH, Zwarthoff EC (2009) Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol* 16: 23–30.
- Viswanath S, Zelhof B, Ho E, Sethia K, Mills R. Is routine urine cytology useful in the haematuria clinic ? *Ann R Coll Surg Engl* 2008; 90: 153-5.

- Wang D-L, Song Y-L, Zhu Z, Li X-L, Zou Y, Yang H-T, Wang J-J, Yao P-S, Pan R-J, Yang CJ, Kang D-Z (2014) Selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor with high affinity and specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 453: 681–685.
- X.R. Wu, Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways, *Nat Rev Cancer*, 5 (2005), pp. 713-725.
- Yu X, Schneiderhan-Marra N, Joos TO (2010) Protein microarrays for personalized medicine. *Clin Chem* 56: 376–387.



Yayınları:

Abdulwahhab, H. H., Dölarslan, M., Al Marjani, M. F. 2021. Identification of Bladder Cancer at early age in Iraq used by Tumor Marker and Genes Characterization, Annals of Tropical Medicine & Public Health 24(S2): SP24212.

