



T.C.
ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK DERECELİ T1 EVRE MESANE TÜMÖR DOKUSU
ÖRNEKLERİNE AİT PROTEOM PROFİLİNİN LC-MS/MS İLE
ANALİZ EDİLMESİ**

TUNAY DOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

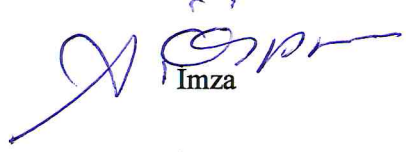
DANIŞMAN
Prof. Dr. Aysel Özpınar

İSTANBUL- 2019

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Program: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
Tez Başlığı: YÜKSEK DERECELİ T1 EVRE MESANE TÜMÖR DOKUSU
ÖRNEKLERİNE AİT PROTEOM PROFİLİNİN LC-MS/MS
İLE ANALİZ EDİLMESİ
Öğrencinin Adı-Soyadı: Tunay Doğan
Savunma Sınavı Tarihi: 29/05/2019

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı Prof. Dr. Aysel Özpınar
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi


İmza

Tez Danışmanı Prof. Dr. Aysel Özpınar
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi


İmza

Üye Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi


İmza

Üye Doç. Dr. Nurhan Özlü
Koç Üniversitesi


İmza

Üye Doç. Dr. Nurcan Tunçbağ
Orta Doğu Teknik Üniversitesi


İmza

Üye Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Uçal
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi


İmza

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

14.04.2019

Tunay Doğan



ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tüm mesane tümörleri içerisinde yüksek dereceli T1 evre tümörlerin (Hg-pT1) klinik olarak belirgin derecede heterojenite, nüks, progresyon ve kansere özgü mortalite gösterdiği bilinmekle birlikte, bu tümörlere ilişkin moleküler düzeydeki çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Hg-pT1 tümör dokuları ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokuları kullanılarak yapılan LC-MS/MS bazlı bu çalışmada ilgili dokuların proteom profillerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi'ndeki lisansüstü eğitimime başladığım ilk günden beri, bilgi birikimi ve çalışma disiplini ile bana yol gösteren, tezimin planlanması ve deneysel çalışmaların yapılması konusunda desteğini esirmeyen, kendisiyle çalışmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR'a,

Ne kadar yoğun olursa olsun yardım ve desteğini asla esirgemeyen, sabırla tüm sorularımı yanıtlayan Dr. Öğr. Üyesi Yasemin UÇAL'a,

Deneyle ve analizler için sonsuz bilgi birikimiyle bana destek olan Emel AKGÜN ile laboratuvar imkanlarını kullanmama izin veren Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL'a,

Bu tez çalışmasında kullandığım örnekler de dahil olmak üzere çok kıymetli hasta örneklerini toplamamda yardımcı olan İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji servisinde Prof. Dr. Asif YILDIRIM, Uzm. Dr. Turgay TURAN ve tüm servis personeline,

Manevi desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Onur KARAYİĞİT'e, motivasyon kaynağım Dicle Nur ÇEPİK'e ve biricik hayat arkadaşım Pınar DEMİR'e sonsuz teşekkür ederim.

Bugüne kadar maddi ve manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen annem Semra DOĞAN, babam Bayram DOĞAN ve kardeşim Boğaç Alparslan DOĞAN, sizler benim hazinemsiniz.

Tunay DOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Mesane Kanseri.....	5
2.1.1. Etiyoloji ve epidemiyoloji.....	6
2.1.1.1. Sigara.....	6
2.1.1.2. Meslek ve kimyasallar.....	7
2.1.1.3. Enfeksiyon.....	8
2.1.1.4. İlaçlar ve radyoterapi.....	8
2.1.1.5. Kahve ve alkol tüketimi.....	9
2.1.2. Patoloji.....	9
2.1.2.1. Mesane kanserinde sınıflandırma.....	10
2.1.2.2. Mesane kanserinde derecelendirme.....	11
2.1.2.3. Mesane kanserinde evrelendirme.....	11
2.1.3. Tanı ve tedavi.....	13
2.2. Mesane Kanserinin Oluşum Mekanizması.....	15

2.2.1. Onkogenler.....	15
2.2.2. Tümör baskılayıcı genler.....	17
2.2.3. Polimorfizmler.....	20
2.2.4. Epigenetik.....	21
2.2.5. Sinyal yolları ve metabolizma.....	21
2.3. Omik Bilimler.....	25
2.3.1. Proteomiks.....	26
2.3.1.1. İki boyutlu jel elektroforezi.....	27
2.3.1.2. Kütle spektrometresi.....	28
2.3.2. Mesane kanseri bazlı proteomik çalışmalar.....	31
2.3.2.1. İdrar bazlı proteomik çalışmalar.....	31
2.3.2.2. Serum bazlı proteomik çalışmalar.....	34
2.3.2.3. Doku bazlı proteomik çalışmalar.....	35
2.3.3. Yüksek performanslı biyobelirteçler.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Çalışma Dizaynı.....	41
3.2. Gereçler.....	42
3.3. Yöntemler.....	43
3.3.1. Dokuların homojenizasyonu ve protein ekstraksiyonu.....	43
3.3.2. Bradford metodu ile protein konsantrasyon tayini.....	44
3.3.3. FASP metodu ile örneklerin hazırlanması.....	44
3.3.4. LC-MS/MS ile örneklerin analizi.....	46
3.3.5. Progenesis QI ve biyoinformatik analizler.....	47

4. BULGULAR	48
4.1. Örneklerin Protein Konsantrasyonları.....	48
4.2. LC-MS/MS İle Proteinlerin Tanımlanması.....	49
4.2.1. Tümör dokuları ve sağlıklı dokular arasındaki protein farklılıkları.....	51
4.3. Tanımlanan Proteinlerin Moleküler Fonksiyon Analizi.....	55
4.4. Tanımlanan Proteinlerin Biyolojik Proses Analizi.....	58
4.5. Tanımlanan Proteinlerin STRING Veri Tabanında Etkileşim Analizi...59	
4.6. Galektin-3, S100A11, Fibronektin, HSP60, HSP70, HSP90AB1 ve HSP90B1 Proteinlerinin Dokulardaki Miktar Değişimi.....	66
4.7. Tanımlanan Proteinlerin Signor Veri Tabanında Yolak Analizi.....	70
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
7. KAYNAKLAR	84
8. EKLER	100
9. ÖZGEÇMİŞ	103

KISALTMALAR VE SİMGELER

Hg-pT1:	Yüksek Dereceli T1 Evre Mesane Tümörü
LC-MS/MS:	Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi
TOF:	Uçuş Süresi
MALDI:	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu
CE:	Kapiller Elektforezi
2DGE:	2 Boyutlu Jel Elektforezi
COX:	Siklooksijenaz
TNM:	Tümör Nod Metastaz
CIS:	Karsinoma İn Situ
TUR:	Transüretral Rezeksiyon
BCG:	Bacillus Calmette-Guerin
EGFR:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
CGH:	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
Rb:	Retinoblastoma
NAT:	N-asetil Transferaz
GST:	Glutasyon S-transferaz
VEGF:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
FGFR:	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
TSP-1:	Trombospondin-1
ECM:	Ekstraselüler Matriks
MMP:	Matriks Metalloproteinaz

NMP22:	Nükleer Matriks Protein 22
BTA:	Mesane Tümörü Antijeni
FISH:	Floresan İn Situ Hibridizasyonu
UPX:	Evrensel Protein Ekstraksiyon Kiti
FASP:	Filtre Yardımlı Örnek Hazırlığı
BSA:	Sığır Serum Albumini
PCA:	Temel Bileşenler Analizi
PBS:	Fosfat Tampon Solüsyonu
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TABLolar LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. IARC tarafından karsinojenik olarak tanımlanan ve gruplandırılan 11 önemli aromatik amin.....	7
Tablo 2. Mesane kanserinde sınıflandırma.....	10
Tablo 3. 1973 WHO ve 2004 ISUP/WHO derecelendirme sistemi.....	11
Tablo 4. UICC/AJCC 2009 TNM evrelendirme sistemi.....	12
Tablo 5. Mesane kanserinde sık kullanılan bazı biyobelirteçler.....	38
Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihaz ve aletler ile marka ve modelleri.....	42
Tablo 7. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler ile marka ve katalog numaraları.....	43
Tablo 8. BSA standartlarının konsantrasyonları ile boya solüsyonu ve BSA standartlarına ait absorpsiyon değerleri.....	48
Tablo 9. Örneklerle ait protein konsantrasyonları.....	48
Tablo 10. BSA standartlarının konsantrasyonlarına karşı absorpsiyon değerleri kullanılarak çizilen grafik ile hesaplanan eğri denklemi ve R ² değeri.....	49
Tablo 11. LC-MS/MS analizi ile tanımlanmış ve tümör dokularında anlamlı düzeyde (p< 0.05) artış ya da azalış gösteren proteinler.....	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Mesanenin anatomik ve fizyolojik yapısı.....	5
Şekil 2. Mesane kanserinde derecelendirme ve TNM sistemine göre evrelendirme...	13
Şekil 3. Mesane kanseri gelişiminde two- pathway modeli.....	16
Şekil 4. Mesane kanseri progresyonunda moleküler yollar ve deregüasyonları.....	24
Şekil 5. Temel omikler ve aralarındaki ilişki.....	25
Şekil 6. 2DGE’de proteinlerin iki boyutlu ayırımı.....	28
Şekil 7. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri.....	29
Şekil 8. UroVysion ile analiz sonrası kromozomal değişikliklerin görünümü	37
Şekil 9. Tez çalışmasında izlenen iş akışı ve hasta bilgileri.....	41
Şekil 10. Analiz edilen örneklerden bazılarının kromatogram görüntüleri.....	50
Şekil 11. Tümör ve sağlıklı dokularda tanımlanan tüm proteinlerin (n=1166) ve istatistiksel olarak anlamlı (p< 0.05) olan 90 proteinin Venn diyagramı.....	51
Şekil 12. Tümör ve sağlıklı kontrol dokusu örneklerinde tanımlanan proteinlere ait hiyerarşik kümeleme analizi.....	52
Şekil 13. Tümör ve sağlıklı kontrol dokusu örneklerinde tanımlanan proteinlere ait temel bileşenler analizi (PCA).....	52
Şekil 14. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerin moleküler fonksiyon analizi.....	56
Şekil 15. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerin moleküler fonksiyon analizi.....	57
Şekil 16. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerin biyolojik proses analizi.....	58
Şekil 17. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerin biyolojik proses analizi.....	59

Şekil 18. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerin STRING analizi.....	60
Şekil 19. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerin STRING analizi.....	61
Şekil 20. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerden hnRNA metabolizmasında görevli olanlara ait STRING ve Cytoscape ağ haritaları.....	62
Şekil 21. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerden protein sentezinde ve translasyonel regülasyonda görevli olanlara ait STRING ve Cytoscape ağ haritaları.....	63
Şekil 22. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerden Endoplazmik Retikulum stresi, mitokondriyal stres ve glikolizde görevli olanlara ait STRING ve Cytoscape ağ haritaları.....	64
Şekil 23. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerden ekstraselüler matriks organizasyonu ve hücrel adezyonda görevli olanlara ait STRING ve Cytoscape ağ haritaları.....	65
Şekil 24. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerden kas yapısı, kas kasılması ve hücre iskeletinin regülasyonunda görevli olanlara ait STRING ve Cytoscape ağ haritaları.....	66
Şekil 25. Galektin-3 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.....	67
Şekil 26. S100A11 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.....	67
Şekil 27. Fibronektin proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi....	68
Şekil 28. HSP60 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.....	68
Şekil 29. HSP70 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.....	69
Şekil 30. HSP90AB1 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi....	69
Şekil 31. HSP90B1 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.....	70
Şekil 32. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerden up-regülatör olanların Signor analizi.....	71

Şekil 33. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerden down-regülatör olanların Signor analizi.....	72
Şekil 34. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerden up-regülatör olanların Signor analizi.....	73
Şekil 35. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerden down-regülatör olanların Signor analizi.....	74



ÖZET

Mesane kanseri dünya genelindeki en yaygın kanser türlerinden biridir ve erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla 3.5 kat daha fazladır. Tüm mesane tümörleri içerisinde yüksek dereceli T1 evre tümörlerin (Hg-pT1) klinik olarak belirgin derecede heterojenite, nüks, progresyon ve kansere özgü mortalite gösterdiği bildirilmiştir. Mesane tümör dokusunu oluşturan hücelere ait progresif özelliklerin moleküler düzeyde aydınlatılabilmesi için proteomik yaklaşımların faydalı olacağı açıktır. Buna karşılık, literatüre bakıldığında bu konudaki dozu bazı çalışmaların oldukça sınırlı olduğu ve idrar bazlı biyobelirteç çalışmalarının gölgesinde kaldığı görülmektedir. Sadece Hg-pT1 tümör dokusunu hedef alan bir çalışma da bulunmadığından bu çalışmanın faydalı olacağı düşünülmektedir. Çalışma kapsamında 4 erkek hastadan alınan Hg-pT1 tümör dokuları ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokuları FASP metoduyla hazırlanmış ve LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Tanımlanan proteinlerden istatistiksel olarak anlamlı olan 90 tanesi biyoinformatik araçlarla değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, tümör dokularında Heteronükleer RNA metabolizması, translasyonel regülasyon aktivitesi, Endoplazmik Retikulum stresi, Mitokondriyal stres ve Warburg etkisine bağlı aerobik glikolizi tarif eden proteinlerin artış gösterdiği, hücrel adezyon ve hücre iskeletinin regülasyonundan sorumlu proteinlerin ise azalış gösterdiği anlaşılmıştır. Tanımlanan tüm proteinler arasından tümör dokularında artış gösteren Galektin-3, S100A11, Fibronektin, HSP60, HSP70 ile HSP90'ın analogları olan HSP90AB1 ve HSP90B1 proteinlerinin literatürden de hareketle Hg-pT1 tümörleri için prognostik önem taşıdığı görülmüştür. Bu bağlamda ilgili proteinlerin ileride mesane kanseri tedavisinde potansiyel terapötik hedefler ve biyobelirteçler olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: LC-MS/MS, Mesane kanseri, Proteomiks, T1 evre, Tümör dokusu.

SUMMARY

Analysis of the Proteome Profile of High-Grade T1 Stage Bladder Tumor Specimens by LC-MS/MS

Bladder cancer is one of the most common types of cancer in the world and its incidence is 3.5 times higher in men than in women. Among all bladder tumors, high-grade T1-stage tumors (Hg-pT1) are known to have clinically significant heterogeneity, recurrence, progression, and mortality. It is evident that proteomic approaches will be useful in order to elucidate the invasion of the cells forming the bladder tumor tissue at the molecular level. However, there are limited studies that target the non-muscle invasive bladder tumor tissues for the investigation to biomarker discovery and understand tumor progression. Therefore we aimed to assess the proteomic profiles of Hg-pT1 bladder tumor tissues. Hg-pT1 bladder tumor tissues obtained from 4 male patients and healthy bladder tissues near the tumor were prepared by FASP method and samples were analyzed by LC-MS/MS. The identified proteins were analyzed by bioinformatic approaches. In total, 1166 proteins were identified. Of these, 90 proteins were statistically significant ($p < 0.05$) between control and tumor tissues. Proteins that were found to be increased in tumor tissues ($n = 55$) were belonged to Heteronuclear RNA metabolism, translational regulation activity, Endoplasmic Reticulum Stress, Mitochondrial stress, and aerobic glycolysis. Whereas decreased proteins in tumor tissues ($n = 35$) were involved in cellular adhesion and regulation of the cell skeleton. Among all proteins, Galectin-3, S100A11, Fibronectin, HSP60, HSP70, and HSP90's analog HSP90AB1 and HSP90B1 proteins were found to increase in Hg-pT1 tumor tissues ($p < 0.05$). Proteomics studies based on LC-MS/MS can provide powerful information to understand the progression of bladder cancer. The proteins described in this study can be evaluated in the future as potential therapeutic targets and biomarkers for Hg-pT1 bladder tumors.

Key Words: LC-MS/MS, Bladder cancer, Proteomics, T1 stage, Tumor tissue.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelinde yüksek insidans oranı ve tedavi sonrasında diğer kanser türlerine kıyasla daha sık rekürrens ile karşılaşılması yönünden mesane kanseri, insan hayatını tehdit eden yaygın hastalıklardan biridir ve erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla 3.5 kat daha fazladır (5). Mesane tümörlerinin patolojik açıdan çok yönlü değerlendirilmesi, optimal tedavi yönetimi bakımından hayati öneme sahiptir. Tüm mesane tümörleri içerisinde yüksek dereceli T1 evre tümörlerin (Hg-pT1) klinik olarak belirgin derecede heterojenite, nüks, progresyon ve kansere özgü mortalite gösterdiği bildirilmiştir (174). T1 evre tümörler, mesanenin lamina propria tabakasına kadar invazyonun olduğu ancak muskularis propria tabakasına invazyonun olmadığı aşamayı tarif etmektedir. Bu evre hastalardan radikal sistektomi operasyonu ile mesanenin tamamı çıkarılmayan ve koruyucu tedavilerle takip edilenlerin %20-40'ında 5 yıl içerisinde tümörün progresyon gösterdiği bildirilmiş ve hastaların tümüne radikal sistektomi yapıldığında ise yaklaşık yarısına fazladan cerrahi uygulanmış olunacağı sonucu ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda Hg-pT1 tümörlerin lamina propria invazyonunun derinliği değerlendirilerek alt tiplerinin belirlenmesi ve tümör progresyonu ile ilişkilendirilmesi fikri gündeme gelmiş olsa da gerek bu konuda fikir birliğine varılamaması gerekse de TUR ile çıkarılan biyopsi materyalinin deformasyonuna bağlı olarak böyle hassas bir alt tiptenim patoloğlar tarafından çoğunlukla yapılamamasından dolayı bu fikir rutin kullanıma girememiştir (173, 174).

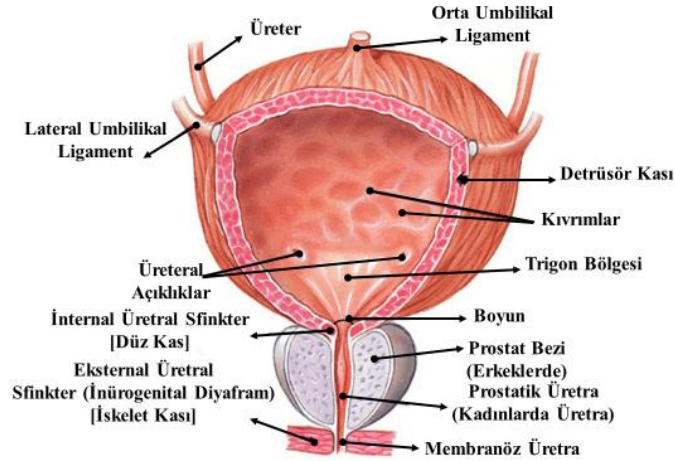
Mevcut durumda mesane kanseri tanısı için altın standart yöntem sistoskopi ve idrar sitolojisi birlikteliğidir. Mesane, yapısı gereği idrar için bir rezervuar görevi gördüğünden mesane tümörleri ve tümör sekretomu idrar ile sürekli temas halindedir. Sadece mesane kanserine özgü olan bu durum, moleküler düzeydeki çalışmaların idrar örnekleri üzerinden tanıya yönelik non-invaziv biyobelirteç geliştirilmesi fikrine yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bu konuda uzun yıllardır proteomik bazlı çalışmalar yapılmasına karşın hala tanı ve evreleme amaçlı tek başına kullanılabilecek bir biyobelirteç bildirilememiştir. Literatüre bakıldığında, tümör hücrelerinin hangi

alterasyonu akümüle ederek progresif özellik gösterdiğine ilişkin soruları yanıtlayacak doku bazlı proteomik çalışmaların oldukça sınırlı olduğu ve özellikle tek başına Hg-pT1 tümörlerini ele alan proteomik yaklaşımlı bir çalışmanın bulunmadığı görülmektedir. Bu noktada bu çalışmanın sadece Hg-pT1 tümörleri hedef alması yönünden faydalı olacağı düşünülmektedir. Bu çalışma kapsamında İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Üroloji servisinde tedavi görmekte olan 4 erkek hastadan elde edilen Hg-pT1 tümör dokuları ve tümör dokularına komşu sağlıklı mesane dokuları LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda tanımlanan proteinler biyoinformatik programlar yardımıyla incelenmiş ve Hg-pT1 tümör dokularına ait proteom profilinin sağlıklı dokularla karşılaştırılarak aralarındaki farkların ortaya koyulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Kanseri

Üriner sistemin önemli bir üyesi olan mesane, metabolik olaylar sonucu oluşan idrarın atılacağı zamana kadar depolandığı bir rezervuar olarak görev yapmaktadır (1). Mesanenin anatomik yapısı, idrarın biriktiği esas yer olan gövde kısmı ve bunun bir devamı olarak değerlendirilebilecek huni benzeri boyun kısmı olarak iki bölüme ayrılarak incelenmektedir. Oldukça kaslı bir organ olan mesane, yapısında detrüör adı verilen düz kasları ve onların mesane boyunca tüm yönlerde dağılan liflerini barındırmaktadır (1). Detrüör kasının özelliği, kasılması durumunda mesanenin iç basıncını 40- 60 Hg'ye kadar arttırarak idrarın boşaltılması için gerekli olan itici gücü oluşturmaktadır (1, 2). Mesanenin trigon bölgesi, üreterlerin mesane ile birleştiği açıklığı üzerinde barındırmakta olup üretrayla da bağlantısı olan önemli bir kısımdır. Üretranın idrar çıkışına izin vermesi, sfinkter olarak adlandırılan ve istemli olarak kasılan kas yapılarının kontrolü altındadır (Şekil 1).



Şekil 1. Mesanenin anatomik ve fizyolojik yapısı.

(Kaynak: Kelly, Christopher R., and Jaime Landman. The Netter Collection of Medical Illustrations-Urinary System e-Book. Vol. 5. Elsevier Health Sciences, 2012.)

2.1.1 Etiyoloji ve epidemiyoloji

Mesane kanseri tanımı, mesanede görülen ve çok değişken seyir gösterebilen heterojen tümör çeşitlerini tarif etmektedir (3). Dünya genelinde görülen 9. en yaygın malignant hastalık olmakla birlikte, yine dünya genelinde ölüme neden olan kanser çeşitleri arasında 13. sırada gelmektedir (3, 5). Eser ve arkadaşlarının 2006 yılında ülkemizde yaptığı ve başta İzmir'deki Kanser İzleme ve Denetim Merkezi (KİDEM) olmak üzere, sekiz ilin yer aldığı insidans çalışmasında, mesane kanserinin erkekler arasında en sık görülen 3. kanser türü olduğu anlaşılmış ve insidans hızının (100.000 kişide) erkekler arasında illere göre; İzmir: 24.8, Eskişehir: 24.8, Erzurum: 18.6, Bursa: 15.3, Edirne: 18.8, Antalya: 17.2, Trabzon: 24.1 ve Samsun: 16.8 olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmaya göre, mesane kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanserler arasında 13. sırada yer alırken insidans hızının (100.000 kişide) illere göre; İzmir: 2.5, Eskişehir: 2.7, Erzurum: 2.4, Bursa: 2.4, Edirne: 2.1, Antalya: 3.3, Trabzon: 2.0, ve Samsun: 1.7 olduğu belirlenmiştir (44). Yapılan araştırmalar sonucunda mesane kanserinin etiyojisinde çok ciddi risk faktörleri göze çarpmaktadır ve bu risk faktörlerinin bilinmesi mesane kanserinden korunma açısından önemlidir (5, 6, 10).

2.1.1.1. Sigara

Özellikle 1950'li yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, oldukça önemli sonuçlar ortaya koymuş ve hatta mesane kanserlerinin hemen hemen yarısından sigarayı sorumlu tutmuştur (3, 14). Freedman ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış oldukları kohort çalışmada mesane kanserli kadınlardan %56'sının, erkeklerden ise %70'inin hayatının bir döneminde ya da hala sigara kullandığı gösterilmiştir (16). Günde 10 adet ya da daha fazla sigara kullananlar için, sigara kullanmayanlara göre mesane kanseri geliştirme riskinin 4 ya da 5 kat daha fazla olduğu bildirilmiş, buna ek olarak sigara içmeyi bırakanlarda ise mesane kanseri görülme riskinin 2- 4 yıl içinde %30- 60 oranında azaldığı belirlenmiştir (12, 19). Sigara kullanımının mesane kanseri oluşumunu hangi yolla etkilediği net olarak anlaşılamamış olup, sigaradaki zararlı bileşiklere kronik olarak maruz kalmanın yarattığı etkiler ve oksidatif DNA hasarı üzerinde durulmaktadır (3, 12, 18).

2.1.1.2. Meslek ve kimyasallar

Meslek ve mesane kanseri ilişkisine ilk olarak 1895 yılında Almanya’da işaret edilmiştir ve mesleki karsinojenlere maruziyete bağlı mesane kanseri görülmesinin, tüm mesane kanserlerinin %20- 25 kadarından sorumlu olduğu düşünülmektedir (3, 12). Riskli mesleklerde zararlı kimyasallar ile çalışan bireylerin idrarlarından yapılan analizlerde, maruz kaldıkları kimyasallara rastlanmıştır (6, 12). Mesanenin iç yapısı düşünüldüğünde, idrar ile birlikte içeriğindeki bu kimyasallara kronik olarak maruz kalmasının yarattığı tehlikeyi anlamak kolaylaşmaktadır (3). Tekstil, boyacılık, pestisit, gübre üretimi, kauçuk, alüminyum ve kimya sanayi, kuru temizleme, petrol ve akaryakıt, deri ve ayakkabı üretimi sektörleri ile uğraşan bireylerin ekstra önlem alması, mesane kanseri riskine karşı korunmada oldukça önemlidir (20, 22, 45). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Research on Cancer, IARC), meslek gruplarına göre en sık maruz kalınan ve mesane kanseri için karsinojen olarak tanımlanan özel 11 aromatik amini Tablo 1’de de görüleceği üzere, Grup 1 (Definite), Grup 2A (Probable) ve Grup 2B (Possible) olarak gruplandırmıştır (43).

Tablo 1. IARC tarafından karsinojenik olarak tanımlanan ve gruplandırılan 11 önemli aromatik amin.

Grup 1 (Defined)	Grup 2A (Probable)	Grup 2B (Possible)
4-aminobifenil	4-kloro-orto-toluidin	4,4'-metilen bis(2-metilanilin)
Arsenik		Perkloroetilen
Benzo[a]pirin		Trikloroetilen
Benzidin		Tetrakloroetilen
B-Naftalamin		
<i>N,N</i> -bis(2-kloroetil)-2-naftalamin (klornafazin)		
4,4'-metilen bis(2-kloroanilin) (MOCA)		
orto-toluidine		

(Kaynak: Delclos GL, Seth PL. Occupational risk factors. Scandinavian Journal of Urology and Nephrology 2008; 42(sup218):58-63.)

2.1.1.3. Enfeksiyon

Skvamöz hücreli karsinoma, kronik enfeksiyon ve kronik iritasyon, şistozoma enfeksiyonu, antibiyotiğe cevap vermeyen uzun süreli bakteriyel enfeksiyonlar, mesane taşları ve uzun süreli mesane kateterizasyonu gibi sebeplerle gelişebilmektedir (46). Tüm mesane kanserlerinin %1- 3'ünden sorumlu tutulabilirken, şistozoma enfeksiyonunun yaygın olduğu Mısır gibi ülkelerde bu oran %75'lere çıkmaktadır (23, 46). Ülkemizde pek rastlanmayan şistozoma enfeksiyonu, ana konağı insan olan *Schistosoma haematobium* türündeki parazitten kaynaklanmaktadır (24, 25, 26). Mesanede bu parazitin uzun süreli varlığı, iritasyon yaratmakta ve invazyonu yüksek, genellikle iyi farklılaşmış ve ileri evre skuamöz hücreli karsinomaya sebep olmaktadır (3, 46). Kronik idrar yolu enfeksiyonlarındaki enflamatuvar süreçte ise nitrit ve nitrozamin bileşikleri açığa çıkmakta ve bu durum artan hücre proliferasyonuna neden olarak mesane kanseri oluşturmaktadır (3, 23, 24).

2.1.1.4. İlaçlar ve radyoterapi

Kemoterapötik bir ajan olarak, miyeloproliferatif hastalıklar, malign neoplaziler ve lenfoproliferatif hastalıkların tedavisi için kullanılan alkilleyici özellikteki Siklofosamid'in mesane kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (3, 30, 31). Siklofosamid'in metaboliti olan akrolein, mesane mukozası için toksik etki göstermekte ve mesane epitelinde anormal değişiklikler yaratmaktadır. Cohen ve arkadaşlarının rat mesanesi üzerinde akrolein ile yaptıkları çalışma da bu toksik etkiyi desteklemektedir (34). Uygulanan toplam doz miktarı ile de ilişkili olmakla birlikte, yapılan insidans çalışmalarında siklofosamid kullanımının mesane kanseri gelişim riskini dokuz kat arttırdığı görülmüştür (49, 50, 51). Bunun yanında analjezik kullanımı, özellikle Fenasetin'in mesane kanseri gelişimine neden olan bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (31, 33). Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaçların, hücrede araşidonik asit ve eikosaenoidlerin oluşumunda görevli olan siklooksijenaz enzimlerini (COX), özellikle de COX-2'nin ifadesini inhibe ettiğinden dolayı kolon kanserlerinde koruyucu olduğu ve hayvan deneylerinde de mesane kanseri gelişimi için yüksek koruyucu etki gösterdiğine dair bulgular mevcuttur (3, 35). İlaçlara ek olarak, ürogenital sistemin başka rahatsızlıkları için ya da hastada mesane kanseri

gelişiminden önce pelvise yönelik başka kanser hikayeleri için kullanılan radyoterapinin doz ile körele olarak 5- 10 yıl içerisinde yüksek evreli mesane kanseri gelişimi tetiklediği ve mesane kanseri insidansını yaklaşık olarak 1.5- 4 kat arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (48, 49). Bu risk yüksek doz kemoterapiyle kombine edilen radyoterapide çok daha fazladır (47).

2.1.1.5. Kahve ve alkol tüketimi

Kahve tüketimi ve mesane kanseri gelişimi arasındaki ilişkiyi ele alan epidemiyolojik çalışmalar çok tutarlı değildir (37, 38). Eski çalışmalarda kafein ile mesane kanseri gelişimi arasında zayıf bir pozitif ilişki bulunmasına karşın, kahve tüketicilerinin, sigara alışkanlığından bağımsız değerlendirilmemiş olması gibi problemler, kahve tüketiminin doğrudan etkisini anlama noktasında kısıtlılık yaratmıştır (3). Buna karşılık Francesko ve arkadaşlarının 1997 yılında İtalya'da yaptıkları sigara, alkol ve kahvenin birlikte değerlendirildiği çalışmada, mesane kanseri gelişimi için risk oluşturduğu görülmüştür (17). Weixiang ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları meta analizde ise sigara içme alışkanlığı olmayan erkek kahve tüketicilerinde mesane kanseri için artmış risk olduğu ortaya koyulmuş ve kahvenin sigaradan bağımsız olarak mesane kanseri için risk faktörü olduğu gösterilmiştir (36). Kahve ve alkolün yanında, sakarin ve siklamat gibi sentetik tatlandırıcıların da mesane kanseri için risk faktörü oluşturduğunu ifade eden çalışmalar mevcuttur (39).

2.1.2. Patoloji

Sistoskopik görüntüleme sonrası çıkarılan materyalin patolojik olarak incelenmesi tümörün sınıflandırılmasını, derecelendirilmesini ve evrelendirilmesini sağlamaktadır. Optimal tedavinin düzenlenmesi için tümörün nerede lokalize olduğu, mesane duvarı ve kasa invaze olup olmadığı, invazyon varsa bunun boyutu ve derinliği, metastaz varsa lokal mi yoksa uzak metastaz mı olduğunun bilinmesi, verimli tedavi uygulanması ve sağ kalım süresinin arttırılmasında önemlidir (3, 11).

2.1.2.1. Mesane kanserinde sınıflandırma

Mesane kanserlerinin %90'ından fazlası, ürotelyal karsinomdur. Buna karşılık kalan mesane kanserleri skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom, küçük hücreli karsinom ya da sarkoma gibi az yaygın alt tipler olabilmektedir. Bu noktada 2016 yılında WHO, üriner sistem tümörlerinin sınıflandırılması için Tablo 2'deki sınıflandırma sistemini ortaya koymuştur. Bazı ürotelyal karsinom ve varyantlarının daha kötü prognoz gösterdiği bilindiğinden doğru sınıflandırma önemlidir (7, 36).

Tablo 2. Mesane kanserinde sınıflandırma.

2016 WHO Üriner Sistem Tümör Sınıflandırması
Ürotelyal Karsinoma
<i>Non-invaziv</i>
Ürotelyal karsinoma in situ
Non-invaziv yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinoma
Non-invaziv düşük dereceli papiller ürotelyal karsinoma
<i>İnvaziv</i>
Ürotelyal, NOS
Divergent diferansiyasyonlu ürotelyal karsinoma (Ör.: skuamöz, glandular vb.)
Mikropapiller
Plazmasitoid
Nested
Mikrosistik
Sarkomatoid
Lemfoepitelyal benzeri karsinoma
Şeffaf Hücreli
Lipid Zengin
Giant Hücreli
Skuamöz hücreli karsinoma
Adenokarsinoma
Küçük hücreli karsinoma
Lemfoma/hematopoetik tümör
Mezenkimal malignensi (sarkoma)
Melanoma

(Kaynak: Hansel DE, Seth PL. Precision Molecular Pathology of Bladder Cancer. Springer, 2018.)

2.1.2.2. Mesane kanserinde derecelendirme

Mesane tümörlerinin derecelendirilmesi için kullanılan sistem, Uluslararası Ürolojik Patologlar Derneği (The International Society of Urological Pathologists, ISUP) ve WHO tarafından 2004 yılında düzenlenen sistemdir. Bu sistem, WHO'nun 1973'deki derecelendirme sisteminin revize edilmesiyle oluşturulmuştur. Buna ek olarak "2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs", bu derecelendirme sisteminin erken dönem lezyonları ile ilgili olan kısmında bazı küçük değişiklikler yapmış ve derecelendirme sistemi Tablo 3'de görülmekte olan güncel halini almıştır. Ürotelyal neoplaziler, flat (düz) ve papillary (papiller) olmak üzere iki temel şekilde büyümektedir ve lezyonların derecesini içeren isimlendirme, bu büyüme şekline bağlı olarak değişiklik göstermektedir (7, 37).

Tablo 3. 1973 WHO ve 2004 ISUP/WHO derecelendirme sistemi.

2004 ISUP/WHO (Güncel)	1973 WHO
Ürotelyal Papilloma	Ürotelyal Papilloma
Düşük Malignensi Potansiyeline Sahip Papiller Ürotelyal Neoplazi (PUNLMP)	Derece I: İyi Diferansiye
Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinoma	Derece II: Orta Diferansiye
Yüksek Dereceli Ürotelyal Karsinoma	Derece III: Kötü Diferansiye

(Kaynak: Hansel DE, Seth PL. Precision Molecular Pathology of Bladder Cancer. Springer, 2018.)

2.1.2.3. Mesane kanserinde evrelendirme

Mesane tümörlerinin evrelendirilmesi için Uluslararası Kanser Savaş Örgütü (Union Internationale Contre le Cancer, UICC) ve Amerikan Kanser Ortak Komitesi (The American Joint Committee on Cancer, AJCC)'nin 2002'de ortaya koyduğu ve 2009'da ise güncellenen Tablo 4'de gösterilmiş olan Tümör- Nod- Metastaz (TNM) evreleme sistemi kullanılmaktadır (7, 40, 42). İnvaziv olmayan mesane tümörleri, yine

ütrotelyal neoplazinin büyüme paterni göz önüne alınarak, papillary için pTa ve flat için PTis olarak evrelendirilmiştir. Geriye kalan pT1- pT4 evreleri ise invaziv tümörlerin metastazı, mesaneye invazyonu ve komşu organlarla olan ilişkisi doğrultusunda isimlendirilmiştir (7, 41). Tüm bu TNM evrelendirmesinin ve tümör derecesinin mesane üzerindeki değişimi Şekil 2’de görselleştirilmiştir (5).

Tablo 4. UICC/ AJCC 2009 TNM evrelendirme sistemi.

UICC/AJCC 2009
T- Primer Tümör
Tx: Primer Tümör Değerlendirilemedi
T0: Primer Tümör Lehine Kanıt Yok
Ta: Noninvaziv Papiller Karsinoma (Mukoza İle Sınırlı)
Tis: Karsinoma İn Situ (Flat Tümör)
T1: Lamina Propria İnvazyonu
T2: Kas İnvazyonu
T2a: Yüzeysel Kas İnvazyonu (İç Yarı)
T2b: Derin Kas İnvazyonu (Dış Yarı)
T3: Perivezikal Yağ Dokusuna Yayılım
T3a: Mikroskopik İnvazyon
T3b: Makroskopik İnvazyon (Ekstravezikal Kitle)
T4: Komşu Organ Veya Duvar Tutulumu
T4a: Prostatik Stroma, Seminal Vezikül, Rektum, Uterus, Vajina İnvazyonu
T4b: Pelvik Yan Duvar, Karın Yan Duvarı İnvazyonu
N- Bölgesel Lenf Nodları
Nx: Bölgesel Lenf Nodları Değerlendirilemedi
N0: Bölgesel Lenf Nodu Tutulumu Yok
N1: Pelvik Böl. Tek Lenf Nod Yayılım (Hipogastrik, Oblurator, Eksternal İliak Presakral)
N2: Pelvik Böl. Multiple Lenf Nod Yayılım (Hipogastrik, Oblurator, Eksternal İliak Presakral)
N3: Ana İliak Lenf Nod (ların)da Yayılım
M-Uzak Metastaz
Mx: Uzak Metastaz Değerlendirilemedi
M0: Uzak Metastaz Yok
M1: Uzak Metastaz Var
M1a: Ortak İliak Lenf Bezlerinin Ötesinde Lenf Bezlerine Uzak Metastaz
M1b: Lenf Nodu Olmayan Bölgelere Uzak Metastaz

(Kaynak: Hansel DE, Seth PL. Precision Molecular Pathology of Bladder Cancer. Springer, 2018.)

esasen kasa invaze olmayan mesane tümörleri için tümörün tamamının uzaklaştırılmaya çalışılması ve tümör bölgesinin yüksek enerjili lazerler yardımıyla olası tümör hücre kalıntılarının yok edildiği bir tedavi yöntemi olarak tercih edilebilir (43). TUR operasyonu ile alınan biyopsi materyalinin patolojik olarak incelenmesi tümörün karakterinin belirlenmesi, sınıflandırma ve evrelendirilmesinin yapılması açısından önemlidir. Sistoskopinin yanında, gerekli durumlarda üst ve alt idrar yollarının incelenmesi için Bilgisayarlı Tomografi (BT)- Ürogram ve Retrograd Pyelogram gibi görüntüleme araçları da kullanılabilir. İntravenöz olarak ya da mesane içerisine girilerek verilen kontrast boya maddesinin yayılımını takiben idrar yollarını hedef alan X-ışını bazlı görüntülemeyi kapsayan bu araçlar tanı koyulması sürecinde oldukça yardımcı olmaktadır (43). Bununla birlikte, oldukça iyi sonuç vermesine karşın radyoaktif kontrast maddesinin mesanede toplanması ve mesane tümör dokusu üzerindeki muhtemel olumsuz etkisinden dolayı Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) ya da PET/ BT kombinasyonu, metastaz şüphesi dışında mesane kanseri için çok tercih edilmemektedir (11).

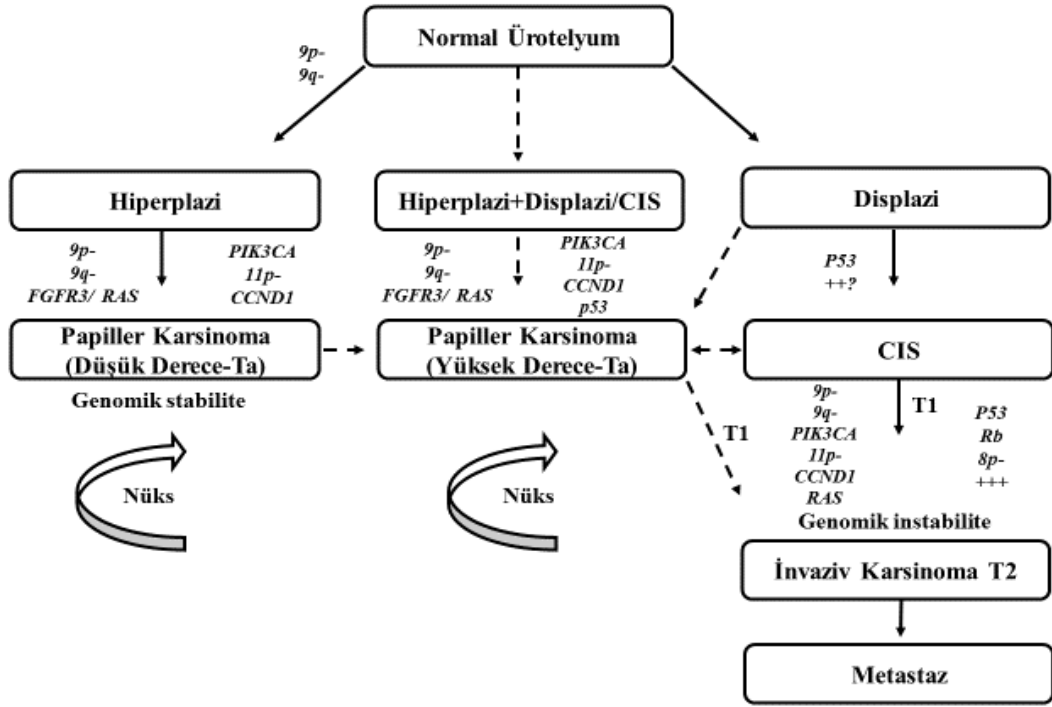
Mesane kanserinin tedavisi; cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi olmak üzere üç temel basmağa dayanmaktadır. Cerrahi tedavi için tümörün lokal olarak çıkarıldığı TUR operasyonunun yanında mesanenin tamamının ya da bir kısmının alındığı sistektomi de yapılabilir. Sistektomiyi idrarın vücuttan atılımı için yeni bir yol yaratıldığı neobladder rekonstrüksiyon operasyonları takip edilmektedir. Kemoterapi seçeneği, mesanenin bütünlüğünün korunduğu çoğu durumda intravezikal olarak mesane içerisine kemoterapötiklerin muamelesi şeklinde yapılabilirken, mesane bütünlüğünün olmadığı durumlarda ya da metastaz söz konusu ise sistemik olarak yapılabilir. İntevezikal tedavilerden bir diğeri de süperfisiyal tümörlerde uygulanan zayıflatılmış verem mikrobi (Bacillus Calmette-Guerin, BCG) seyreltik muamelisidir ve progresyon ile rekürrens için oldukça koruyucu olduğu görülmektedir. Bu tedavileri tamamlayıcı olarak, hedef odaklı ve yüksek enerjili ışınlar kullanılarak yapılan radyoterapi ve son yıllarda oldukça gündemde olan immünoterapi denemeleri başarılı sonuçlar ortaya koymaktadır (43).

2.2. Mesane Kanserinin Oluşum Mekanizması

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran, her kanser türü için ortak olan kendi kendine büyüme sinyali gönderme ve büyüme sinyalini algılayan reseptörlerinin sayısını arttırma, antiproliferatif sinyallerden kaçma, apoptoza direnç ve immortalize replikasyon yeteneği, anjiyogenezisi indükleme, invazyon ve metastazı aktifleştirme gibi özellikler, tümör hücrelerinin en büyük silahlarıdır (52). Tüm bu direnç mekanizmasının gelişmesi, klonal ekspansiyon bağlamında düşünüldüğünde hücrelerin belirli adımlarda çeşitli karsinojenik olayları akümüle etmeleri ile açıklanmaktadır (Şekil 3). Mesane kanseri için bu karsinojenik olaylar temel olarak, delesyonlar ve genomik instabiliteyi içeren kromozomal değişiklikler ile başlamaktadır. Bunu takiben hücre döngüsünün regülasyonunun bozulması ve apoptozun kontrolünün kaybolması ile kontrolsüz proliferasyon aşaması gelmektedir. Hücresel adezyonun kaybolması ve anjiyogenezin indüklenmesi ile birlikte tümörün uzak mesafelere metastaz yaptığı en tehlikeli aşamaya ulaşılmaktadır (3, 52).

2.2.1. Onkogenler

Onkogenler, anormal süreçler sonucunda protoonkogenlerden meydana gelmektedir (49). Dominant onkogenler ve onların protein ürünleri hücreler regülasyonu bozmaktadır. Özellikle birden fazla onkogenin eş zamanlı olarak ifadenmesi, hücrenin malignan yönde bir fenotip izlemesine neden olmaktadır. H-ras, c-myc ve EGFR onkogenleri mesane kanserinde en çok çalışılmış onkogenlerdir (49, 52, 53). Tüm bu protoonkogenler ve onların onkogenlere dönüşmesine neden olan alterasyonlar, mesane kanseri gelişimini özetlemeye çalışan two- pathway modelini (Şekil 3) anlamamıza yardımcı olmaktadır (60). Ras ailesinin (H-ras, K-ras, N-ras) üyelerindeki değişikliklere kanserde sık rastlanmaktadır. H-ras, K-ras ve N-ras genlerinin 12, 13 ve 61. kodonlarında görülen nokta mutasyonları, onkogene dönüştürmektedir (54- 56). Mesane kanserlerinin %36'sında H-ras geninde nokta mutasyonları tespit edilmiştir (55). Mutasyonlar, 12. kodonda G'den A'ya, 13. kodonda G'den T'ye ve 61. kodonda A'dan T'ye dönüşüm şeklinde olmakla birlikte 12. kodondaki nokta mutasyonuna daha sık rastlanmaktadır (3, 49).



Şekil 3. Mesane kanseri gelişiminde two- pathway modeli. Bu model, mesane kanserinde iyi bilinen histopatolojik, moleküler ve genetik verilere dayanılarak oluşturulmuştur. Sırasıyla invaziv olmayan düşük ve yüksek dereceli tümörlerin gelişimi solda, kasa invaze ve daha ileri invazyon ile metastaz gösteren mesane tümörlerinin olası gelişimi sağda gösterilmiştir. Yüksek dereceli papiller Ta tümörlerinin orijini net değildir. Bunların düz displaziden ve düşük dereceli Ta tümörlerin değişmesiyle oluştuğu düşünülmektedir. Benzer olarak oldukça agresif bir tablo çizen tehlikeli T1 tümörlerinin gelişimine giden yolda da belirsizlikle mevcuttur. T1 evre tümörlerinin yüksek dereceli Ta tümörlerinden ya da karsinoma in situ (CIS) flat tümöründen geliştiği düşünülmektedir. Displastik ürotelyumun, p53 instabilitesine ek olarak tam olarak aydınlatılmamış başka karsinojenik alterasyonlar ile (++?) CIS'e dönüştüğü tahmin edilmektedir. CIS flat tümörlerinden köken alan T1 evre tümörleri, ana histopatolojik grupların hemen hepsinde ortak olarak belirtilen tüm karsinojenik alterasyonları ve belki de daha fazlasını (+++) akümüle ederek invaziv T2 evre tümörlere geçit vermektedir. T2 evre invaziv tümörler, farklı organ ve dokulara metastaz yapan tehlikeli evre tümörlerine geçit vererek (T3, T4) ağır bir tablo oluşturmaktadır.

(Kaynak: Knowles MA. Molecular pathogenesis of bladder cancer. International journal of clinical oncology 2008; 13(4); 287-297.)

Diğer protoonkogenlerden myc, DNA'ya bağlanma özelliğinde olan bazı nükleer fosfoproteinleri kodlamaktadır. Bu fosfoproteinler temel olarak hücre proliferasyonunun regüle edilmesinde görev almaktadır ve bunda Max (myc ilişkili faktör X) ile partneri Mad (Max dimerizasyon protein) olmak üzere diğer başka proteinlerin de katıldığı bir heterodimer kompleksi rol oynamaktadır (49, 62). Artan c-myc ifadesinin olduğu birçok kanser türü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ve c-myc protein ürününün IHC ile belirlenen düzeyinin mesane kanserinde nükleer grade ile korele olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (61- 66).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR ya da ERBB) gen ailesi, tirozin kinaz aktivitesine sahip, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu uyarma yeteneğinde olan transmembran reseptör proteinlerini eksprese etmektedir. Görevlerini Ras-MAPK yolu üzerinden gerçekleştirmektedirler (49). Bu gen ailesinin ERBB1, ERBB2, ERBB3 ve ERBB4 olmak üzere dört üyesi vardır. ERBB2, HER2 ya da neu olarak da adlandırılabilir (3, 49). EGFR'nin sinyal transdüksiyonundaki değişikliklerinin ve bu gen ailesinin ekspresyon düzeyinin, mesane tümörünün derecesi ve evresi ile ilişkili olabileceğini gösteren birçok çalışma yapılmıştır (67- 69). Bu ilişkinin temel olarak EGFR kaynaklı olabileceği gibi, onun ligandı olan Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) kaynaklı da olabileceği düşünülmektedir. Mesane tümöründe özellikle artmış HER2 ifadesine karşın üriner EGF miktarı düşük bulunmuş ve malign proliferasyon ile ilişkilendirilmiştir (61- 71).

2.2.2. Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genler wild type düzeydeyken tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmeye çalışırlar. Knudson'ın çift vuruş hipotezi, resesif olan tümör baskılayıcı gen ailelerinin genlerinin her iki allelinin fonksiyonunu yitirdiği takdirde kanser gelişimi olacağını ifade etmektedir. CGH ve heterozigosite kayıp testleri, inaktivasyonları durumunda mesane tümörü gelişimine neden olan tümör baskılayıcı genlerin tespit edilmesini sağlamıştır. Mesane kanseri ile ilişkili olarak en sık karşılaşılan aberasyon 9. kromozomun uzun kolunda görülen delesyonlardır. Bu

bölgenin p14, p15 ve p16 gibi hücre döngüsü regülasyonunda önemli etkisi olan potansiyel tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu görülmüştür. Bununla birlikte kasa invaze mesane tümörlerinin yarısından fazlasında ise 8. kromozomun uzun kolunda delesyona rastlanmaktadır. Birçok kanser türünde ortak olmak üzere, mesane kanserinde de en çok çalışılan tümör baskılayıcı genler Retinoblastoma (Rb) ve p52'dir (49, 60).

Retinoblastoma (Rb) geni, 13q14 sitogenetik lokasyonunda yer almakta ve çekirdekte bulunan pRb fosfoproteinini kodlamaktadır. Bazı siklin bağımlı kinazlar ile fosforillenen bu proteinin temel görevi hücre döngüsünün çeşitli basamaklarının regülasyonunun sağlanmasıdır. Bu regülatör görev temel olarak hücrelerin G1 fazından S fazına geçişini kapsamaktadır. Rb geninde görülen mutasyon, delesyon ya da diğer inaktive edici olayların sonucunda hücrelerin G1'den S fazına daha kolayca geçtiği, böylece hücre proliferasyonunun indüklendiği görülmüştür. Normal şartlarda fosforillenmemiş Rb proteini, E2F adlı transkripsiyon faktörü proteine bağlanarak hücre döngüsünü durdurmaktadır. Rb proteininin fosforillenmesi durumunda ise serbestlenen E2F-1 proteini, hücrenin G1 fazından DNA sentezi fazı olan S fazına geçmesine yardımcı olacak timidin sentetaz gibi bir dizi faktörün sentezlenmesini sağlamakta ve böylece hücre proliferasyonu devam etmektedir. Rb gen defektleri ya da pRb ifadesinin azlığı, artmış E2F'den kaynaklanan kontrolsüz bir hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (3, 49). Yapılan çalışmalarda, yüksek evreli ve yüksek dereceli mesane tümörleri ile Rb defekti arasında anlamlı ilişki olduğu bildirilmiştir (72). Mesane tümörlerinin yaklaşık %30'luk bir kısmında Rb mutasyonları karşımıza çıkmaktadır ve özellikle kasa invaze mesane tümörlerinde görülen pRb ifadesindeki azalma, kısalmış sağkalım süresi ile orantılı bulunmuştur (73). Rb proteininin ekspresyon düzeyini ele alan IHC bazlı çalışmalarda, özellikle ileri evre tümör örneklerinde pRb tespit edilememiştir (74, 75).

Sitogenetik lokasyonu 17p13 olan p53 geni, mesane kanseri de dahil olmak üzere, insanlarda görülen kanserlerde en çok değişiklik görülen gendir. Bu gen tarafından kodlanan p53 proteini, bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre döngüsünün

durdurulmasında hayati bir görev üstlenmektedir. Hücre döngüsünün suprese edilmesinin yanında temel olarak, wild type p53'ün anjiyogenez, hasarlı DNA'nın onarımı için nükleer deoksiribonükleotid trifosfat ekspresyonunu tetiklemek ve tamir edilemeyen DNA hasarlarının neticesinde hücrenin proliferasyonunu durdurmak için programlı hücre ölümü olan apoptozu indüklemek gibi görevleri vardır. Genomun stabilitesinin korunması ve hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin proliferasyonunun önüne geçmesinden dolayı p53'e "guardian of the genome" da denilmektedir (76).

DNA hasarını takiben artan p53 proteini miktarı p21'in de ekspresyonunu arttırmakta ve hücre döngüsünün durdurulması sağlanmaktadır. Apoptoz işaretçisi bu durum, mitokondriyal sitokrom-c'nin ekspresyonuna neden olur ve bağlantılı olarak apoptozda görevli kaspazların aktive olmasını sağlar. Apoptotik süreç bir dizi proteinin regülasyonu altında gerçekleşmektedir. Bu proteinler temel olarak; sitokrom-c ve kaspazlar üzerinden apoptozun düzenlenmesini sağlayan Bcl-2, proapoptotik proteinler olan Bax, Bak, Bid ve Bim ile proapoptotik proteinler olan Bcl-XL ve Bcl-W'dur. Bu kompleks sürecin ve sinyalizasyonun anahtar proteini olan p53'te ya da p53 geninde görülecek defektler kanser gelişimi için en önemli tetikleyicilerdendir (49). Mutant p53 proteinin IHC ile tanımlanması, wild type olana göre daha kolaydır çünkü wild type p53 proteininin yarılanma ömrü daha kısadır. Bu durum mesane kanser çalışmalarında p53 proteininin incelenmesine de yardımcı olmuştur. Kasa invaziv transizyonel hücreli karsinomların %50'sinde, nükleusta aşırı eksprese edilmiş mutant p53 olduğu görülmüş ve bu durumun artan tümör evresi ve derecesi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (49, 77). Bir diğer çalışmada, radikal sistektomi yapılan hastalarda, değişen p53 ekspresyon düzeyinin artmış nüks durumu ve azalan sağ kalım süresi ile seyreden kötü prognozla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (78). Yüzeysel flat tümörlerde p53 ekspresyonunun daha az olduğu buna karşılık ekspresyon düzeyindeki farklılıkların hastaların yaşam süresi ve prognozuna ilişkin bir tahmin yapmada kullanılabileceğini söyleyen çalışmalar mevcuttur (79, 80). Benzer şekilde Stein ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, p53 değişiklikleri bulunan ve sistoskopi geçirmiş hastalarda p21^{WAF/Cip1} ifadesindeki defektin artan nüks oranı ve azalan sağ kalım süresi ile ilişkili olduğu ifade etmektedir (3, 81).

2.2.3. Polimorfizmler

Mesane kanseri patogenezinde gen polimorfizmleri, özellikle de metabolik enzimleri eksprese eden genlerin polimorfizmleri büyük yer tutmaktadır. N-asetil transferazlar (NAT) ve Glutasyon S-transferazlar (GST) en çok çalışılanlardır. Bu enzimlerin genleri insanlarda polimorfik olabildiğinden kanserlere karşı bireysel farklılıklara neden olmaktadır. NAT'ların NAT1 ve NAT2 olmak üzere iki farklı çeşidi vardır ve bu enzimlerde görülen polimorfik varyasyonun enzimlerin fenotipini yavaş ve hızlı asetilasyon yapacak şekilde değiştirdiği açıklanmıştır (83, 87). Yavaş asetilasyon gösteren enzim varyantına sahip bireylerin, karsinogen akümülyasyonuna maruz kaldığı ve bu karsinogenlerin mesanede N-hidroksi metabolitleri olarak toplanıp kanser riski oluşturduğu düşünülmektedir. Boya endüstrisinde çalışan ve arilamin maruziyeti bulunan mesane kanserli bireyler ile yapılan bir çalışmada, hastaların %96'sında yavaş asetilatör fenotiple karşılaşıırken sağlıklı grupta bu oran %57 olarak bulunmuştur (88). Normal fenotipli NAT1 ile hızlı asetilatör fenotipli NAT2 enzimlerine sahip bireylerin mesane kanseri açısından daha avantajlı olduğunu düşünülmektedir (83- 87).

GST'lerin GSTT, GSTM, GSTA ve GSTP olmak üzere dört alt grup tanımlanmıştır (3). GSTM1 ve GSTT1 varyantlarındaki polimorfizm ve delesyonlara toplumda daha sık rastlandığı görülmüştür. GST'lerin geneli karsinogenler, ksenobiyotikler ve vücuda alınan çevresel kimyasalların detoksifikasyonu için çalışmasına karşın, sigara dumanıyla alınan etilen oksit ve monohalometanları zararsızlaştırması ile GSTT1'in; benzopüren gibi polisiklik hidrokarbonların zararsızlaştırılması ile de GSTM1 varyantlarının daha önemli bir yeri vardır (3, 49). Yapılan çalışmalarda GSTM1 ve GSTT1 null genotipleri ile artmış mesane kanseri riskinin korelasyon içinde olduğu görülmüştür (83, 89). Bunların yanında, GSTP1 varyantında görülen Ile105Val polimorfizminin enzimin katalitik bölgesini değiştirdiği ve mesane kanseri riskini arttırdığı söylenmektedir (49, 83, 90). NAT'lar ve GST'ler kadar olmamakla birlikte, CYP gen ailesinin eksprese ettiği faz I enzim ürünlerinin popülyasyonda görülen varyasyonlarının, mesane kanserinin de içerisinde olduğu çeşitli kanser türleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (91- 93).

2.2.4. Epigenetik

Mesane kanserinin de içerisinde olduğu birçok kanser bazlı çalışmada epigenetik değişikliklerin etkin rol üstlendiği gösterilmiştir (121- 124). Mesane kanserinde TWIST1, NID2 ve OTX1 genlerinin hipermetilasyonunu ele alan idrar bazlı iki çalışmada, bu genlerin erken evre tümörlerde bile kontrol grubuna oranla hipermetile olduğu ifade edilmiştir (122, 125, 126). İdrar sedimenti üzerinde yapılan diğer hipermetilasyon çalışmalarında ise p14ARF, p16, E-Kaderin, DBC1, CA10, PENK, DAPK, APC, RASSF1A, NKX6-2, MYO3A genleri ele alınmış ve bu genlerin farklı kombinasyonlarını içeren gen panellerinin %90'lara varan özgüllükte belirteç olarak kullanılabilmesi ifade edilmiştir (122). Hipometilasyon bazlı çalışmalar ise hipermetilasyona göre çok anlamlı sonuçlar ortaya koyamamakla birlikte LINE-1 hipometilasyonunun prognostik önemini olabileceği ifade edilmektedir (127). Metilasyon paterni dışında mikroRNA'ları ele alan çalışmalar da oldukça popülerdir ve mesane kanserinde ekspresyonunun değiştiği gösterilen birçok mikroRNA tespit edilmiştir. Hanke ve arkadaşlarının idrar örneklerinde yaptıkları çalışmada mikroRNA-126 ve mikroRNA-186'nın tümör belirteci olarak kullanılabilmesi önerilmiştir (127). Bununla birlikte mikroRNA-141, mikroRNA-143, mikroRNA-200c, mikroRNA-30b ve mikroRNA-125'in mesane kanserleri hastaların idrarlarında overeksprese edildiği ifade edilmiştir (128). Tüm bunların yanında, histon modifikasyonları ve kromozomal remodellenmenin mesane kanseri ile ilişkisini ele alan çalışmaların sayısı sınırlı olmakla birlikte global histon HK420 trimetilasyonu ile LSD1 ve EZH2'nin artan ekspresyonunun önemi üzerinde durulmaktadır (122, 129).

2.2.5. Sinyal yolları ve metabolizma

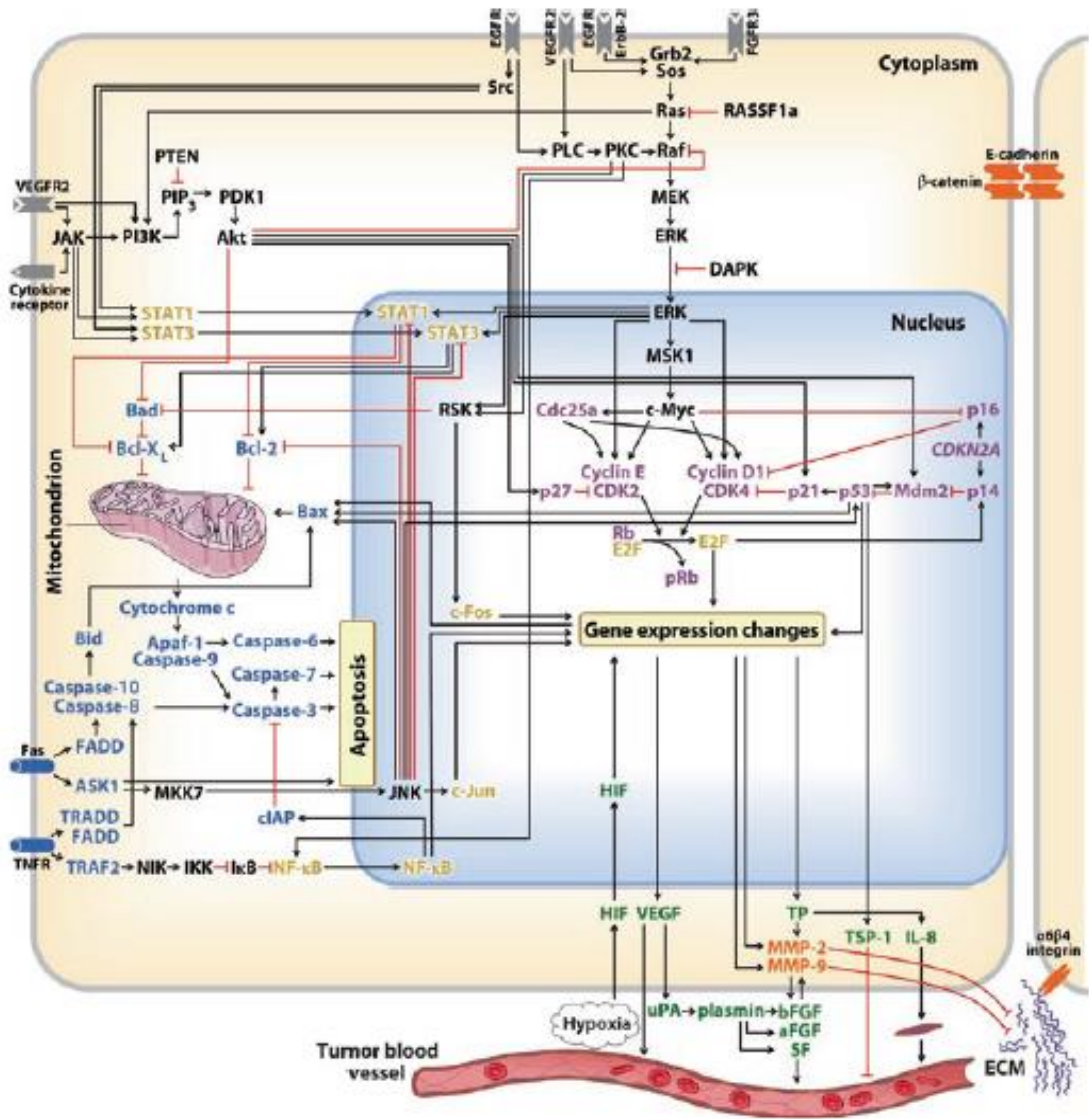
Tümör hücrelerinin beslenmesi ve metastaz geliştirebilmesi için ana stratejileri anjiyogenez yani tümör ve çevresinde damar oluşumunu indüklemek ve hücrel adezyonu kaybetmektir. Anjiyogenez induksiyonu tümör hücrelerinden ya da tümör hücrelerini infiltre eden nonmalignant hücrelerce sekrete edilen anjiyogenik faktörlerin aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (52). Transizyonel hücreli karsinoma dokusu ve sağlıklı mesane dokusu örnekleri kullanılarak yapılan IHC bazlı bir anjiyogenez çalışmasında, tümör dokusundaki asidik Fibroblast Büyüme Faktörü

(aFGF) düzeyinin sağlıklı mesane dokusu ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu görülmüştür (95). Benzer diğer çalışmalarda da, aFGF düzeyi mesane kanserli hastaların idrarlarında yüksek bulunmuştur. aFGR'a ek olarak mesane kanserine özgü bir anjiyogenik faktörün basit Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGR) olduğu ve mesane kanserli hastalarda, sağlıklı bireylere göre doku ve idrar bazında ekspresyon düzeyinin arttığı bildirilmiştir (96, 97). Diğer kanserlerde olduğu gibi mesane kanserinde de anjiyogenezin en büyük belirteçlerinden birisi olan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) düzeyinin de mesane kanserinde doku ve idrarda oldukça artış gösterdiği ortaya konmuş ve değişen VEGF düzeyinin rekürrens için biyobelirteç olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (98- 100).

Anjiyogenezden sorumlu yolakların anlaşılması ve anjiyogenik moleküllerin keşfedilmesi ile birlikte, anjiyogenez inhibitörleri kullanılarak kanser gelişiminin durdulması gündeme gelmiştir. Bu konuda en çok araştırılan moleküllerden biri, anjiyogenez inhibitörlerini hedef alarak proanjiyogenik özellik gösteren siklooksijenazlar (COX) olmuştur. COX-1 ve COX-2'nin artmış ekspresyon düzeyinin, prognozla doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (101). Yapılan diğer çalışmalarda aFGF, bFGF ve VEGF ile indüklenen anjiyogenez için Trombospondin-1'in (TSP-1) bir inhibitör olduğu ortaya koyulmuştur. Özellikle invaziv mesane tümörlerinde artan TSP-1 ekspresyonunun, rekürrens için koruyucu olduğu bildirilmiştir (102). TSP-1 ile ilgili yapılan çalışmalarda, p53 düzeyinin TSP-1 ekspresyonu için pozitif bir regülatör olduğu görülmüştür. Bu durumda p53 fonksiyonunu etkileyen defektlerin dolaylı olarak anjiyogenezin inhibe edilmesini engellediği söylenebilmektedir (103). Anjiyogenezle ilgili bir diğer konu ise mikrodamar dansitesidir. Mikrodamar dansitesi, tümör çevresindeki ve içerisindeki anjiyogenez ve mikrodamar oluşumunun düzeyini tarif etmektedir. Yeni oluşan damarlardaki vasküler endotelyal hücrelerde bulunan belirteç proteinlerin antikorlarla işaretlenmesi, ilgili dokudaki anjiyogenez yoğunluğu açısından bilgi vermektedir. Yapılan alışmalar mikrodamar dansitesinin prognostik bir faktör olarak kullanılabileceğini, tümör evresi, derecesi ve kısalımış yaşam süresi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (104, 105).

Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden birisi olan metastaz, hücrel adezyon kaybının sonucunda görülen istilacı ve kötü prognozla karakterize bir olaydır. Ekstra Selüler Matriks (ECM), proteoglikanlar ve hücreler arası adezyon molekülleri, hücrelerin kümelenerek dokuları oluşturması için örgütlenmiş bir sistem yaratmakta, hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve morfogenezini regüle etmekte ve aynı zamanda bir bariyer olması sebebiyle de kanser hücrelerinin metastaz yapmasını önlemek gibi koruyucu bir görev de üstlenmektedir. Kanserde ekspresyon düzeyi artan ve temel görevi ECM ve bazal membranın proteolitik degradasyonunu sağlamak olan Matriks Metalloproteinazları (MMP), organogenez ve normal doku gelişiminin anahtar proteini olmasına karşın kanser durumunda metastazın önünü açan bir problemdir (52). Mesane kanserli hastaların örneklerinden yapılan çalışmalarda MMP-2 ve MMP-9 miktarının, tümörün evresi ve derecesi ile korele olarak arttığı ve prognostik değer taşıdığı gösterilmiştir (106- 109). Metastazla ilgili önemli noktalardan bir diğeri de hücre adezyon molekülleridir. Hücre yüzeyinde eksprese edilen adezyon molekülleri, hücrelerin birbirleriyle, ECM ile ve çevreleriyle olan etkileşimlerinde önemli role sahiptirler. Mesane kanserine ilişkin yapılan adezyon molekülü çalışmalarında CD44 ifadesinin, anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (110- 112). Bununla birlikte mesane kanserinin evre ve derecesine göre CD44 ve onun alternatif splicing sonucu oluşan varyantlarının seviyesinin değiştiği bildirilmiştir (113- 115). Bunların dışında E-kaderinler, Selektinler, İntegrinler ve ICAM gibi adezyon moleküllerini ele alan mesane kanserine ilişkin bazı çalışmalarda, prognoz ve rekürrens açısından anlamlı ilişkiler gösterilmiştir (116- 119).

Mesane kanseri tümörögenezi, hücre içerisindeki homeostatik yolların çoklu deregülasyonları ve birbiriyle kompleks ilişkiler içerisinde olan birçok molekülün alterasyonunu kapsamaktadır. Bu yollardaki deregülasyonların tümü, hücrelerin ve dolayısıyla tümörün kaderini belirlemektedir (Şekil 4). Bu yollardaki değişikliklerin doğru anlaşılması, erken evrede tümörün geleceği ile hastanın prognozu hakkında yorum yapma konusunda ve yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesinde yardımcı olacaktır (7).



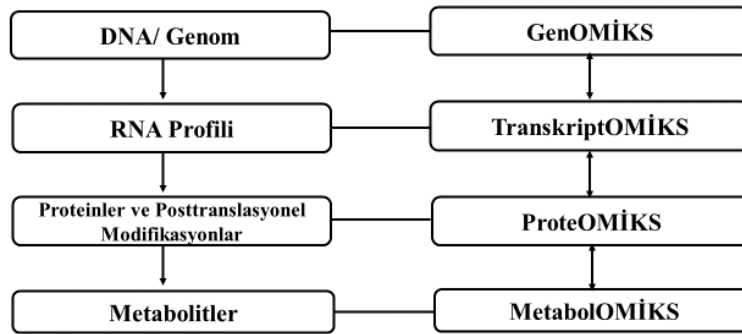
Şekil 4. Mesane kanseri progresyonunda moleküler yollar ve dereglasyonları. Hücre yüzeyi boyunca dağılmış olan büyüme reseptörlerine gelen sinyallerle (gri renkle görselleştirilenler) harekete geçen mitojenik etkili moleküller (siyah renkle yazılanlar), hücre döngüsünün regülasyonunda görevli molekülleri (mor renkle yazılanlar) ve apoptotik süreçte görevli molekülleri (mavi renkle yazılanlar) etkilemektedir. Bu durum anahtar transkripsiyon faktörleri (sarı ile yazılanlar) tarafından kontrol edilen gen ekspresyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Tümör hücreleri aynı zamanda anjiyogenezde görevli bazı moleküllerin (yeşil renkle yazılanlar) ve ECM'nin degradasyonunda görevli bazı proteazların (turuncu renkle yazılanlar) ekspresyon düzeylerinde değişiklikler yaratarak ekspansiyonu ve metastazı kolaylaştırıcı yönde strateji izlemektedir.

(Kaynak: Hansel DE, Seth PL. Precision Molecular Pathology of Bladder Cancer. Springer, 2018.)

2.3. Omik Bilimler

“Omik (omic)” terminolojisinin latin dilindeki “-ome” ekinden türetildiği düşünülmektedir ve temel olarak “çok, pek çok” gibi anlamlara gelmektedir. Biyolojik bilimlerdeki gelişmelere paralel olarak, sistem biyolojisi ve biyoinformatik gibi bütünsel perspektifte bakış açısı sunan bilim alanları doğmuş ve çalışma alanları spesifikleşmiştir. İnsan genomu ve DNA yapısının yakın tarihte daha ayrıntılı anlaşılmasına başlanması ile birlikte, genetik bilgidaki akışın DNA’dan RNA’ya, RNA’dan proteine ve proteinden ise hücresel metabolitlere doğru olduğu görülmüştür. Tüm bu akış sürecinin her aşamasında kompleks ve dinamik proseslerin yer aldığı ve bu adımların sıkı ilişki içerisinde olduğu anlaşılmıştır (151).

Genetik bilginin akışındaki dinamik sürecin ana adımlarının her biri kendisine genomiks, transkriptomiks, proteomiks ve metabolomiks şeklinde bütünsel çalışma alanı bulmuştur (Şekil 5). Bu ana omiklerin yanında, bunlarla iç içe olan ve bu alanların alt dalları olarak sayabileceğimiz epigenomiks, nutri-genomiks, fosfoproteomiks, lipidomiks ve glikomiks gibi disiplinler de ortaya çıkmıştır. Organizmayı meydana getiren canlı hücrelerdeki tüm genlerin oluşturduğu genomu konu alan omik bilim “genomiks” iken, bu genlerden ifade edilen RNA ürünlerini konu alan omik bilim “transkriptomiks”tir. RNA anlatımının proteine dönüşen ürünlerini yani hücrenin tüm proteomunu ve fonksiyonunu ele alan omik bilim “proteomiks”tir. Proteomu meydana getiren protein ürünlerinden hücresel prosesler sonucunda oluşturulan metabolitleri konu alan omik bilim “metabolomiktir” (151).



Şekil 5. Temel omikler ve aralarındaki ilişki.

2.3.1. Proteomiks

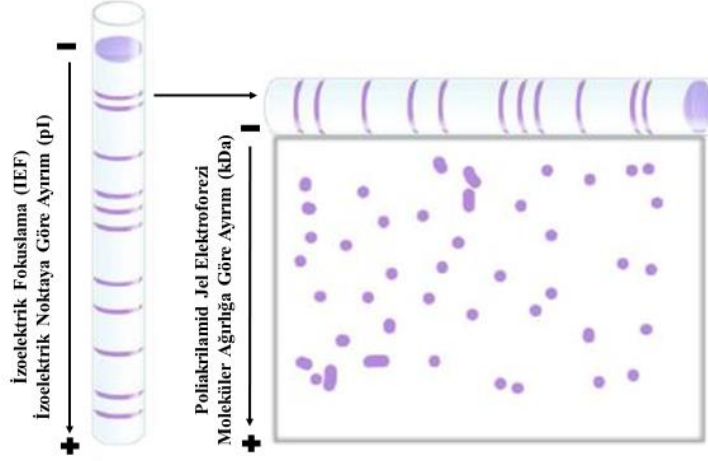
İnsan Genom Projesi'nin ilk başladığı yıllarda, tüm insan genomunun ve önemli model organizmaların genomunun tamamen sekanslanmasının, “bir gen bir polipeptid” hipotezi perspektifinden bakılınca hücreye ilişkin birçok soruya yanıt vereceği ve hastalıklara ilişkin radikal çözümler üretmeye zemin hazırlayacağı bekleniyordu. Bu beklentiyle tam olarak örtüşmeyecek biçimde daha başlangıç aşamasında, genomdaki gen sayısının beklenenden oldukça az olduğu anlaşılmış ve her proteinin sentezinden sorumlu ve birbirinden tamamiyle bağımsız ayrı gen bölgelerinin olmadığı görülmüştür. Üstelik genomun çok büyük bir kısmının, tahmin edilenin aksine, kodlama yapmayan intronik bölgelerden oluştuğu sonucu ortaya çıkmıştır. Bu noktadan sonra araştırmalar, genom bazlı çalışmaların yanında daha işlevsel olan ve transkripsiyon, translasyon ve posttranslasyonel modifikasyonların birlikteliğinin meydana getirdiği “proteom” üzerinde yoğunlaşmıştır (144).

Hücrenin tüm protein içeriğini ifade eden proteom, canlı sistemlerinde hücreden hücreye, hücredeki metabolik işlevlere ve zamana göre değişiklik gösteren dinamik bir kavramdır. Hücre proteomu, hücrenin belirli bir zamandaki protein profilini yansıtması yönünden oldukça bilgi sağlayıcıdır (144). Proteomun ileri biyokimyasal teknikler ile analiz edildiği, proteinlerin kimyasal ve yapısal özelliklerinin ortaya koyulduğu çalışmaları konu alan proteomiks bilimi ise tıbbın birçok alanında, kanser ve birçok kompleks hastalık için terapötik hedefler ile biyobelirteçler keşfedilmesine büyük katkılar sunmaktadır. Kuruluşu 2001 yılına dayanan İnsan Proteom Organizasyonu (HUPO), protein eksprese ettiği düşünülen genlerin ürünleri ile tüm insan protein izoformlarının tanımlanarak hastalıkların tanısında ve tedavisinde kullanılması yönünde önemli bir adım atmış ve bu adımı 2005 yılında oluşturulmaya başlanan İnsan Protein Atlası takip etmiştir. Tüm bu süreçlerin ilerleyişi sürecinde önemli teknikler olan iki boyutlu jel elektroforezi gibi jel bazlı analizler ve kütle spektrometresi gibi proteomik disiplininin hassas araçları büyük önem taşımaktadır (144- 147).

2.3.1.1. İki boyutlu jel elektroforezi

1975 yılında O'Farrell ile arkadaşları Scheele ve Klose tarafından ortaya koyulan 2 Boyutlu Jel Elektroforezi (2DGE) analizi, proteomiks çalışmalarında akla gelen ilk metot olmuştur. Keşfedildiği zamandan itibaren iyileştirilerek günümüzdeki versiyonuna ulaşılmıştır. Protein ayrımı, proteomun analiz edilebilmesi için ilk şarttır ve 2DGE yaklaşık 10.000 proteine kadar ayırım yapabilme kapasitesine sahiptir. Bu metodun temel mantığı, birinci boyutta proteinlerin izoelektrik fokuslama (IEF) ile bir pH gradyentinde sahip oldukları yüklere göre ayrılması prensibi ile başlamaktadır. Bu aşamada proteinlerin denatüre edilmesi ve ayrışmak üzere çözülmesi sağlanmaktadır ve bu kısımda kullanılan rehidrasyon tamponu içeriğinde barındırdığı üre ve tiyoüre gibi güçlü ajanlar sayesinde non-kovalent bağların zayıflatılıp kırılmasına yardım etmektedir. Yine bu ilk boyutta kullanılan izoelektrik fokuslama şeritleri oldukça kolaylık sağlayabilmektedir (144).

İkinci boyutta ise proteinler denatüre edici iyonik özellikteki Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile proteinler moleküler ağırlıklarına göre de bir ayırma tabi tutulmaktadır. Böylece bu iki boyutun yani izoelektrik fokuslama ile ve moleküler ağırlığa göre ayırma yöntemlerinin bir arada kullanılması verimli bir ayırma sağlamaktadır (Şekil 6). Bu ayırımdan sonra jelde bulunan protein spotları kesilerek kütle spektrometresi ile analiz edilebilmektedir. Kütle spektrometresi ile devam edilmeyecek ise jeller görüntüleme araçları ile görüntülenebilir ve bu görüntüleme araçları ile entegre yazılımlar sayesinde jel analizleri yapılabilmektedir (144- 147).

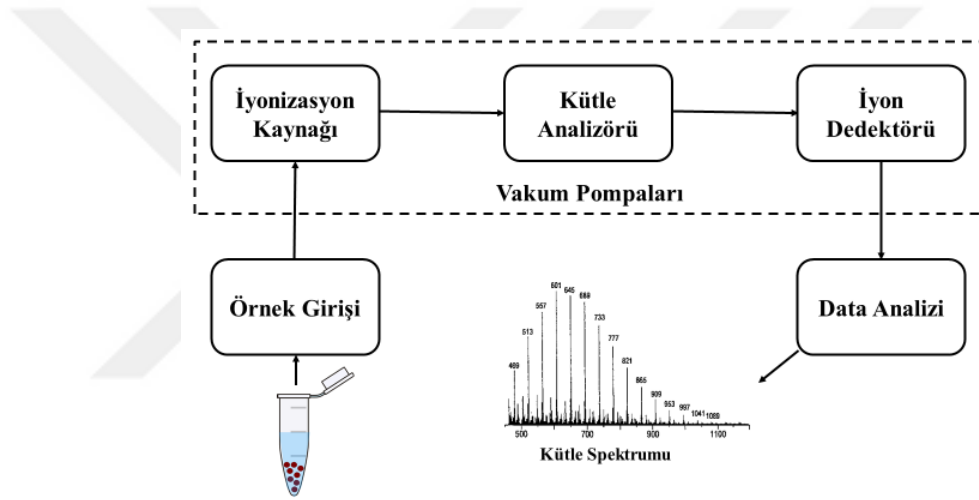


Şekil 6. 2DGE’de proteinlerin iki boyutlu ayırımı.

2.3.1.2. Kütle spektrometresi

2DGE, proteinlerin ayırımı ve analizi için yaygın ve etkili olmasına karşın kısıtlılıkları olan bir tekniktir. Jel analizi ile ayrılan proteinlerin Edman degradasyonu ile dizileme metodu kullanılarak analiz edilmesi protein tanımlaması çalışmalarına önemli katkı sunmuştur (144). Daha sonraki aşamada geliştirilen kütle spektrometresi (Mass Spectrometry, MS), yüksek sensitivite ve duyarlılığına ek olarak protein örneklerinin etkin bir şekilde analiz edilmesine imkan vermesi sayesinde kendisine oldukça yaygın bir kullanım alanı bulmuş ve diğer birçok işlevinin yanı sıra, araştırmacılar tarafından Edman degradasyonu ile dizileme metoduna bir alternatif olarak da kullanılmaya başlanmıştır (144, 148). Kütle spektrometresi, proteinleri iyonlaştırarak genellikle tek yüklü olmak üzere, pozitif ve yahut negatif iyonlara dönüştürüp kütle/ yük (m/z) oranlarına göre ayırma prensibine dayanmaktadır (151). Kütle spektrometrelerine çok çeşitli analizörler entegre edilerek ayrılan iyonların deteksiyonu ile sayımı yapılmakta ve bu kantitatif veriler işlenerek protein örneklerine ait somut veriler elde edilebilmektedir. Özellikle kütle spektrometrelerinin femtomole kadar olan duyarlılığı ve hassaslığı proteomik bazlı çalışmalarda hız kazandırmıştır. Bu anlamda kütle spektrometrelerinin biyokimyasal çalışmalarda kullanımı ilk defa 1950’li yıllarda steroid analizleri ile başlamış ve günümüze kadar değişik varyasyonlar ile gelişip değişerek kullanılmaya devam etmiştir (144, 151). Kütle spektrometreleri temel olarak örnek giriş kısmı, iyonizasyon kaynağı, kütle analizörü, iyon dedektörü

bileşenlerinden oluşmaktadır (151) (Şekil 7). Kütle spektrometrelerine numune girişi genellikle Likit Kromatografi (Liquid Chromatography, LC) ya da Gaz- Likit Kromatografi (Gas- Liquid Chromatography, GCL) ile sağlanmaktadır. Örnek giriş kısmının temel amacı, örneklerin analiz için iyonlaştırılacağı iyonizasyon kaynağına doğru şekilde iletilmesinin sağlanmasıdır. İyonizasyon kaynağı ise örneğin foton bombardımanı ya da elektron bombardımanı ile iyonlara dönüştürüldüğü kısımdır. İyonizasyon kaynağı analit çeşidine ve analizden beklentilere göre değişik türlerde tercih edilebilmektedir. İyonizasyon kaynakları temel olarak gaz faz iyonizasyon kaynakları ve desorpsiyon iyonizasyon kaynakları olarak ikiye ayrılmaktadır (153).



Şekil 7. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri.

Gaz faz iyon kaynakları, yüksek derecede enerjili elektron vasıtasıyla iyonlaştırma yapan Electron Impact (EI), reaktif gaz iyonları kullanarak iyonlaştırma yapan Chemical Ionization (CI) ya da yüksek potansiyelli elektrot ajanları kullanılarak yapılan alan iyonizasyonu olabilmektedir. Desorpsiyon iyonizasyon kaynakları ise yine yüksek potansiyelli elektrot ajanları ile desorpsiyon iyonizasyonunun yanında yüksek elektrik akımı kullanılarak iyonlaştırma yapılan Electrospray Ionization (ESI), lazer kaynağı ile iyonizasyon sağlayan Matriks Destekli Desorpsiyon İyonizasyonu (Matriks Asisted Laser Desorption Ionization, MALDI), atomik enerji kullanılarak Hızlı Atom Bombardımanı (FAB) ya da yüksek ısı kullanılarak iyonizasyon yapan Thermospray Ionization (TS) olarak sıralanabilir (153).

İyonizasyon işlemi ile iyonlaşan analite ait moleküller daha sonra kütle analizörüne geçmekte ve burada kütle/ yük oranına göre ayrıştırılarak detektöre gönderilmektedir. Kütle analizörlerinin çok küçük kütle/yük farklarını bile yüksek duyarlılıkta analiz etmesi beklendiğinden, iyonizasyon kaynaklarının seçimindeki gibi yapılacak analize ve analizden beklenen sonuçlara göre uygun şekilde seçilmesi oldukça önemlidir. İyon yolu üzerinde bulunan kütle analizörleri bazen bir tane yerine birden fazla olarak tercih edilebilmekte ve bu durumlarda bu kütle analizörleri arasına bir çarpışma odası (collision chamber) yerleştirilmektedir. Mevcut durumda altı adet kütle analizörü kullanımdadır. Bunlardan en yaygın olan Time of Flight (TOF) Kütle Analizörü olmak üzere diğer beş tanesi; Quadrupole Kütle Analizörü, Magnetic Sector Kütle Analizörü, Electrostatic Sector Kütle Analizörü ve Ion Cyclotron Kütle Analizörü'dür. Kütle analizöründen çıkan iyonlar daha sonra detektöre ulaşarak analiz edilmektedir. Tüm bunlarla birlikte kütle spektrometrelerinin çok yüksek basınç altında çalıştığını düşünürsek, vakum pompalarının da kütle spektrometrelerinin bileşenlerini tamamlayan en önemli araçlardan biri olduğu söylenebilir (151, 153).

Kütle spektrometreleri tek iyonizasyon kaynağı ve kütle analizörü ile kullanılabilmelerine karşın çoğunlukla belirli analitler için spesifikleştirilmek üzere birden fazla sistemin bir araya getirilerek oluşturulduğu birleşik sistemler olarak da kullanılabilirler. Birleşik sistemlerin, analiz hızını, spesifikliğini ve duyarlılığını arttırmak, maliyeti ve örneklerin analizi için pre-prosesleri azaltmak ya da kompleks analitlerin deteksiyon aralığını arttırmak gibi avantajları olabilmektedir. Bu sistemlere örnek olarak MALDI- TOF, ESI- TMS ve SELDI- TOF verilebilir. Ancak proteom analizinde kullanılan en yaygın birleşik sistemin Likit Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry, LC-TMS) ya da diğer bir adıyla LC-MS/MS olduğunu söylenebilir (144, 153).

LC-MS/MS'de analiz edilecek protein örnekleri, analiz öncesinde tripsin gibi belirli amino asit dizilerine özgü olan proteazlarla enzimatik olarak sindirilerek peptidlerine ayrılmalıdır (144, 148). Böylece kütle spektrometresinin deteksiyonuna uygun kütle/yük oranına sahip olması sağlanmaktadır. Bu sistemdeki kromatografik

kısım, enzimatik parçalanma ile oluşturulan peptidlerin kütle spektrometresine girmeden önce ayrıştırıldığı yerdir. Daha sonra ise peptidler sıralı kütle analizörlerine gönderilmektedir. Birinci kütle analizörünü terk eden peptidler parçalanarak ikinci kütle analizörüne girmekte ve böylelikle amino asit sekansı belirlenebilmektedir (144). Bu sistemler kullanılarak yapılan peptid ve proteom bazlı analizler sonucunda elde edilen peptid haritaları, veritabanları ile karşılaştırılmakta ve spesifik yazılımlar kullanılarak işlenmiş veri elde edilmektedir (144- 153).

2.3.2. Mesane kanseri bazlı proteomik çalışmalar

Omik bilimler ve proteomikte yaşanan teknolojik gelişmeler ve analiz araçlarının artan hassasiyet düzeyleri kanser araştırmalarını hızlandırmıştır. Son on yılda yapılan mesane kanseri bazlı çalışmaları önemli bulgular ortaya koymuştur. Frantzi ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada, literatürde yer alan mesane kanseri bazlı proteomik çalışmalar gözden geçirilmiş ve geleceğe yönelik mesane kanseri çalışmalarının hangi yöne evrildiği ifade edilmiştir (132). Varılan noktada güçlü biyobelirteç adaylarının ve umut vaat eden terapötik hedeflerin keşfedildiği görülmektedir. Henüz tek başına kullanılacak bir biyobelirteç adayı ya da biyobelirteç panelleri bulunamamasına karşın çalışmalar sürmektedir. Yapılan çalışmaların çok büyük bir kısmı idrar proteomu üzerine yoğunlaşmaktadır. Bunun sebebi olarak idrar bazlı analizlerin non-invaziv olması ve sadece mesane kanserinde gözleyebileceğimiz bir özellik ile idrarın, bir rezervuar olan mesane içerisinde tümör ve tümörün sekretomu ile temas halinde olması gösterilmektedir. İdrar bazlı çalışmaları doku proteomu çalışmaları takip etmektedir. Çok az sayıda çalışma, kan ve serum örneklerinin üzerinde durmaktadır.

2.3.2.1. İdrar bazlı proteomik çalışmalar

İdrar bazlı proteomik analizlerde Kapiller Elektrofrezisi- Kütle Spektrometresi (CE-MS) yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu konudaki ilk çalışma 2006 yılında Theodorescu ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Çalışmada 46 mesane kanserli hastanın ve 33 sağlıklı gönüllünün idrar örnekleri ile analiz yapılmış ve 22 belirteç

adayı belirlenmiştir. Sonraki aşamada bu 22 belirteç adayı için yine idrar örnekleri kullanılarak validasyon ve spesifite çalışmaları yapılmış ve bu 22 belirteç adayının bir panel olarak mesane kanserinin tespiti için yüksek sensitivite ve spesifite gösterebildiği ancak bunlar arasından sadece over ve gastrik kanserlerde tanımlanmış olan Fibrinopeptid A'nın mesane kanseri sınıflaması için kullanılabileceği ifade edilmiştir (154). Schiffer ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı çalışmada, invaziv ve non-invaziv mesane tümörleri karşılaştırılmıştır. Çalışma için 424, validasyon için 130 adet farklı gruplarda idrar örneği kullanılarak CE-MS ile analiz edilmiştir. Varılan noktada Membrane Associated Progesteron Receptor Component-1, Kollajen α -1 (I) zinciri, Kollajen α -1 (III) zinciri ile Uromodulin'inin %92 sensitivite ve %58 spesifite ile invaziv ve non-invaziv mesane tümörleri arasında farklılık gösterdiği ve sınıflandırma kullanılabileceği ifade edilmiştir (155).

Frantzi ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı retrospektif çok merkezli çalışma örnek sayısı bakımından büyük önem taşımaktadır. Toplam 1357 idrar örneğinin CS-MS ile analizini kapsayan çalışmada, iki farklı biyobelirteç paneli kullanarak iki farklı amaç hedeflenmiştir. Toplam 116 peptidden oluşan ilk biyobelirteç paneli, idrardan mesane kanseri tanısını hedef almış ve analiz sonucunda paneldeki proteinlerden Kollajen Fragmentleri, Hemoglobin A, Apolipoprotein A, Fibrinojen A, B2-Mikroglobülin, Small Proline Rich Protein-3 ve Histidine-Rich Glycoprotein'in %91 sensitivite ve %68 spesifite ile mesane kanseri tanısında kullanılmak üzere anlamlı bulunmuştur. Toplam 106 peptidden oluşan ikinci biyobelirteç paneli ise mesane kanserinde rekürrens deteksiyonunu hedef almış ve analiz sonucunda panelde yer alan proteinlerden Kollajen Fragmentleri, Apolipoprotein A-I, HSPG2, ADAMTS1 ve ADAM22 %87 sensitivite ve %51 spesifite ile rekürrens takibinde kullanılmak üzere önerilmiştir (156).

Shimizu ve arkadaşlarının 2016'da yaptıkları 262 idrar örneğini kapsayan Multipleks ELISA bazlı çalışmada IL8, MMP9, MMP10, ANG, APOE, SDC1, A1AT, API1, CA9 ve VEGFA proteinlerini kapsayan onlu biyobelirteç panelinin %85 sensitivite ve %81 spesifite ile mesane kanserinde kullanılabileceği ifade edilmiştir

(157). Aynı yıl benzer bir çalışma Huang ve arkadaşları tarafından yapılmış ve çalışmada 686 idrar örneği ELISA ile analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda MMP9, MMP10, IL8, VEGFA, SERPINE1, SERPINA1, CA9, APOE, ANG ve SDC1 proteinlerinin %78 sensitivite ve %86 spesifite ile mesane kanserinde kullanılabileceği ifade edilmiştir (158). Rosser ve arkadaşlarının 2014'te yaptığı çalışmada ise yine IL8, MMP9, MMP10, SERPINA1, VEGFA, ANG, CA9, APOE, SERPINE1 ve SDC1'den oluşan onlu biyobelirteç paneli ele alınmış ve 125 idrar örneği üzerinde yapılan ELISA bazlı çalışmada %79 sensitivite ve %88 spesifite ile bu panelin rekürrens için kullanılabileceği ifade edilmiştir (159). Goodison ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları 127 idrar örneğini kapsayan ELISA bazlı çalışmada, IL8, MMP9, PAI1, VEGF, ANG, CA9, APOE ve MMP10 proteinlerini kapsayan sekizli biyobelirteç panelinin mesane kanserinde %92 sensitivite ve %97 spesifite ile prognoz amaçlı kullanılabileceği ifade edilmiştir (160). Aynı yıl Urquidi ve arkadaşları tarafından PAI1, CCL18 ve CD44 belirteç adayları 127 idrar örneğinden ELISA ile analiz edilmiş ve bu belirteç kombinasyonunun %86 sensitivite ve %81 spesifite ile mesane kanseri deteksiyonunda kullanılabileceği gösterilmiştir (161).

Tyan ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada mesane kanserli hastaların idrar proteomunda Disintegrin ve Metalloproteinaz İçeren Domain- 28 (ADAM28) başta olmak üzere birçok abundant protein tanımlamışlardır. Daha sonra ise Western Blot ve ELISA kullanarak yaptıkları analizlerde ADAM28'in mesane kanseri hastalarının idrarlarında kontrollere kıyasla anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir (132, 163). Shimwell ve arkadaşları, mesane kanserine özgü proteom araştırmalarına, gen ekspresyonundaki değişikliklerin de dahil edilmesi gerektiğini düşünmüş ve idrar proteom analizi ile karşılaştırmalı transkriptom analizini birleştirmişlerdir. Yaptıkları 2013 yılındaki çalışmada 642 mesane kanserli hastaların idrar örneklerinden Midkine ve Hepatosit Büyüme Faktör Aktivatör İnhibitör Tip 1 (HAI-1) düzeyini ELISA ile analiz etmişler ve sağlıklı kotrollerle karşılaştırmışlardır. HAI-1 ve Midkine'in mesane kanserli hastaları sağlıklı kontrollerden ayırması konusundaki performansını değerlendirmek için kanser progresyonu ile farklı kanser evreleri için sağlıklı kontrollerle kıyaslama yaparak hesapladıkları ROC değerlerini kullanmışlardır. Bu doğrultuda Midkine için Ta evre mesane kanseri hastalarının

örnekleri ile kontrol grubunun örneklerinin karşılaştırılması sonucu elde ettikleri ROC değeri 0.574 iken, T1 ile kontrol karşılaştırmasında 0.708, T2 ve üzeri evre ile kontrol karşılaştırmasında ise 0.851'dir. Aynı şekilde HAI-1 için elde edilen ROC değerleri ise sırasıyla 0.566, 0.748, ve 0.886 olarak bildirilmiştir (132, 165). Bu karşılaştırmalı aktivite analizine benzer olarak, Zoidakis ve arkadaşları ile Taylor ve arkadaşları, üriner aminopeptidazların mesane kanseri ile olan ilişkisini aktivite analizleri kullanarak araştırmışlardır. Araştırmacıların 16 mesane kanseri hastasından oluşan küçük bir setle yaptıkları çalışmada, Aminopeptidaz N (ANPEP), Glutamil Aminopeptidaz (ENPEP), Dipeptidil Peptidaz 4 (DPP4), Dipeptidil Peptidaz 7 (DDP) ve Dipeptidil Peptidaz 1 (CTSC)'den oluşan beş aminopeptidazın, kontrol grubu örneklerine kıyasla anlamlı derecede farklı bulunduğu bildirilmiştir (132, 166).

Mesane kanserine ilişkin idrar bazlı proteomiks çalışmalarında Apolipoprotein A1, Apolipoprotein A2 ve Apolipoprotein E'nin yüksek performanslı olarak raporlandığı görülmektedir. Kim ve arkadaşları 2019 yılında yaptıkları çalışmada idrardan mesane kanserini tespit etmek amacıyla Apolipoprotein A1 deteksiyonunu sağlayan immünoensör geliştirdiklerini bildirmişlerdir (162). Chen ve arkadaşları 2010- 2013 yılları arasında mesane kanserli hastaların idrar örneklerinden LC-MS/MS bazlı üç farklı çalışma yapmışlar ve Apolipoprotein A1, A2 ve E düzeyinde anlamlı artış olduğunu görmüşlerdir. Li ve arkadaşları ise benzer şekilde 2011 ve 2014 yıllarında mesane kanserli hastaların idrar örneklerinden 2DE-MALDI-TOF bazlı iki farklı çalışma yapmışlar ve kontrol grubuna göre artmış üriner Apolipoprotein A1 düzeyi ile karşılaşmışlardır. Apolipoproteinlerin yanında, mesane kanserinde Karbonik Anhidraz 1, Heparin Kofaktör 2, Fibrinojen Beta ve Alfa-1 Antitripsin'in idrarda artan konsantrasyonları dikkat çekmektedir (132).

2.3.2.2. Serum bazlı proteomik çalışmalar

Mesane kanserinde kan- serum örneklerinin proteomik bazlı analizi, idrar bazlı analiz kadar yer bulamamıştır. Bansan ve arkadaşları 2014 yılında, 33 düşük dereceli ve 32 yüksek dereceli mesane tümörü olan hastadan aldıkları serum örneklerini 25

sağlıklı bireyden aldıkları serum örnekleri ile 2DGE, MALDI-TOF, Western Blot ve ELISA tekniklerini kullanarak karşılaştırmış ve kontrol grubuna göre artmış S100A8, S100A9 ve Karbonik Anhidraz 1 düzeyleri olduğunu bildirmişlerdir (132, 163). Bununla birlikte mesane kanserinde tümör dokusu ve hücre kültürü ürünleri kullanılarak yapılan çalışmaların ise daha çok 2DGE ve immünohistokimyasal bazlı olduğu görülmektedir. Barbora ve arkadaşları yaptıkları çalışmada mesane kanseri progresyonuna ait belirteçler keşfetmeyi amaçlamışlardır. Yaptıkları çalışmada 21 kasa invaze mesane tümör dokusu ile 3 normal ve 9 tümör dışı mesane dokusu örneğini 2DGE ile analiz etmişler ve Lamin B1 ile Fibrinojen Betaz Zinciri'nin belirgin şekilde upregüle olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte Aktin, Desmin ve Vimentin'in ise önemli derecede azaldığını ifade etmişlerdir. Bu bulgulara ek olarak araştırmacılar Protein p54 ile kas invazyonunun (0.645 Pearson Korelasyonu; $p= 0.002$) ve sağkalımın anlamlı düzeyde körele olduğunu ifade etmişlerdir (132, 167).

2.3.2.3. Doku bazlı proteomik çalışmalar

Chung ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada kasa invaze mesane tümörü ile kasa invaze olmayan mesane tümörünü karşılaştırmışlar ve yaptıkları çalışmada ekspresyonunda farklılık olan 12 protein tanımlamışlardır. Özellikle bu proteinlerden Kofilin'in T24 mesane kanseri hücrelerinin biyolojik fonksiyonunun düzenlenmesinde potansiyel bir öneminin olabileceği ifade edilmiştir. Araştırmacılar, Kofilin fosforilasyonunun, kasa invaze mesane tümöründe, kasa invaze olmayan mesane tümörüne kıyasla belirgin şekilde daha fazla olduğunu Western Blot ve immünohistokimyasal analizle göstermişlerdir. Bununla birlikte EGF'in Kofilin fosforilasyonunu arttırdığı ve fosforillenmiş Kofilinin T24 hücrelerinin migrasyonunda regülatör olduğu ifade etmişlerdir (168).

Wu ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada, 185 primer mesane kanseri vakasında Galektin-1 ekspresyonunu immünohistokimyasal analizle incelemişler ve Galektin-1 aşırı ekspresyonunun mesane kanseri patolojisi ve prognozuyla ilişkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda artmış Galektin-1

düzeşinin tümör derecesi ($p=0.037$), kasa invazyon ($p= 0.02$) ve sağkalım ile anlamlı derecede korele olduğunu göstermişlerdir (132, 169). Chen ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada, mesane tümör dokusu ve ona komşu sağlıklı mesane dokusu örneklerinin proteomunu karşılaştırmak istemişler ve doku örneklerinin kesin sınırlarla ayrılabilmesi için örnekleri lazerli mikrodiseksiyon ile hazırlamışlardır. Proteom analizi sonucunda, sağlıklı dokulardan farklı düzeyde tümör dokusunda eksprese edilen 4F2 Hücre Yüzeyi Antijen Ağır Zinciri (SLC3A2), Transgelin-2 (TAGLN2) ve Stathmin (STMN1)'den oluşan üç önemli proteine dikkat çekmişlerdir. Buna ek olarak araştırmacılar özellikle STMN1 ve TAGLN2'nin mesane kanseri hastalarının idrarlarında da anlamlı düzeyde arttığını bildirmişlerdir (132, 170).

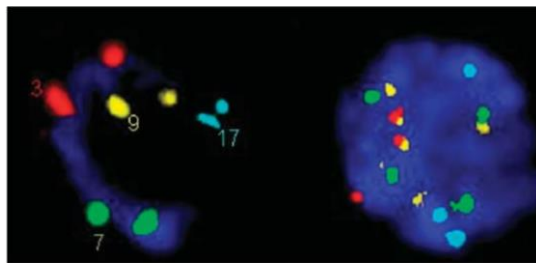
Shrinivasan ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada, lokal rekürrensi olan ve olmayan hastalar arasında farklı olarak eksprese edilen proteinleri tanımlamak için antikor mikroarray tekniğini kullanmışlardır. Araştırmacılar, rekürrensi olan 19 mesane kanseri hastasının tümör dokusu ve rekürrensi olmayan 6 mesane kanseri hastasının tümör dokusunu kullanarak bu iki grup arasında 255 farklı protein tanımlamışlardır. Bunlar arasında özellikle Prelamin-A/C (LMNA), Transcription Factor AP-1 (JUN) ve Nuclease Sensitive Element Binding Protein-1 (YBOX1) proteinlerinin ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı, bununla birlikte L-selectin, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor-1 (CDN1A) ve Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3 (SMAD3) proteinlerinin ekspresyon düzeyinin ise anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Bunlara ek olarak araştırmacılar, analiz ettikleri proteinlerden 20 tanesinden oluşan bir panelin, mesane kanseri hastalarında rekürrensi %91 doğrulukla öngörebileceğini ifade etmişlerdir (132, 171).

2.3.3. Yüksek performanslı biyobelirteçler

Tümör belirteçleri, kanserin erken evrede teşhis edilmesi, hastalara tanı koyulması, uygulanan tedaviye verilen cevabın değerlendirilmesi ve nüks durumunun takip edilmesi için kullanılabilen biyolojik moleküllerdir. Mesane kanseri tanısında altın standart yöntem sistoskopi ve idrar sitolojisi birlikteliğidir ve bunların yerini tek başına alabilecek bir biyobelirteç hala keşfedilememiştir (11, 19). İdrar sitolojisi,

İdrara ya da mesane yıkama sıvısına geçen hücrelerin sitolojik analizini ifade etmektedir. İdrar sitolojisinin yüksek dereceli tümörlerin tespit edilmesindeki hassasiyeti, düşük dereceli tümörlerinkine göre daha fazladır ve uzman bir patolog ile çalışmayı gerektirmektedir (3, 19). Sistoskopik muayene ise mesane içerisinin doğrudan incelenmesine ve mesaneden biyopsi materyali alınmasına imkan vermekle beraber, invaziv, acılı, zaman kaybettirici ve pahalı bir metoddur (3). Buna ek olarak nüks ve progresyon takibi, hastalara çok sık aralıklarla sistoskopik muayene yapılmasını gerektirmektedir. Tüm bunların bağlamında, non-invaziv, pratik ve yüksek duyarlılıkta biyobelirteçlerin keşfedilmesi için uzun yıllardır yoğun çalışmalar yürütülmektedir.

Güncel durumda, idrar sitolojisi ile kombine edildiklerinde başarılı sonuçlar ortaya koyabilen bazı belirteçler keşfedilmiştir. Mesane kanserinde biyobelirteçlere ilişkin olarak düzenlenen uluslararası konsensus paneline katılan çeşitli ülkelerden ürolog ve araştırmacılar, literatürde yer alan biyobelirteç adaylarını derleyerek özgüllük ve duyarlılıklarını listelemişlerdir (Tablo 5). Bu listede yer alan belirteçlerden UroVysion, ImmunoCyt/uCyt+, NMP-22, Bta- Stat ve Bta-TRACK'in rutin kullanımda nispeten daha yaygın oldukları söylenebilmektedir (3, 131).



Şekil 8. UroVysion ile analiz sonrası kromozomal değişikliklerin görünümü.

(Kaynak: Kehinde EO. Comparison of the sensitivity and specificity of urine cytology, urinary nuclear matrix protein-22 and multitarget fluorescence in situ hybridization assay in the detection of bladder cancer. Scandinavian journal of urology and nephrology 2011; 45(2); 113-121.)

Tablo 5. Mesane kanserinde sık kullanılan bazı biyobelirteçler. ELISA bazlı testler doğrudan idrar örneğinden antijenin kantitatif analizine dayanırken, immünohistokimyasal analizler, PCR bazlı testler ve FISH idrara dökülen hücrelerden çalışılmaktadır.

Biyobelirteç	Ölçüm Metodu	Sensitivite	Duyarlılık
BTA- Stat	Dipstik İmmünoassay	%36- 89	%50- 70
BTA- TRAK	Sandiviç ELISA	%57- 83	>%50
NMP-22	Sandiviç ELISA	%47- 100	%55- 80
BLCA-4	ELISA	%96.4	~%100
Survivin	Bio-dot Test	~%100	%87- 100
UBC	Sandiviç ELISA	%36- 79	%88- 92
Sitokeratin 20	RT- PCR/ İmmünohistoloji	%82- 87	%55- 70
CYFRA 21- 1	İmmünoradyoaktif Test	%75- 97	%67- 71
HA- HAase	ELISA	%88- 94	%63- 71
Mikrosatellit DNA Testi	Genomik DNA PCR	%72- 97	>%95
Telomeraz	RT- PCR	%83- 95	%60- 70
ImmunoCyst/ uCyt+	İmmünohistokimya	%38- 90	%73- 80
DD23	İmmünohistokimya	%73- 100	%33- 68
Quanticyt	Mikroskopi	Quaticyt Det.	Ort. Nükleer Yapı & DNA
UroVysion	FISH	%68- 87	>%90

(Kaynak: Dinçer Ç. Üroonkoloji. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, 2007.)

UroVysion test yöntemi FISH (Florescence In Situ Hybridization) tekniğine dayanmaktadır ve temel mantığı mesane kanserinde en sık karşılaşılan 3, 7 ve 17 numaralı kromozomlardaki değişiklikleri ve 9p21 sitogenetik lokasyonundaki p16 tümör baskılayıcı gen lokusunun delesyonunu saptamaktır (Şekil 8) (133). Tedavi sonrası kanser henüz gelişmeden nüks durumunu tespit edebilmesi büyük bir avantaj olmasına karşın düşük evreli tümörlerde sensitivitesi zayıftır (3, 19). Bununla birlikte karsinoma in situ deteksiyonunda performansının %100'e ulaştığı bildirilmiştir (3).

ImmunoCyt (uCyt+), idrara dökülen ürotelyal tümör hücrelerindeki tümöre ilişkin spesifik antijenlerin monoklonal antikolar ile tespit edilmesi esasına dayanan, Fradet ve Lochard tarafından 1977 yılında ortaya koyulmuş immünohistokimyasal bir testtir (3, 135). Bu test üç markör antijene karşı geliştirilmiş floresan işaretli antikolar kullanılarak çalışılmaktadır. Bu antikolardan ilki Texas red linked monoklonal antikor 19A211'dir ve yüksek molekül ağırlıklı glikolize edilmiş karsinoembriyonik antijene bağlandığı zaman floresan mikroskobunda kırmızı ışığa vermektedir. Diğer

antikorlar ise LDQ10 ve M344 olup, mesane tümörü hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen musin glikoproteinlerine bağlanmaktadır. Normal şartlarda yüksek moleküler ağırlıklı glikoproteinler olan musinler ağır glikolizasyona uğrarken mesane tümörü hücrelerinde bu glikolizasyon paterni değişmekte ve LDQ10 ile M344 antikorları bu musin varyantlarının özel epitoplarına bağlanarak floresan mikroskopunda yeşil ışığa vermektedir. Yapılan çalışmalarda M344'ün için Ta ve T1 evre tümörlerinde %71 spesifite, 19A211'in ise %90 spesifite gösterdiği belirtilmiştir (135). Buna karşılık kırmızı ve yeşil floresan ışımının tespit edilebilmesi için çift filtreli bir floresan mikroskobu gerektirmesi ve kompleks bir analiz olduğundan eğitimli personel ihtiyacı gibi sebeplerle maliyetli ve zor bir test olduğu söylenebilir (3, 135, 136).

Nükleer Matriks Protein 22 (NMP22), nükleusun iç yapısı ve regülasyonu için önemli bir nonkromatin proteindir. Hücre döngüsü, hücre proliferasyonu DNA replikasyonu ve transkripsiyon süreçlerinde aktif rol aldığı düşünülmektedir. Özellikle hücre proliferasyonu bazında düşünüldüğünde mitoz bölünme sırasında kromatidlerin her iki hücreye hatasız ve eşit dağılmasında regülatör rol üstlendiği bilinmektedir. Mesane kanseri gibi patolojik durumlarda kromatid dağılımındaki hatalara cevap olarak ekspresyonunun normal durumlara göre oldukça arttığı görülmüş ve idrardaki konsantrasyonunun 25 kat arttığı saptanmıştır (3, 139). NMP22 testinin uygulanış prensibi mesane kanserli hastaların idrar örneklerinden ELISA bazlı analiz şeklindedir. Yapılan çalışmalarda testin %47- 100 spesifite gösterdiği ifade edilmekle beraber, üriner NMP22 düzeyinin idrar yolu enfeksiyonları, üriner kateterizasyon ve bağırsak hastalıklarında artmış olduğu görüldüğünden yanlış pozitif sonuç verebileceği ifade edilmiştir. Buna ek olarak kantitatif bir test olduğundan dolayı yapılacak her çalışma için ayrı cut- off değeri gerektirmektedir (137- 140).

BTA-Stat testi, immünokromatografik bir test olup çok az miktarda idrardan çok kısa süre içerisinde analiz yapmaya imkan vermektedir ve İnsan Kompleman Faktör H Bağlantılı Protein adı verilen bir proteinin deteksiyonuna dayanmaktadır (3, 139). İmmün sistemin tehdit olarak gördüğü bir hücre karşısında İnsan Kompleman Faktör H Proteinini, kompleman C3b ile interaksiyona geçerek membran atak kompleksi

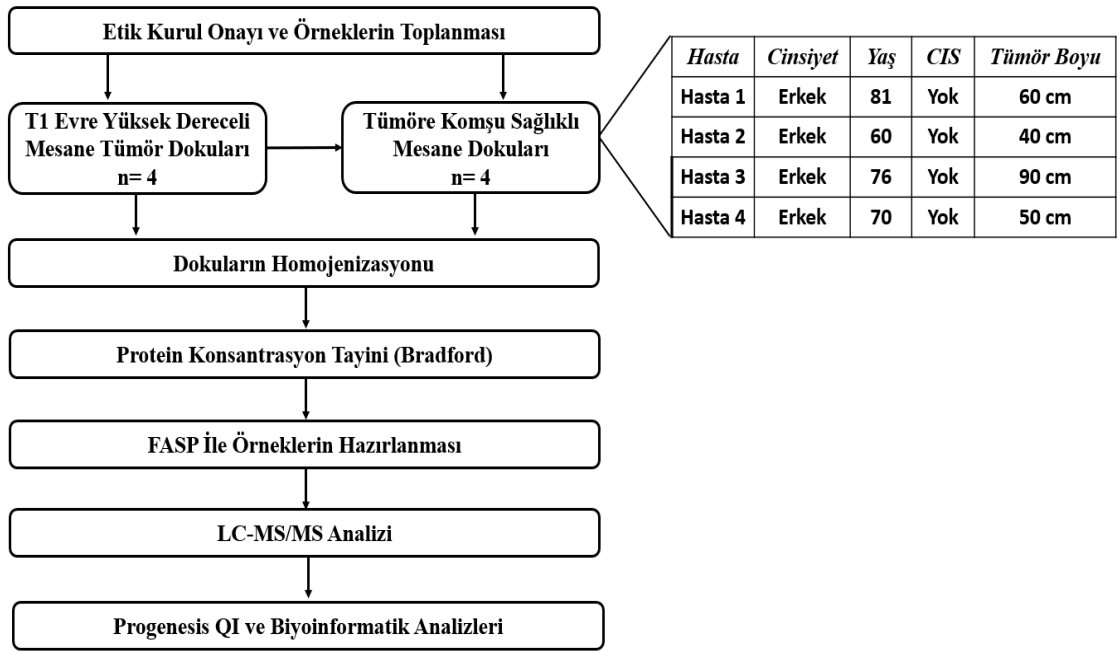
adı verilen bir kompleks oluşturmakta, bu ise tehdit olarak görülen hücrenin membranında porlar açarak hücrenin ölümünü sağlamaktadır. Tehdit olarak görülen hücrenin eksprese edeceği İnsan Kompleman Faktör H Bağlantılı Protein ise hücrenin bu kompleks tarafından verilecek hasardan korunmasını sağlamaktadır. Mesane tümörü hücreleri de bu stratejiden faydalanarak İnsan Kompleman Faktör H Bağlantılı Proteini arttırmakta ve immün sistemin bu yıkıcı etkisinden korunmaktadır (139).

Yapılan çalışmalarda, üriner İnsan Kompleman Faktör H Bağlantılı Protein düzeyinin mesane kanseri tanısında bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği düşünüldüğünden bu proteine spesifik kitler geliştirilmiştir. Testin sensitivitesi %29-83 aralığındadır. İleri dereceli tümörlerde başarılı sonuçlar ortaya koymasına karşın düşük dereceli tümörlerde yüksek performans gösterememektedir (141, 142). Sensitivitesi %53- 91 olan BTA- TRACK testi, BTA-Stat testi ile çok benzer olarak İnsan Kompleman Faktör H Proteini ve İnsan Kompleman Faktör H Bağlantılı Protein düzeyinin ELISA bazlı kantitasyonuna dayanmaktadır (3, 139). BTA-TRACK testinde, BTA-Stat'dan farklı olarak idrar örneklerinin bir haftaya varan sürelerde +4 derecede bekletilmesi ve sonra analiz edilmesi gerekmektedir (139). Daha geç sonuç alınmasına karşın sensitivitesinin yüksek olması yönünden avantajlıdır (139, 143). Belirtilen tüm bu biyobelirteçler, tek başlarına mesane kanseri tanısı ve evrelemede kullanılmamasına karşın, klinikte tanıya yardımcı testler olmaları yönünden faydalı olabilmektedirler.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Dizayını

Bu tez dahilinde yapılması planlanan deneysel çalışmalar İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi (GEAH) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (2013-KAEK-64) tarafından 10.10.2018 tarihinde incelenmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur (Karar No: 2018/0367) (Ek 1). Çalışma için gerekli olan T1 evre yüksek dereceli mesane tümör ve sağlıklı dokuları yine GEAH üroloji servisinde tedavi görmekte olan gönüllü erkek hastalardan onamları alınarak toplanmıştır. TUR operasyonu sırasında hastalardan çıkarılan doku örneklerinden bir kısmı patolojik inceleme için hastanenin patoloji laboratuvarına gönderilmiş, kalanı ise çalışmaya ayrılmıştır. Operasyon esnasında çıkarılan doku örnekleri hızlıca soğuk PBS içerisinde yıkanarak kandan arındırılmıştır ve cryo vial tüplere alınarak sıvı nitrojen içerisinde şok dondurulmuştur. Daha sonra ise çalışmanın yapılacağı güne kadar -80 derecelik dondurucuda saklanmıştır. Çalışma planı ve hasta bilgileri Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Tez çalışmasında izlenen iş akışı ve hasta bilgileri.

3.2. Gereçler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihaz ve aletler Tablo 6’da kimyasal malzemeler ve kitler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihaz ve aletler ile marka ve modelleri.

Cihaz/Alet	Marka/Model
LC-MS/MS Kütle Spektrometresi	Waters Corporation, Xevo G2-XS QTOF
UPLC Kolon	Waters Corporation, ACQUITY HSS T3
Mikroplate Spektrofotometre	BioTek PowerWave HT
-80 Derece Dondurucu	Haier Biomedical DW- 86L729
Soğutmalı Santrifüj	Hettich MIKRO 220R
Homojenizatör	Retsch MM 400
Sonikatör	Hielscher UP200St
Thermoshaker	Grant-Bio PCMT-HC24N
Ultrasonik Banyo	VWR USC-TH
Mini Santrifüj- Vorteks	Biosan FVL-2400N-Combismin
Hassas Terazı	Kern ABJ
Çeşitli Hacimlerde Mikropipetler	Thermo Scientific
+4 Derece Soğutucu	Arçelik
Çeşitli Mikropipet Uçları	Isolab
Cryo Vial Tüpler	Isolab
LoBind Mikrosantrifüj Tüpleri	Eppendorf
Mikrosantrifüj Tüpleri	Isolab
96 Kuyucuklu Mikroplate	Isolab
15 mL ve 50 mL Konik Tüpler	Isolab
Çelik Homojenizasyon Boncukları	Isolab
Çeşitli Cam Malzemeler	Isolab

Tablo 7. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler ile marka ve katalog numaraları.

Kimyasal Malzeme/Kitler	Marka/Katalog Numarası
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablet	Sigma-Aldrich, P4417
UPX Universal Protein Extraction Kit	EXPEDEON, 44101
FASP Protein Digestion Kit	EXPEDEON, 44250
Pierce Tripsin Proteazı, LC-MS Grade	Thermo Fisher, 90057
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Thermo Fisher, 87785
BSA Protein Standart	BioRad, 5000007
Rapid Gold BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher, A53226
Acetonitrile LC-MS Grade	Merck, 100029
Su LC-MS Grade	Merck, 115333

3.3. Yöntemler

3.3.1. Dokuların homojenizasyonu ve protein ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılacak tümör ve sağlıklı mesane dokularının homojenizasyonu için UPX Universal Protein Extraction Kit (Expedeon) kullanılmış ve üretici firmanın tavsiye ettiği protokol izlenmiştir. Bu doğrultuda;

1. Daha önce PBS ile yıkanarak kan ve kontaminantlardan arındırılan çalışma dokuları -80 derecelik dondurucudan çıkarılarak hızlıca tartılıp LoBind mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde 1:10'luk doku/UPX oranı için eklenmesi gereken UPX solüsyonu miktarları hesaplanmıştır.
2. 1 mL UPX solüsyonu için 10 µl olacak şekilde Proteaz İnhibitör Kokteyli (Thermo Fisher) eklenmiş UPX tamponu, örneklerin üzerine hesaplanan hacimlerde dağıtılmış ve daha sonra tüplere 2 mm boyutunda steril metal

boncuklardan 5- 6 adet atılmıştır. Tüpler Retsch MM 400 homojenizatöre yerleştirilerek 30 mHZ'de 1'er dakikalık 10 döngü olacak şekilde homojenizasyona bırakılmıştır. Her döngü arasında örneklerin bulunduğu mikrosantrifüj tüpleri 1 dakika buzda bekletilmiştir.

3. Retsch MM 400 ile homojenizasyonun ardından, homojenizasyon başarısını arttırmak için örnekler Hielscher UP200St sonikatöre alınarak 10 döngü olacak şekilde 5 saniye sonikasyona bırakılmıştır. Her döngü arasında örneklerin bulunduğu mikrosantrifüj tüpleri 20 saniye buzda bekletilmiştir.
4. Sonraki aşamada örnekler 96 dereceye ayarlanmış Thermoshaker'a alınarak (Grant-Bio PCMT-HC24N) UPX protokolünde belirtildiği şekilde 5 dakika kaynamaya bırakılmıştır.
5. Daha sonra örneklerin bir süre oda sıcaklığına gelmesi sağlanmış ve +4 dereceye alınarak 1 saat bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra ise mikrosantrifüj tüpleri +4 dereceye ayarlanmış soğutmalı santrifüje alınarak 15.000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar yeni LoBind tüplere aktarılarak Bradford analizi için hazırlanmıştır.

3.3.2. Bradford metodu ile protein konsantrasyon tayini

FASP metodu ile örnek hazırlığına başlanmadan önce, doku örneklerinden ekstrakte edilen proteinlerin konsantrasyonlarının yeterli olup olmadığının anlaşılması için Bradford metodu ile protein konsantrasyon tayini yapılmıştır. Bu işlem için Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) kullanılmış ve üretici firmanın tavsiye ettiği protokol izlenmiştir. Analiz için 96 kuyucuklu mikrolaka kullanılmış ve 5 adet Bovine Serum Albumin (BSA) standardı hazırlanmıştır. Standartlardan ve ölçüm yapılacak örneklerden 10 µl alınarak 3'er tekrarlı olacak şekilde kuyulara dağıtılmış ve üzerlerine 190 µl boya solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra mikrolaka 15 dakika karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında BioTek PowerWave HT mikrolaka okuyucu spektrofotometreye yerleştirilerek 595

nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucunda, standartlara ait absorbans değerleri ve bilinen protein konsantrasyonları kullanılarak standart grafiği çizilmiş ve eğri denklemi hesaplanmıştır. Daha sonra ise örnekler için absorbans değerleri kullanılarak eğri denkleminde örnekler için protein konsantrasyonları hesaplanmıştır (Tablo 10).

3.3.3. FASP metodu ile örneklerin hazırlanması

LC-MS/MS analizi için örnekler FASP Protein Digestion Kit (Expedeon) ile hazırlanmış ve üretici firmanın tavsiye ettiği protokol ile Mann ve arkadaşlarının yayınladığı protokoller baz alınarak çalışılmıştır (172). Bu doğrultuda;

1. Çalışmaya üre solüsyonu hazırlanarak başlanmıştır. Kit içerisinde bulunan 1 mL'lik Tris Hidroklorit, ürenin bulunduğu tüpe aktararak solüsyon homojen oluncaya kadar vortekslenmiştir. Hazırlanan üre solüsyonundan 100 µl alınarak İodoasetamid'in bulunduğu tüpe aktararak vortekslenmiştir. Sonraki aşamada 4 µg Tripsin (Thermo Fisher), 75 µl 50 mM Amonyum Bikarbonat solüsyonu içerisinde çözülerek tripsinizasyon için gerekli proteaz karışımı hazırlanmıştır.
2. Tümör (n= 4) ve sağlıklı mesane dokularından (n= 4) ekstrakte edilen protein örneklerinin her birinden 30 µl alınarak 200 µl üre solüsyonu ile karıştırılıp filtreleri içeren tüplere dağıtılmış ve tüpler 14.000 g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra filtrelerin üzerine tekrar 200 µl üre solüsyonu aktararak santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.
3. Tüplerin altında toplanan sıvılar atıldıktan sonra filtrelerin üzerine 10X İodoasetamid solüsyonu ve 90 µl üre solüsyonu eklenerek tüpler hafifçe vortekslenmiş ve sonrasında karanlık bir ortamda 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tüpler 14.000 g'de 15 dakika

santrifüjlenmiştir. Daha sonra tüplere 100 µl üre solüsyonu aktararak tekrar 14.000 g'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

4. Tüplerin altında toplanan sıvılar atıldıktan sonra tüplere 100 µl 50 mM Amonyum Bikarbonat eklenerek 14.000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve bu basamak bir kez daha tekrarlanmıştır. Daha sonra ise tüplere 75 µl Tripsin eklenerek kısaca vortekslenmiş ve tüpler parafilm ile sarılarak 37 derecede bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
5. İnkübasyonu takip eden günde tüplerin içerisindeki filtreler çıkarılarak yeni LoBind tüplere alınmış, üzerlerine 40 µl 50 mM Amonyum Bikarbonat eklenerek 14.000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.
6. Daha sonraki aşamada tüplere 50 µl 0.5 mM Sodyum Klorit solüsyonu eklenmiş ve tüpler 14.000 g'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen filtrat istenen peptid karışımını içermektedir. Örneklere ait tüpler etiketlenilip ağızları parafilmlelenerek LC-MS/MS analizinin yapılacağı güne kadar -80 derecelik dondurucuya kaldırılmıştır.

3.3.4. LC-MS/MS ile örneklerin analizi

FASP metodu ile hazırlanmış örnekler, son konsantrasyonları 200 ng/µL olacak şekilde %0.1 formik asit ile seyreltilerek cihaza uygun vial tüplere aktarılmıştır. Analiz için Xevo G2-XS Q TOF (Waters) cihazı kullanılmış ve analizden önce cihaza özgü olan MassLynx programı (V4.1-Waters) kullanılarak kalibrasyon ve dedektör ayarları yapılmıştır. Metod SONAR, pozitif iyon ve sensitivite moduna getirilerek oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 (Waters) kolonunda asetonyril gradienti ile fraksiyonlanmıştır. Asetonyril %5- 35 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlanmış ve elektrospray iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edilmiştir. Analiz esnasında, m/z 50- 1950 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplanmıştır. 0,7 sn kadar MS analizi gerçekleştirilmiş ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplanmıştır. Ardından 0,7 sn

kadar MS/MS analizi yapılarak peptidler parçalanıp sekans bilgisi elde edilmiştir. Cihazın tüm analiz prosesi 132 dakika olmakla birlikte analizin 15 ile 110 dakikalık güvenilir aralığı değerlendirmeye alınmıştır.

3.3.5. Progenesis QI ve biyoinformatik analizler

LC-MS/MS analizi sonrasında cihazdan elde edilen ham veriler Progenesis QI yazılımı (Waters) ile analiz edilmiştir. Protein tanımlamaları ise UniProt veri bankasındaki insana ait protein sekans bilgisi ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Protein tanımlamaları, her bir protein için en az 2 ya da 3 peptid ile eşleştirme yapılacak şekilde ayarlanmış ve istatistiksel analiz ANOVA ile 0.05 anlamlılık düzeyinde yapılmıştır. Maximum fold change 1,5 olarak seçilmiştir. Alfa hatasının düzeltilmesi için yanlış bulgu oranı skoru (False Discovery Rate, FDR) 4 seçilmiştir. Sonrasında tanımlanan proteinler ile biyoinformatik analizler yapılmıştır. Tümör ve sağlıklı doku örnekleri arasındaki protein farklılıklarını doğrulamak için Perseus yazılımı kullanılarak hiyerarşik kümeleme analizi ve temel bileşenler analizi uygulanmıştır. Proteinlerin moleküler ve biyolojik fonksiyonlarını analiz etmek için PANTHER programı kullanılmıştır. Tanımlanan proteinler ayrıca bilinen ve öngörülen protein etkileşimlerini saptamak için STRING programı ile analiz edilmiş ve elde edilen etkileşim ağında kümelenen proteinler, Cytoscape programı kullanılarak elde edilen etkileşim ağları ile karşılaştırılmıştır. Tanımlanan proteinlerden tümör dokusunda artış ve azalış gösterenler ayrı ayrı Signor veri tabanında analiz edilerek yolak haritaları oluşturulmuştur. Hg-pT1 tümörler için prognostik önemi olduğu düşünülen proteinler için GraphPad Prism 6 programı kullanılarak miktar değişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Örneklerin Protein Konsantrasyonları

Gereç ve yöntem kısmında belirtildiği şekilde yapılmış olan Bradford Metodu ile protein konsantrasyon tayini sonucunda, üç tekrarlı olarak hazırlanan farklı konsantrasyonlarda BSA standartları ve blank olarak kullanılan boş boya solüsyonuna ait spektrofotometrik absorbans değerleri ile bunların ortalaması Tablo 8’de ifade edildiği gibidir. BSA standartlarının konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak çizilen grafikte eğri denklemi ve R^2 değeri Tablo 10’daki gösterildiği gibi hesaplanmıştır. Elde edilen eğri denkleminde, örneklerin absorbans değerleri kullanılarak bilinmeyen protein konsantrasyonları Tablo 9’daki gibi bulunmuştur.

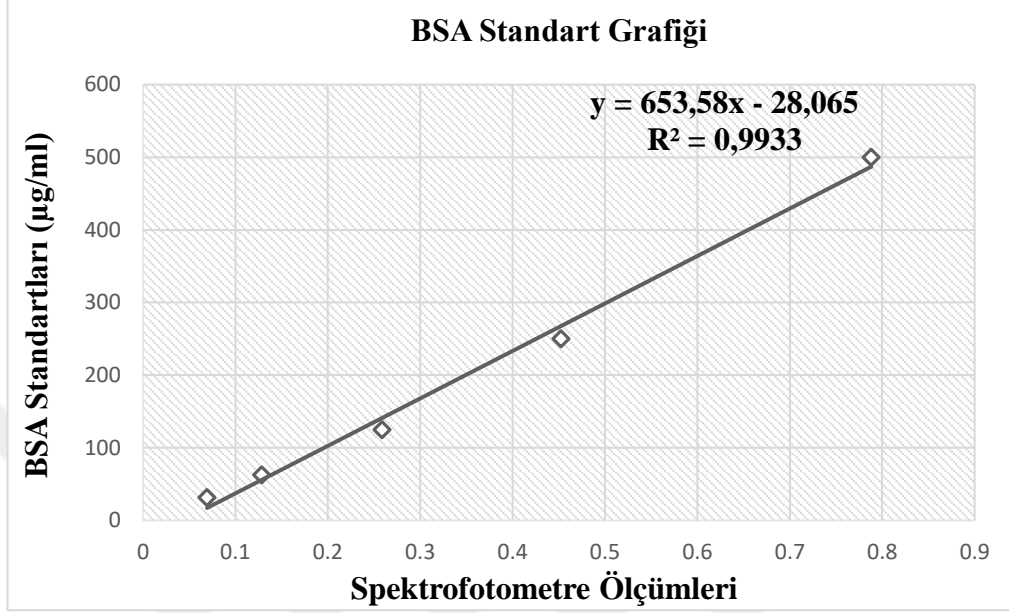
Tablo 8. BSA standartlarının konsantrasyonları ile boya solüsyonu ve BSA standartlarına ait absorbans değerleri.

	Bovine Serum Albumin Standartları					
	Blank	31,3 µg/ml	62,5 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml
Spektrofotometre Değerleri	0,291	0,371	0,421	0,547	0,756	1,093
	0,305	0,369	0,445	0,570	0,735	1,093
	0,304	0,368	0,420	0,559	0,766	1,078
Ortalama (±SD)	0,300 (0,008)	0,369 (0,002)	0,429 (0,014)	0,559 (0,012)	0,752 (0,016)	1,088 (0,009)

Tablo 9. Örneklere ait protein konsantrasyonları.

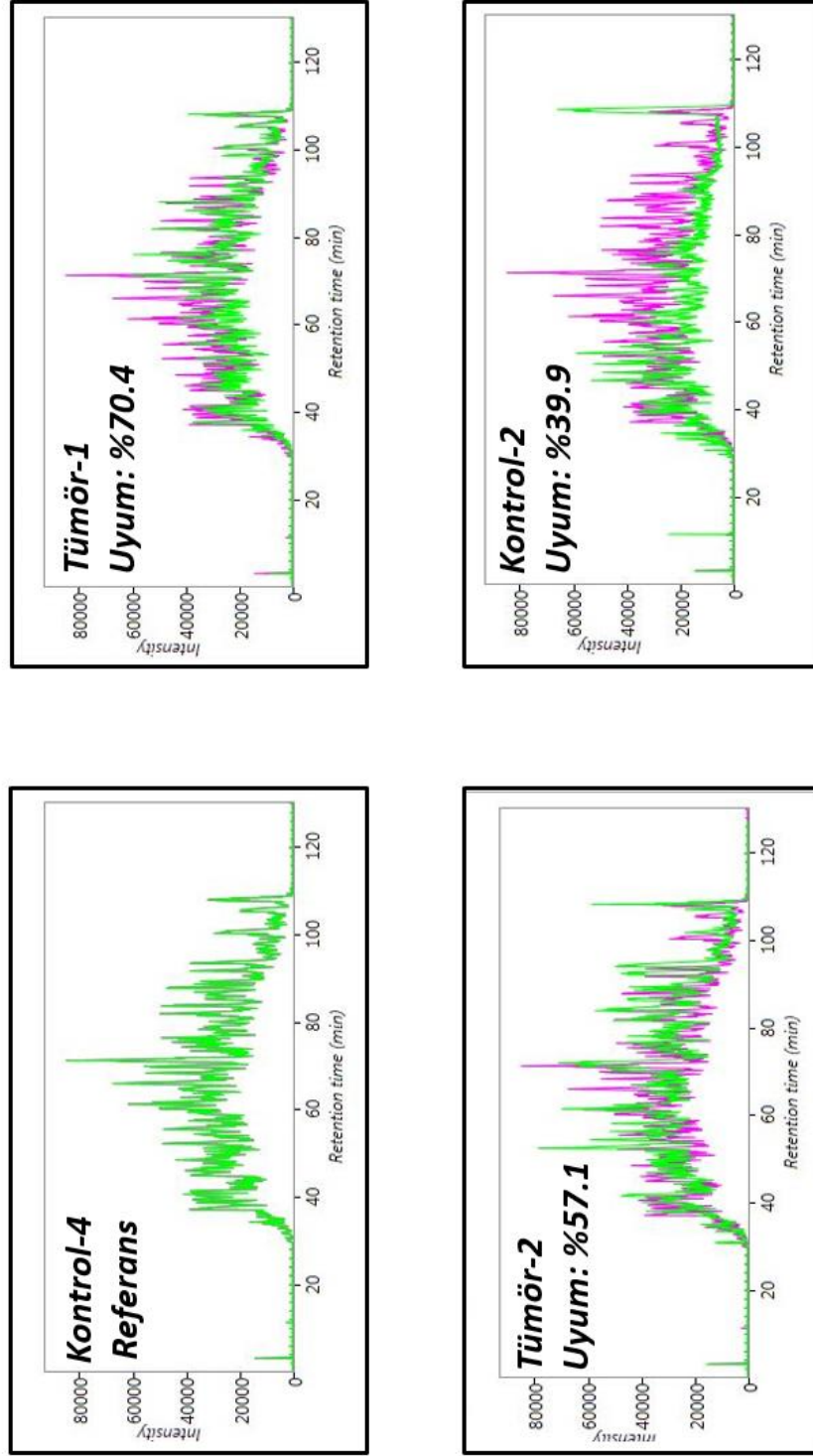
Örnekler	Ortalama Protein Konsantrasyonları (µg/ml) (1/100 Dilüsyon)
Tümör 1	44,9
Kontrol 1	35,7
Tümör 2	119,1
Kontrol 2	5,8
Tümör 3	77,1
Kontrol 3	22,9
Tümör 4	19,6
Kontrol 4	69,5

Tablo 10. BSA standartlarının konsantrasyonlarına karşı absorbanans değerleri kullanılarak çizilen grafik ile hesaplanan eğri denklemi ve R^2 değeri.



4.2. LC-MS/MS İle Proteinlerin Tanımlanması

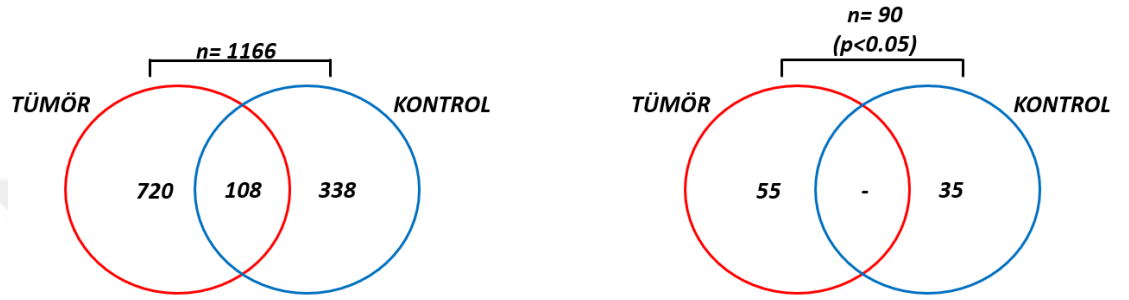
LC-MS/MS analizi sonucunda, 8 adet mesane dokusundan (n= 4 T1 evre yüksek dereceli mesane tümörü, n= 4 tümöre komşu sağlıklı mesane dokusu) herhangi bir filtreleme ve istatistiksel test olmaksızın toplamda 1166 protein tanımlaması yapılmıştır. Analiz edilen örneklerin her biri için Progenesis QI sisteminde total iyon kromatogramları incelenmiştir. Kromatogram için Progenesis QI sistemi en yüksek performanstaki 4 numaralı sağlıklı kontrol dokusuna ait örneği referans olarak seçmiş ve diğer örneklere ait kromatogramları bu referans ile karşılaştırmıştır. Kromatogramlar arasında sadece 2 numaralı sağlıklı kontrol dokusuna ait örneğin referans kromatograma göre uyumu %39.9'luk bir skor ile düşük bulunmuştur. İlgili örneğin çalışmadan çıkarılması durumunda, onun partneri olan ve referans kromatogramla karşılaştırıldığında uyum gösteren 2 numaralı tümör dokusuna ait örneğin de çalışmadan çıkarılması gerekeceğinden ve bu durumda tanımlanan proteinlerin çeşit ve sayısında önemli değişiklikler görüldüğünden kontrol 2 örneği çalışmadan çıkarılmamıştır.



Şekil 10. Analiz edilen örneklerden bazılarının kromatogram görüntüleri. Tüm örnekler Progenesis QI programı tarafından referans olarak seçilen kontrol 4 örneğinin kromatogramı ile karşılaştırılmış ve kontrol 2 örneğinin referans kromatograma göre uyumu %39.9'luk bir skor ile düşük bulunmuştur.

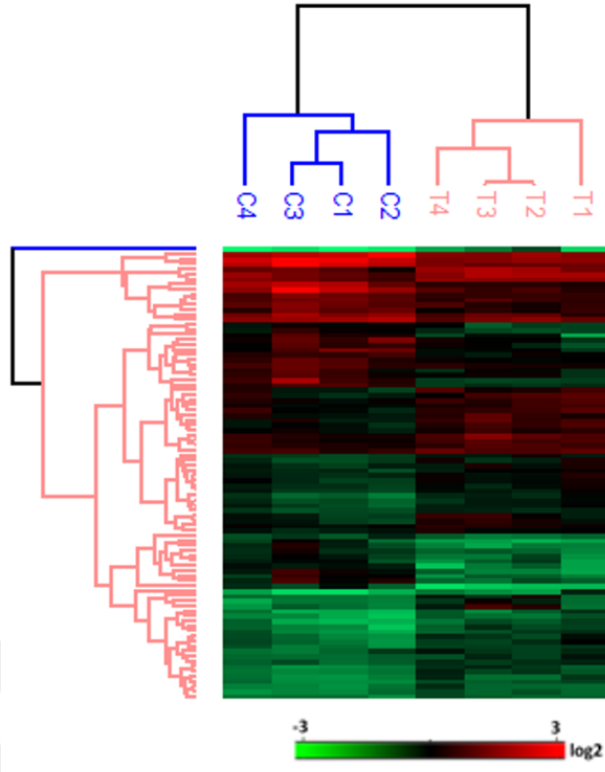
4.2.1. Tümör dokuları ve sağlıklı dokular arasındaki protein farklılıkları

LC-MS/MS analizi sonucunda tanımlanan 1166 proteinin tümü incelendiğinde, 720 proteinin sağlıklı dokulara kıyasla tümör dokularında artış gösterdiği, 338 tanesinin azalış gösterdiği ve 108 tanesinin ortak olduğu görülmüştür. Tanımlanan proteinlerin ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) olan 90 proteinin dağılımı Şekil 11’de ifade edilen Venn diyagramındaki gibidir.

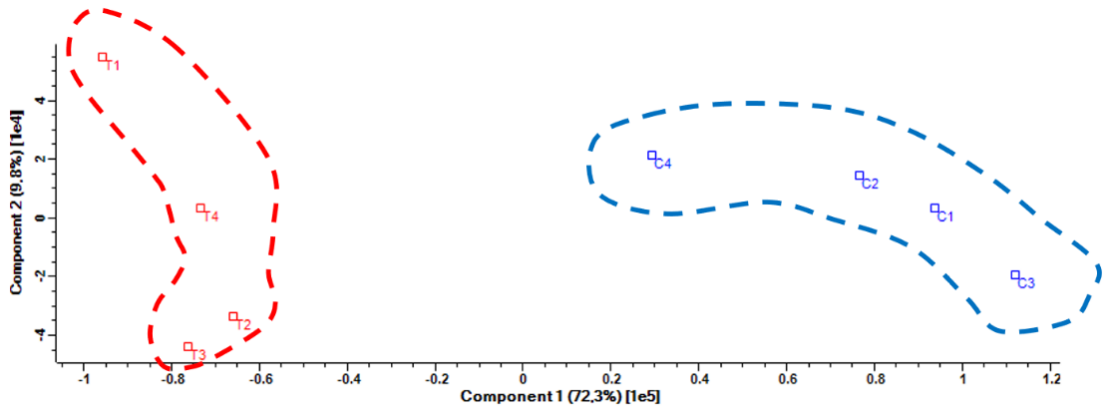


Şekil 11. Tümör ve sağlıklı dokularda tanımlanan tüm proteinlerin ($n=1166$) ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) olan 90 proteinin Venn diyagramı.

Tanımlanan 1166 protein, yöntem kısmında belirtilen şekilde Progenesis QI yazılımında ölçülen değerin geçerli sayılabilmesi bağlamında filtrelenmiş ve istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Analiz sonrasında istatistiksel olarak anlamlı olan ($p < 0.05$) proteinlerin sayısı 90 olarak bulunmuştur (Tablo 11). Bu 90 proteinden 55 tanesinin sağlıklı dokulara kıyasla tümör dokusunda artış gösterdiği, 35 tanesinin ise azalış gösterdiği görülmüştür. Sonraki aşamada tanımlanan bu 90 proteinin LFQ sinyal yoğunlukları alınmış ve Logaritma 2 tabanına göre transforme edilmiştir. Elde edilen yeni sinyal yoğunlukları kullanılarak Perseus yazılımı ile hiyerarşik kümeleme analizi (Şekil 12) ve temel bileşenler analizi (PCA) (Şekil 13) yapılmıştır. Bu analizler sonucunda proteinlerin ifadelerinin tümör dokuları ile sağlıklı kontrol dokuları arasında net olarak ayırım gösterdiği doğrulanmıştır.



Şekil 12. Tümör ve sağlıklı kontrol dokusu örneklerinde tanımlanan proteinlere ait hiyerarşik kümeleme analizi.



Şekil 13. Tümör ve sağlıklı kontrol dokusu örneklerinde tanımlanan proteinlere ait temel bileşenler analizi (PCA)

Tablo 11. LC-MS/MS analizi ile tanımlanmış ve tümör dokularında anlamlı düzeyde (p <0.05) artış ya da azalış gösteren proteinler.

Accession ID	UniProt İsmi	Protein İsmi	Gene Card İsmi	Değişim
P17931	LEG3	Galectin-3	LGALS3	Artış
Q00610	CLH1	Clathrin heavy chain 1	CLTC	Artış
P40939	ECHA	Trifunctional enzyme subunit alpha_ mitochondrial	HADHA	Artış
P14625	ENPL	Endoplasmin	HSP90B1	Artış
P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	LOC112694756	Artış
P51149	RAB7A	Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	Artış
P29692	EF1D	Elongation factor 1-delta	EEF1D	Artış
P60174	TPIS	Triosephosphate isomerase	TPI1	Artış
Q13838	DX39B	Spliceosome RNA helicase DDX39B	DX39B	Artış
P62241	RS8	40S ribosomal protein S8	RPS8	Artış
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2	PRDX2	Artış
P18124	RL7	60S ribosomal protein L7	RPL7	Artış
P04843	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1	Artış
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	Artış
Q7Z7A1	CNTRL	Centriolin	CNTRL	Artış
P62424	RL7A	60S ribosomal protein L7a	RPL7A	Artış
P10809	CH60	60 kDa heat shock protein_ mitochondrial	HSPD1	Artış
P26641	EF1G	Elongation factor 1-gamma	EEF1G	Artış
P14314	GLU2B	Glucosidase 2 subunit beta	PRKCSH	Artış
P12036	NFH	Neurofilament heavy polypeptide	NEFH	Artış
P06733	ENOA	Alpha-enolase	ENO1	Artış
P61978	HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	Artış
P52209	6PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase_ decarboxylating	PGD	Artış
P22314	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	Artış
P23526	SAHH	Adenosylhomocysteinase	AHCY	Artış
P02751	FINC	Fibronectin	FN1	Artış
P09651	ROA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	Artış
Q92841	DDX17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17	Artış
P13667	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4	Artış
P52597	HNRPF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRNPF	Artış
P61019	RAB2A	Ras-related protein Rab-2A	RAB2A	Artış
Q99714	HCD2	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	Artış
P38646	GRP75	Stress-70 protein_ mitochondrial	HSPA9	Artış

Tablo 11. LC-MS/MS analizi ile tanımlanmış ve tümör dokularında anlamlı düzeyde (p <0.05) artış ya da azalış gösteren proteinler (Devamı).

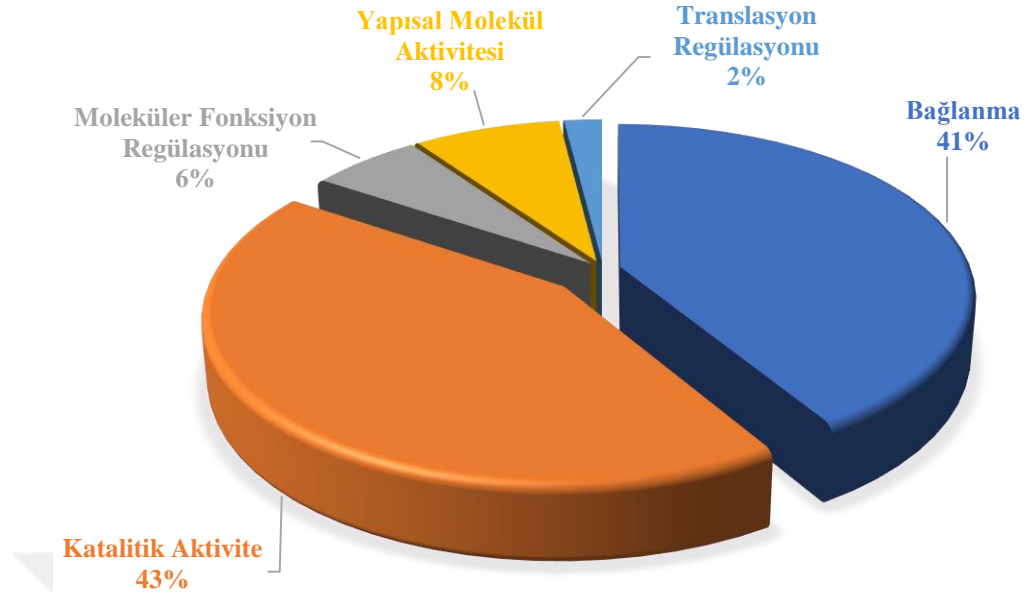
Accession ID	UniProt İsmi	Protein İsmi	Gene Card İsmi	Değişim
P23246	SFPQ	Splicing factor_ proline- and glutamine-rich	SFPQ	Artış
P07910	HNRPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	Artış
P17987	TCPA	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	Artış
P30044	PRDX5	Peroxiredoxin-5_mitochondrial	PRDX5	Artış
P30040	ERP29	Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29	Artış
Q7Z406	MYH14	Myosin-14	MYH14	Artış
P37108	SRP14	Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14	Artış
P08238	HS90B	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	Artış
P07237	PDIA1	Protein disulfide-isomerase	P4HB	Artış
P35221	CTNA1	Catenin alpha-1	CTNNA1	Artış
P62081	RS7	40S ribosomal protein S7	RPS7	Artış
P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	GSTP1	Artış
Q96KP4	CNDP2	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2	Artış
Q9UKM9	RALY	RNA-binding protein Raly	RALY	Artış
P51659	DHB4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	HSD17B4	Artış
P31949	S10AB	Protein S100-A11	S100A11	Artış
P50454	SERPH	Serpin H1	SERPINH1	Artış
P15428	PGDH	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]	HPGS	Artış
P12004	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Artış
P31947	1433S	14-3-3 protein sigma	SFN	Artış
P15559	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	NQO1	Artış
P52895	AK1C2	Aldo-keto reductase family 1 member C2	AKR1C2	Artış
P02787	TRFE	Serotransferrin	TF	Azalış
P12109	CO6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	CO6A1	Azalış
O15078	CE290	Centrosomal protein of 290 kDa	CEP290	Azalış
P04899	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	GNAI2	Azalış
Q9Y490	TLN1	Talin-1	TLN1	Azalış
P18206	VINC	Vinculin	VCL	Azalış
Q9P225	DYH2	Dynein heavy chain 2_ axonemal	DNAH2	Azalış
P08758	ANXA5	Annexin A5	ANXA5	Azalış
P12814	ACTN1	Alpha-actinin-1	ACTN1	Azalış
O75369	FLNB	Filamin-B	FLNB	Azalış
Q15063	POSTN	Periostin	POSTN	Azalış
P51884	LUM	Lumican	LUM	Azalış

Tablo 11. LC-MS/MS analizi ile tanımlanmış ve tümör dokularında anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) artış ya da azalış gösteren proteinler (Devamı).

Accession ID	UniProt İsmi	Protein İsmi	Gene Card İsmi	Değişim
Q6NZI2	CAVN1	Caveolae-associated protein 1	CAVIN1	Azalış
P60660	MYL6	Myosin light polypeptide 6	MYL6	Azalış
Q14315	FLNC	Filamin-C	FLNC	Azalış
P02452	CO1A1	Collagen alpha-1(I) chain	CO1A1	Azalış
P21333	FLNA	Filamin-A	FLNA	Azalış
P49454	CENPF	Centromere protein F	CENPF	Azalış
P35749	MYH11	Myosin-11	MYH11	Azalış
P02743	SAMP	Serum amyloid P-component	APCS	Azalış
Q05707	COEA1	Collagen alpha-1(XIV) chain	COL14A1	Azalış
P51888	PRELP	Prolargin	PRELP	Azalış
P09493	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	Azalış
Q03252	LMNB2	Lamin-B2	LMNB2	Azalış
P07585	PGS2	Decorin	DCN	Azalış
Q01995	TAGL	Transgelin	TAGLN	Azalış
Q15124	PGM5	Phosphoglucomutase-like protein 5	PGM5	Azalış
P24844	MYL9	Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9	Azalış
P20774	MIME	Mimecan	OGN	Azalış
P17661	DESM	Desmin	DES	Azalış
P51911	CNN1	Calponin-1	CNN1	Azalış
P0DOX5	IGG1	Immugoglobulin gamma-1 heavy chain	IGHG1	Azalış
Q05682	CALD1	Caldesmon	CALD1	Azalış
Q13439	GOCA4	Golgin subfamily A member 4	GOLGA4	Azalış
Q94964	SOGA1	Protein SOGA1	SOGA1	Azalış

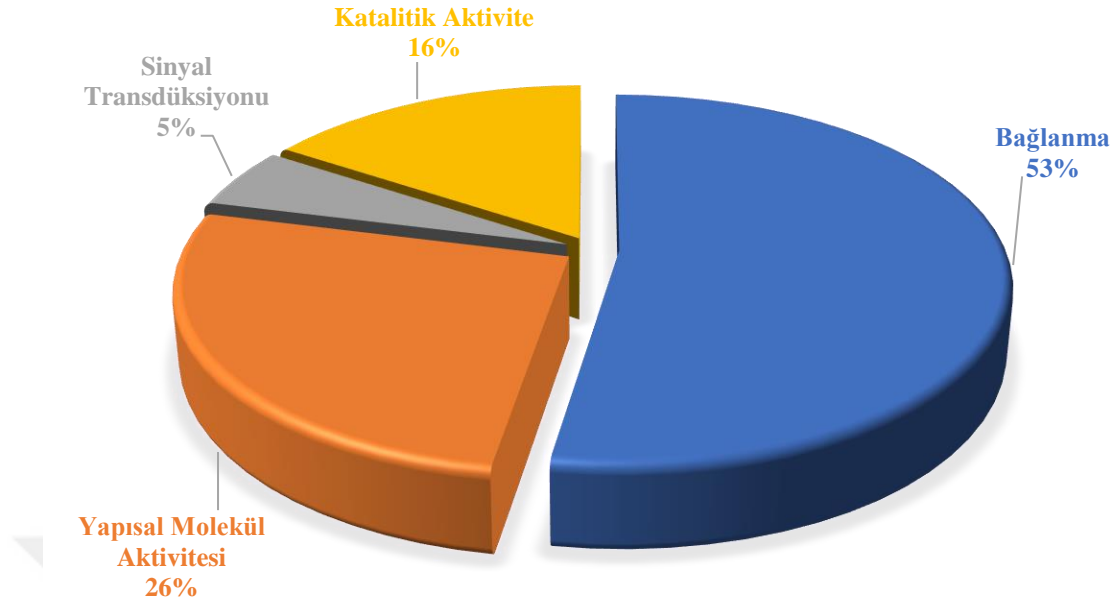
4.3. Tanımlanan Proteinlerin Moleküler Fonksiyon Analizi

Tümör dokularında anlamlı olarak değişen ($p < 0.05$) 90 protein ile PANTHER yazılımı kullanılarak moleküler fonksiyon analizi yapılmıştır. Tümör dokularında anlamlı derecede artan proteinler ($n= 55$) ile yapılan moleküler fonksiyon analizi Şekil 14’de, tümör dokularında anlamlı derecede azalan ($n= 35$) proteinler ile yapılan moleküler fonksiyon analizi Şekil 15’de ifade edilmiştir.



Şekil 14. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerin moleküler fonksiyon analizi.

Tümör dokularında anlamlı derecede artış gösteren 55 protein ile yapılan moleküler fonksiyon analizinde proteinlerden moleküler fonksiyonla eşleşenler 5 gruba ayrılmıştır. Proteinlerin %43'ü katalitik aktivite fonksiyonunda iken tüm proteinlerin %41'ini bağlanma (binding) proteinleri oluşturmaktadır. Bunlara ek olarak proteinlerin %6'sı moleküler fonksiyonların regülasyonunda, %8'i yapısal molekül aktivitesinde ve %2'si ise translasyonun regülasyonunda görevlidir ve proteinlerden bazıları birden fazla moleküler fonksiyonda görevli olabilmektedir.



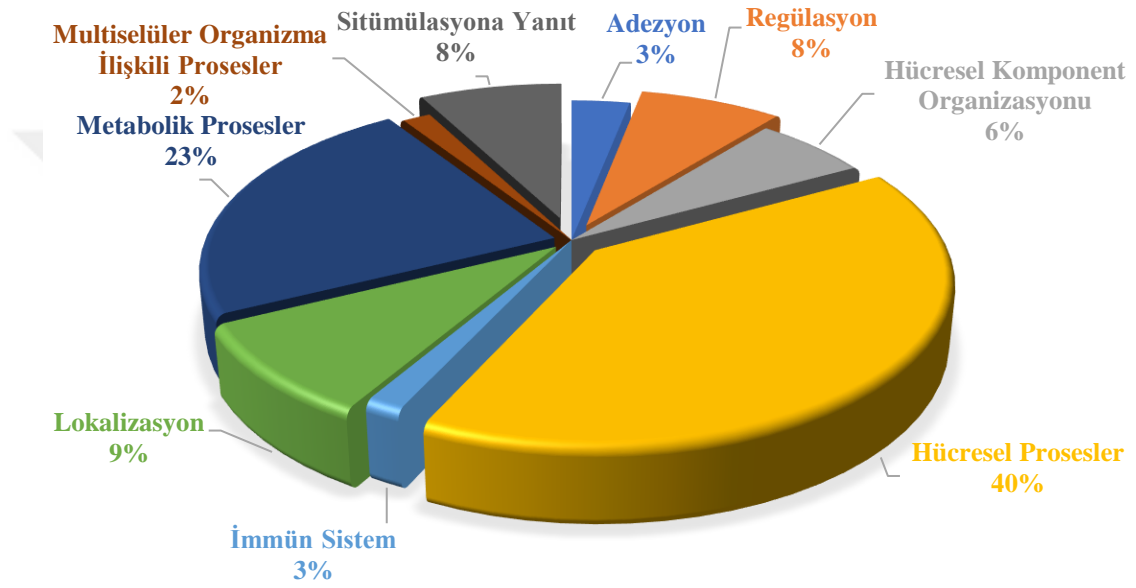
Şekil 15. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerin moleküler fonksiyon analizi.

Tümör dokularında anlamlı derecede azalış gösteren (sağlıklı mesane kontrol dokularında artış gösteren) 35 protein ile yapılan moleküler fonksiyon analizinde proteinlerden moleküler fonksiyonla eşleşenler 4 gruba ayrılmıştır. Proteinlerin %16'sı katalitik aktivite fonksiyonunda iken tüm proteinlerin %53'ünü bağlanma proteinleri oluşturmaktadır. Bunlara ek olarak proteinlerin %26'sı yapısal molekül aktivitesinde ve %5'i ise sinyal transdüksiyonunda görevlidir ve proteinlerden bazıları birden fazla moleküler fonksiyonda görevli olabilmektedir.

Tümör dokularında artış ve azalış gösteren proteinlerin moleküler fonksiyonu birbiriyle karşılaştırıldığında, tümör dokularında artış gösteren proteinlerde arasında, azalış gösteren proteinlerden farklı olarak moleküler fonksiyonların regülasyonunda görevli SERPINH1, PCNA ve PRKCAH proteinleri ile translayon regülasyonunda görevli EEF1D proteininin olduğu anlaşılmıştır. Bunun yanında, tümör dokularında azalış gösteren proteinler arasında, artış gösteren proteinlerden farklı olarak sinyal transdüksiyonunda görevli GNAI2 proteininin bulunduğu görülmüştür.

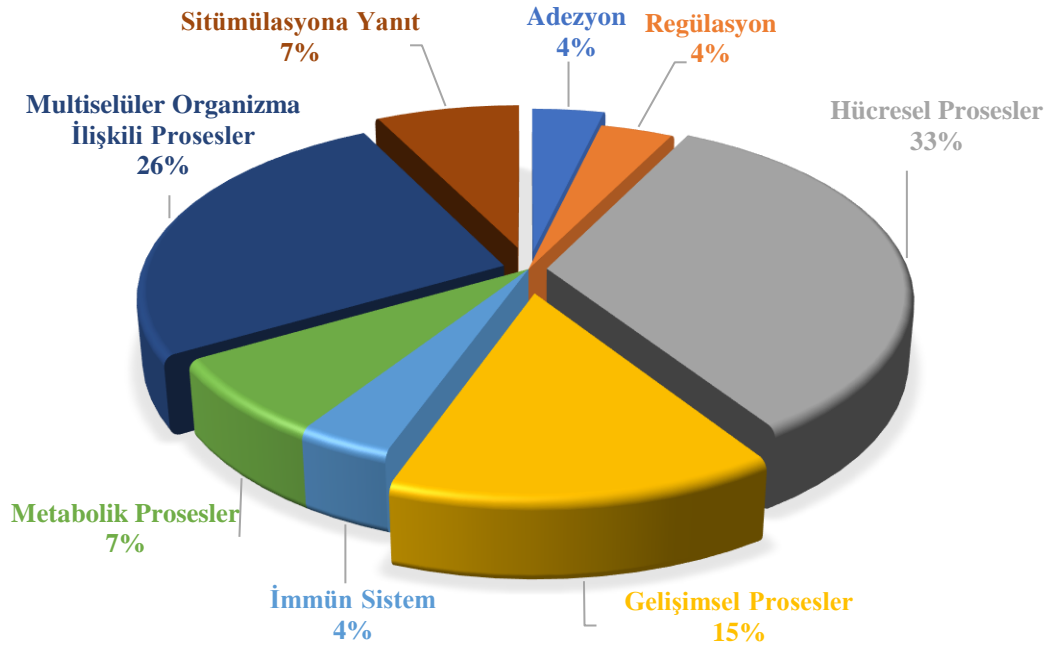
4.4. Tanımlanan Proteinlerin Biyolojik Proses Analizi

Tümör dokularında anlamlı olarak değişen ($p < 0.05$) 90 protein ile PANTHER yazılımı kullanılarak biyolojik proses analizi yapılmıştır. Tümör dokularında anlamlı derecede artan proteinler ($n = 55$) ile yapılan biyolojik proses analizi Şekil 16'da, tümör dokularında anlamlı derecede azalan ($n = 35$) proteinler ile yapılan biyolojik proses analizi Şekil 17'de ifade edilmiştir.



Şekil 16. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerin biyolojik proses analizi.

Tümör dokularında anlamlı derecede artış gösteren 55 protein ile yapılan biyolojik proses analizinde proteinlerden biyolojik proseslerle eşleşenler 9 gruba ayrılmıştır. Proteinlerin %40'ı hücresel proseslerde görevli iken %6'sı hücresel komponentlerin organizasyonunda, %8'i regülasyonda, %3'ü hücresel adezyonda, %8'i sitümlasyona yanıtta, %2'si multiselüler organizmayla ilişkili proseslerde, %23'ü metabolik proseslerde, %9'u hücresel lokalizasyonda ve %3'ü ise immün sistemle ilişkili proseslerde görev almaktadır.

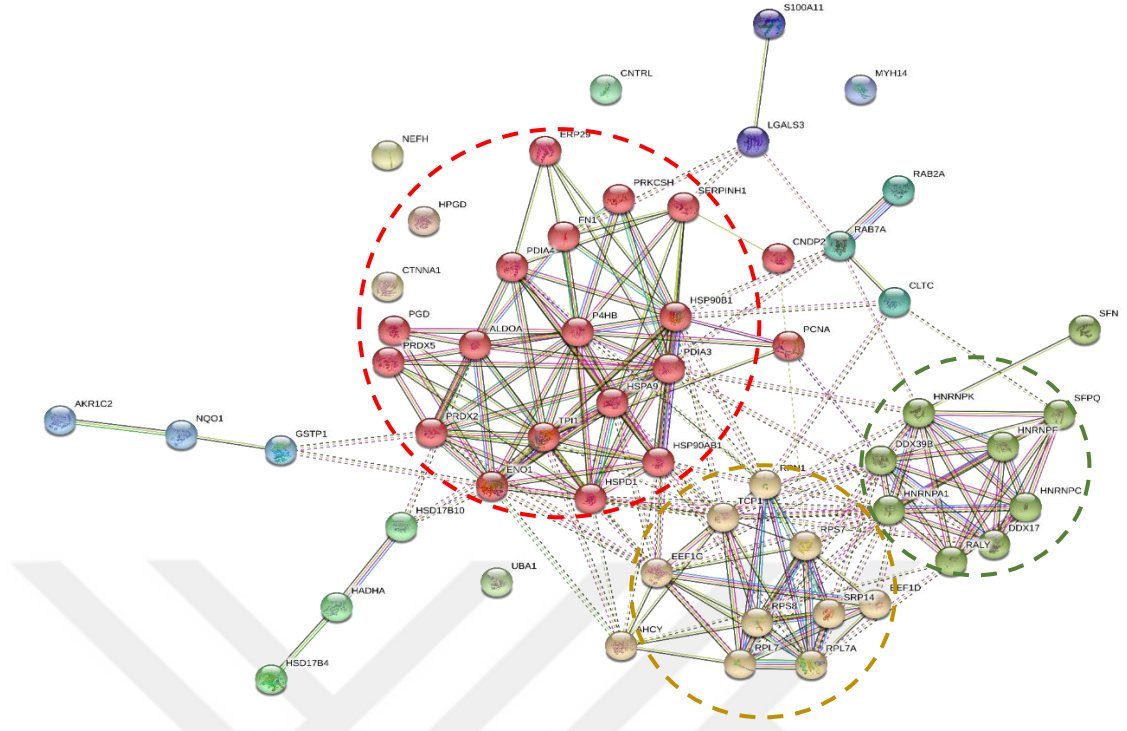


Şekil 17. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerin biyolojik proses analizi.

Tümör dokularında anlamlı derecede azalış gösteren (sağlıklı mesane kontrol dokularında artış gösteren) 35 protein ile yapılan biyolojik proses analizinde proteinlerden biyolojik proseslerle eşleşenler 8 gruba ayrılmıştır. Proteinlerin %33'ü hücresel proseslerde görevli iken %15'i gelişimsel proseslerde, %26'sı multiselüler organizma ilişkili proseslerde, %7'si metabolik proseslerde, %4'ü immün sistemle ilişkili proseslerde, %7'si sitümlasyona yanıtta, %4'ü hücresel adezyonda ve %4'ü hücresel regülasyonda görev almaktadır.

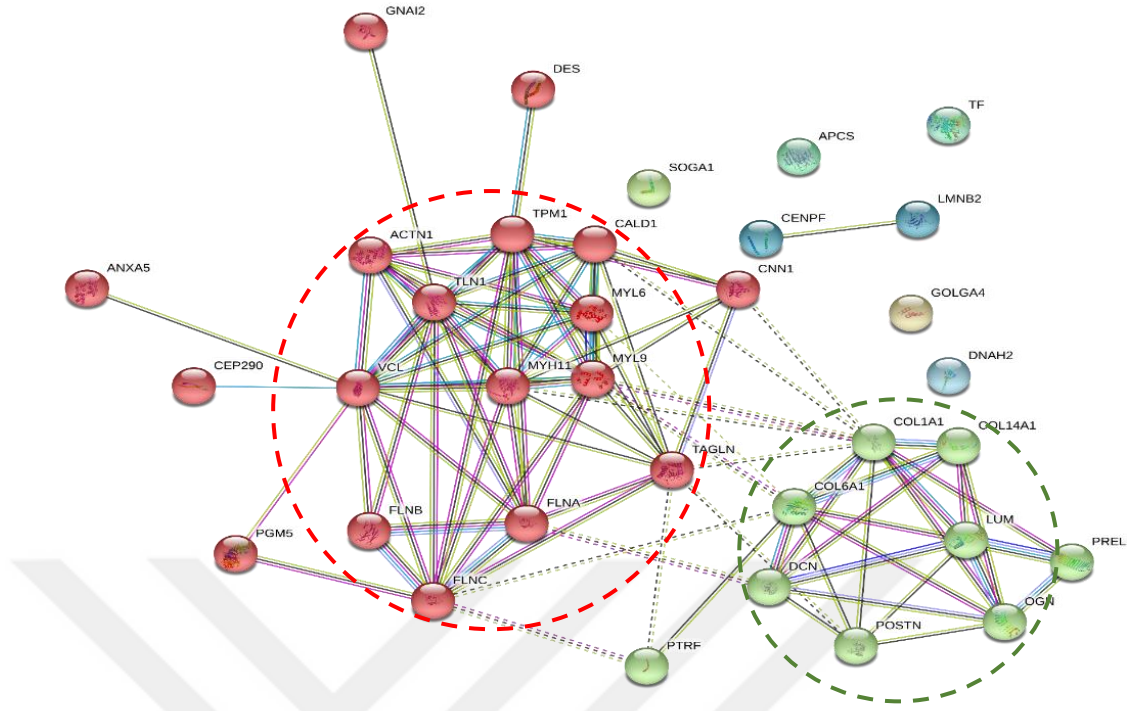
4.5. Tanımlanan Proteinlerin STRING Veri Tabanında Etkileşim Analizi

Tümör dokularında anlamlı olarak değişen ($p < 0.05$) 90 protein ile STRING veri tabanı kullanılarak protein- protein etkileşim analizi yapılmıştır. Tümör dokularında anlamlı derecede artan proteinler ($n = 55$) ile oluşturulan ağ haritası Şekil 18'de, tümör dokularında anlamlı derecede azalan proteinler ($n = 35$) ile oluşturulan ağ haritası Şekil 19'da gösterilmiştir.



Şekil 18. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerin STRING analizi.

Tümör dokularında anlamlı derecede artan proteinler (n= 55) ile oluşturulan protein etkileşim ağ haritasında (55 nodes, 206 edges, 7.49 average node degree) tanımlanan proteinlerin birbiriyle yüksek etkileşim içerisinde olduğu görülmüştür. Ağ haritasındaki proteinler STRING veri tabanının sınıflandırma (MCL Clustering) özelliği kullanılarak sınıflandırılmış ve 3 farklı küme grubu görülmüştür.

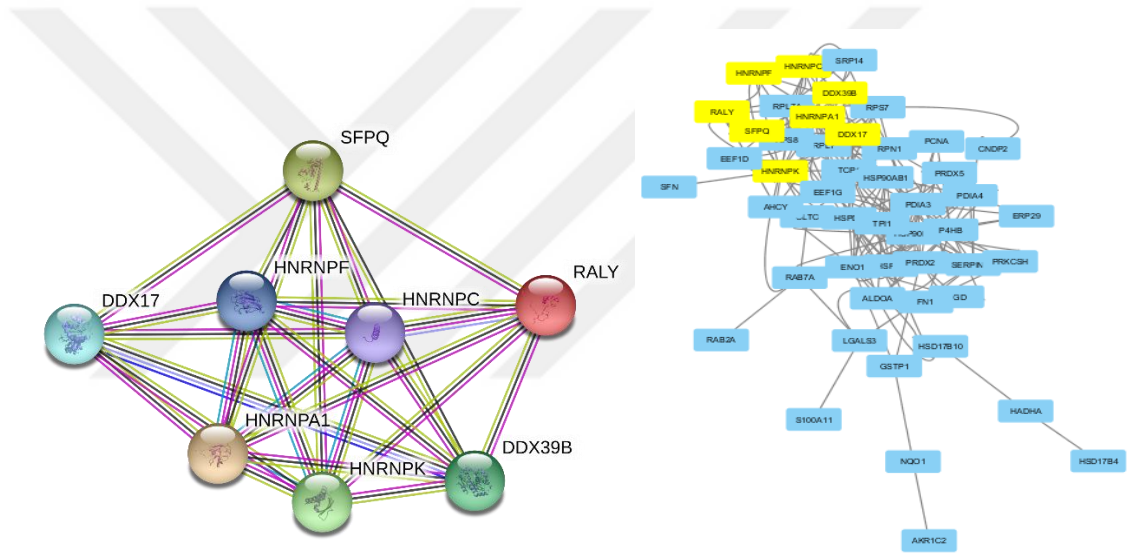


Şekil 19. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerin STRING analizi.

Tümör dokularında anlamlı derecede azalış gösteren (sağlıklı mesane kontrol dokularında artış gösteren) proteinler (n= 35) ile oluşturulan protein etkileşim ağ haritasında (34 nodes, 100 edges, 5.88 average node degree) tanımlanan proteinlerin birbiriyle yüksek etkileşim içerisinde olduğu görülmüştür. Ağ haritasındaki proteinler STRING veri tabanının sınıflandırma (MCL Clustering) özelliği kullanılarak sınıflandırılmış ve 2 farklı küme grubu görülmüştür.

Ağ haritalarında birbiriyle sıkı etkileşim gösteren proteinlerin oluşturduğu kümeler ayrı ayrı incelenmesi için STRING veri tabanında ilgili ağ haritaları oluşturulduktan sonra alınan TSV (Tab Seperated Values) dosyaları Cytoscape programı ile çalıştırılarak yeni ağ haritaları oluşturulmuş ve STRING ağ haritalarında kümelenen protein grupları Cytoscape'in "Neighbors of Selected Nodes" özelliği kullanılarak da gösterilmiştir.

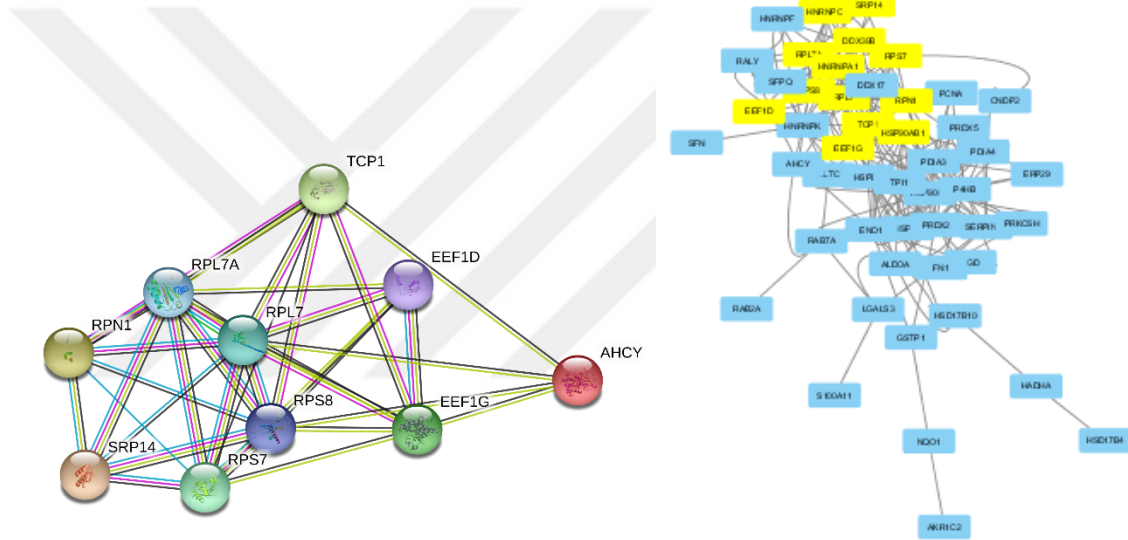
Tümör dokularında anlamlı derecede artan proteinler (n= 55) ile oluşturulan protein etkileşim ağ haritasında (Şekil 18) HNRNPA1, HNRNPC, HNRNPF, HNRNPK, DDX17, DDX39B, SFPQ ve RALY proteinlerinin birbirleriyle yüksek protein- protein etkileşiminde oldukları ve kümelendikleri görülmektedir. İlgili proteinlerin Cytoscape ağ haritasında da komşu nodelar olduğu ve yüksek bağlantılara (edge) sahip oldukları görülmüştür (Şekil 20). İlgili proteinler UniProt veri bankasında tarandığında hepsinin ortak olarak nükleusta lokalize olduğu ve heteronükleer RNA (hnRNA) metabolizması ve RNA splicing gibi RNA'ya ilişkin prosesler ile RNA matürasyonunda regülatör görev aldıkları görülmüştür.



Şekil 20. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerden hnRNA metabolizmasında görevli olanlara ait STRING ve Cytoscape ağ haritaları. İlgili proteinler node komşuluklarından dolayı Cytoscape ağ haritasında sarı renk ile işaretlenmiştir.

Tümör dokularında anlamlı derecede artan proteinler (n= 55) ile oluşturulan protein etkileşim ağ haritasında (Şekil 18) birbiriyle yüksek protein-protein etkileşiminde olan ve kümelendikleri görülen diğer bir protein grubu ise RPL7, RPL7A, RPS7, RPS8, RPN1, SRP14, EEF1D, EEF1G, TCP1 ve AHCY proteinlerinden oluşmaktadır. İlgili proteinlerin Cytoscape ağ haritasında da komşu nodelar olduğu ve yüksek bağlantılara (edge) sahip oldukları görülmüştür (Şekil 21). UniProt veri bankasında tarandığında RPL7, RPL7A, RPS7 ve RPS8'in RNA binding

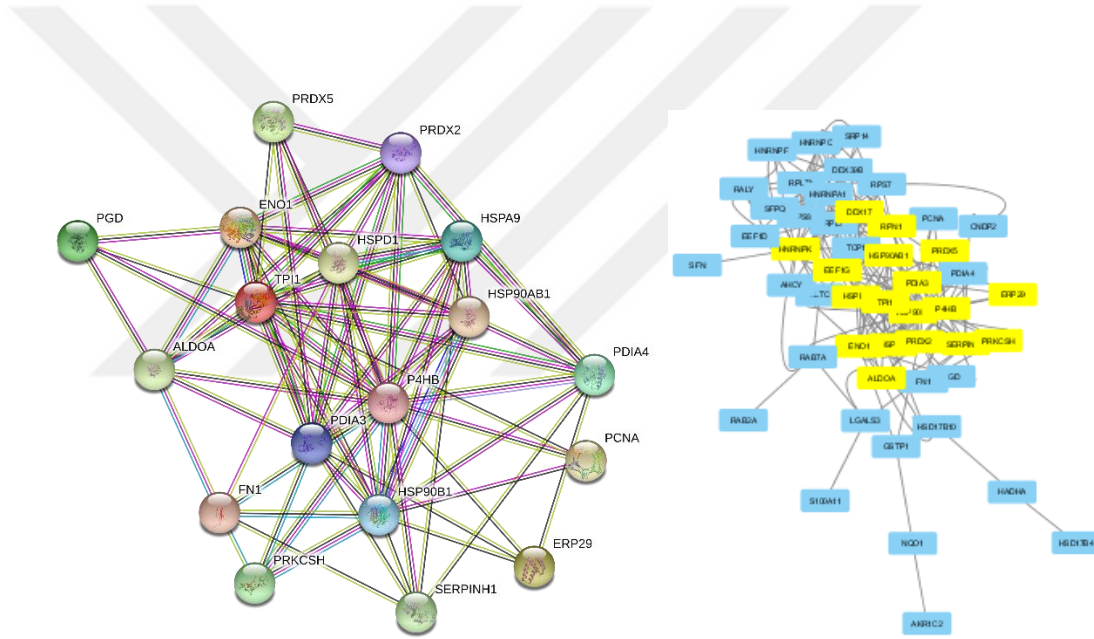
proteinlerinin translasyonda ve translasyonun başlatılmasında görevli ribozomal proteinler oldukları, RPN1'in protein glikolizasyonunda görevli olduğu ve SRP14'ün Endoplazmik Retikulumdan protein hedeflenmesinde görevli olduğu görülmektedir. Bunlara ek olarak DNA binding proteinler olan EEF1D ve EEF1G'nin translasyon elongasyon faktörü aktivitesinde oldukları, TCP1'in protein katlanması ile protein stabilizasyonunda görevli bir şaperon olduğu ve telomeraz aktivitesi için pozitif bir regülatör olduğu, AHCY'nin ise L-homosistein biyosentezinde görevli bir hidrolaz olduğu görülmektedir.



Şekil 21. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerden protein sentezinde ve translasyonel regülasyonda görevli olanlara ait STRING ve Cytoscape ağ haritaları. İlgili proteinler node komşuluklarından dolayı Cytoscape ağ haritasında sarı renk ile işaretlenmiştir.

Tümör dokularında anlamlı derecede artan proteinler (n= 55) ile oluşturulan protein etkileşim ağ haritasında (Şekil 18) birbiriyle yüksek protein-protein etkileşiminde olan ve kümelendikleri görülen son protein grubu ise HSPA9, HSPD1, HSP90AB1, PRDX2, PRDX5, PDIA3, PDIA4, P4HB, TPI1, PGD, ALDOA, ENO1, FN1, PRKCSH, SERPINH1, CNDP2, ERP29 ve PCNA proteinlerinden oluşmaktadır.

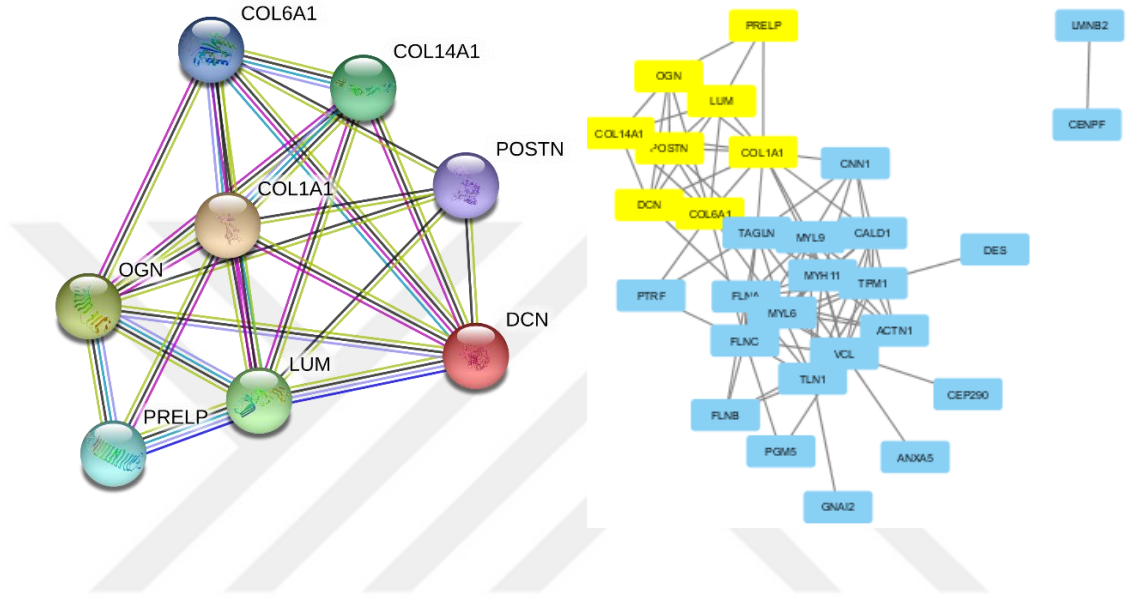
İlgili proteinlerin Cytoscape ağ haritasında da komşu nodelar olduğu ve yüksek bağlantılara (edge) sahip oldukları görülmüştür (Şekil 22). UniProt veri bankasında tarandığında HSPA9 ve HSPD1'in mitokondriyal strese, HSP90AB1, HSP90B1, PDIA3, PDIA4, P4HB, SERPINH1 ve özellikle ERP29'un ise Endoplazmik Retikulum stresinde görev aldıkları görülmüştür. Bunların haricinde PRDX2 ve PRDX5'in hidrojen peroksitin zararsızlaştırılmasında antioksidan olarak görev aldığı, PCNA'nın ise hidrojen peroksidin de arasında bulunduğu birçok faktörden kaynaklı DNA hasarının tamir mekanizmasında görev aldığı görülmektedir. Bunlara ek olarak TPI1, ENO1 ve ALDOA'nın glikolizde, PDG'nin ise pentoz fosfat yolağında görev yaptığı görülmektedir.



Şekil 22. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerden Endoplazmik Retikulum stresi, mitokondriyal stres ve glikolizde görevli olanlara ait STRING ve Cytoscape ağ haritaları. İlgili proteinler node komşuluklarından dolayı Cytoscape ağ haritasında sarı renk ile işaretlenmiştir.

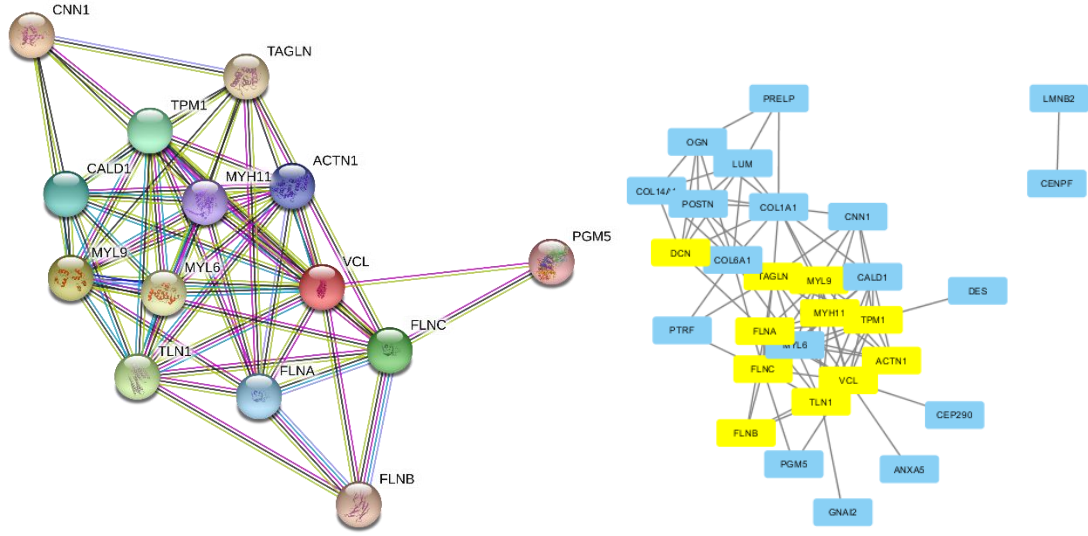
Tümör dokularında anlamlı derecede azalış gösteren (sağlıklı mesane kontrol dokularında artış gösteren) proteinler (n= 35) ile oluşturulan protein etkileşim ağ haritasında (Şekil 19) COL1A1, COL6A1, COL14A1, OGN, LUM, PRELP, POSTN ve DCN proteinlerinin birbirleriyle yüksek protein-protein etkileşiminde oldukları ve

kümelendikleri görülmektedir. İlgili proteinlerin Cytoscape ağ haritasında da komşu nodelar olduğu ve yüksek bağlantılara (edge) sahip oldukları görülmüştür (Şekil 23). UniProt veri bankasında tarandığında ilgili proteinlerin tümünün ortak olarak ekstra selüler matriks organizasyonunda ve hücresel adezyonda göre aldıkları görülmüştür.



Şekil 23. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerden ekstraselüler matriks organizasyonu ve hücresel adezyonda görevli olanlara ait STRING ve Cytoscape ağ haritaları. İlgili proteinler node komşuluklarından dolayı Cytoscape ağ haritasında sarı renk ile işaretlenmiştir.

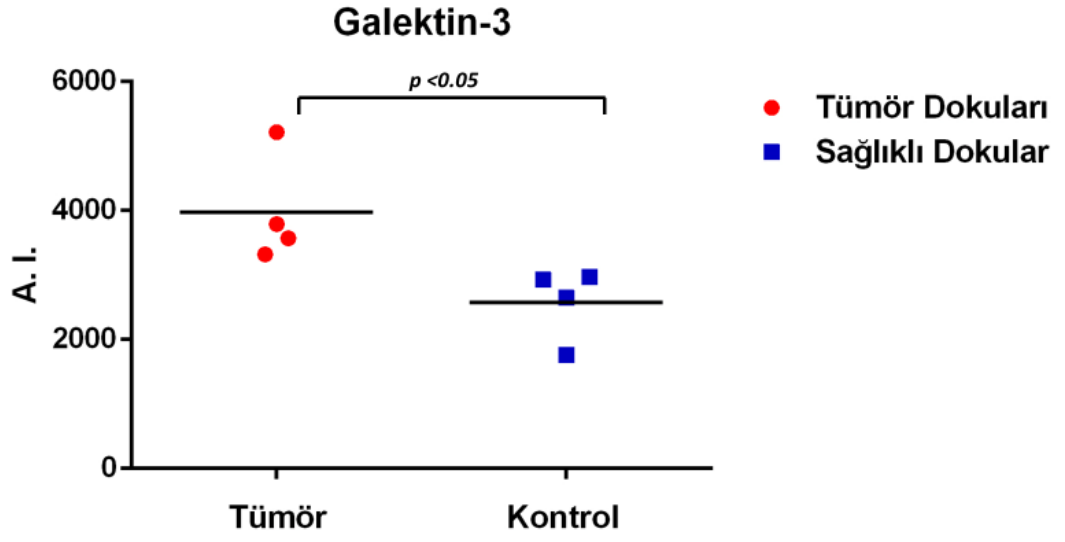
Tümör dokularında anlamlı derecede azalış gösteren (sağlıklı mesane kontrol dokularında artış gösteren) proteinler (n= 35) ile oluşturulan protein etkileşim ağ haritasında (Şekil 19) birbiriyle yüksek protein-protein etkileşiminde olan ve kümelendikleri görülen son protein grubu ise MYL6, MYL9, FLNA, FLNB, FLNC, MYH11, ACTN1, CALD1, TPM1, TAGLN, VCL, PGM5 ve CNN1 proteinlerinden oluşmaktadır. İlgili proteinlerin Cytoscape ağ haritasında da komşu nodelar olduğu ve yüksek bağlantılara (edge) sahip oldukları görülmüştür (Şekil 24). UniProt veri bankasında tarandığında ilgili proteinlerin tümünün ortak olarak kas dokusunun yapısal bileşeninde buldukları, kas kasılmasında görev aldıkları ve hücre iskelet yapısının regülasyonunda rol oynadıkları görülmüştür.



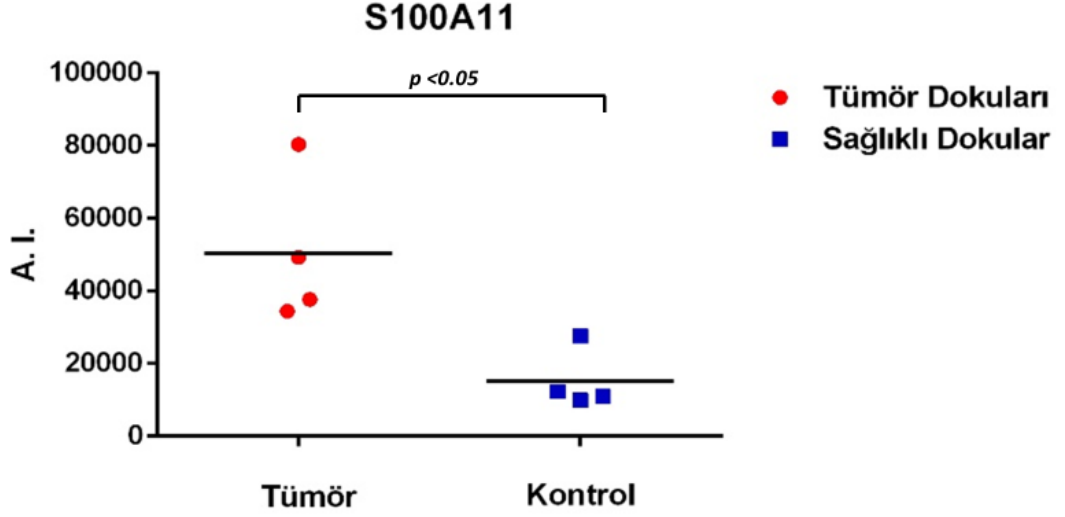
Şekil 24. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerden kas yapısı, kas kasılması ve hücre iskeletinin regülasyonunda görevli olanlara ait STRING ve Cytoscape ağ haritaları. İlgili proteinler node komşuluklarından dolayı Cytoscape ağ haritasında sarı renk ile işaretlenmiştir.

4.6. Galektin-3, S100A11, Fibronektin, HSP60, HSP70, HSP90AB1 ve HSP90B1 Proteinlerinin Dokulardaki Miktar Değişimi

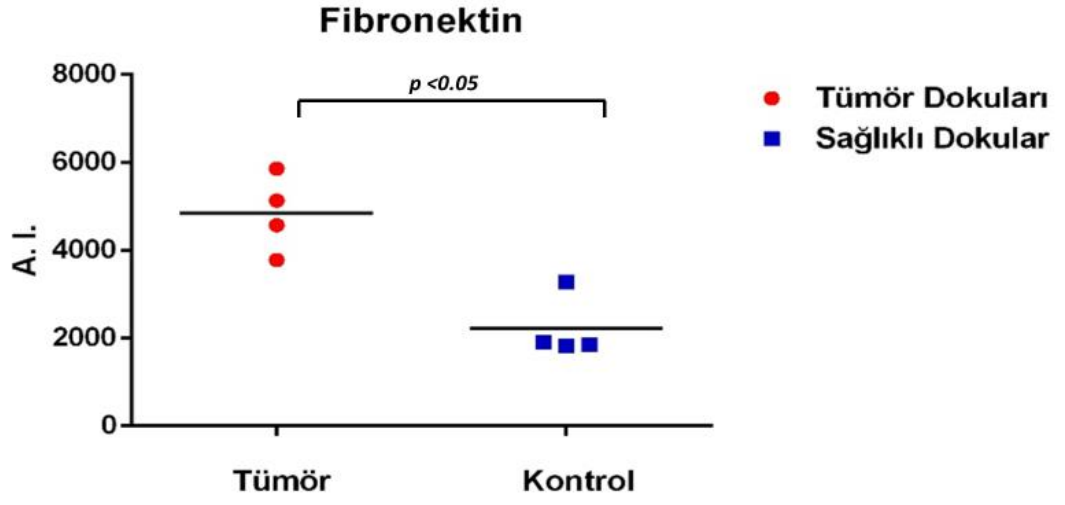
Tanımlanan proteinlerden Galektin-3, S100A11, Fibronektin, HSP60, HSP70, HSP90AB1 ve HSP90B1 proteinlerinin dokulara göre miktar değişimleri Şekil 25-31’de gösterilmiştir. İlgili proteinlerin, tümör dokularında anlamlı derecede ($p < 0.05$) artış gösterdiği görülmektedir.



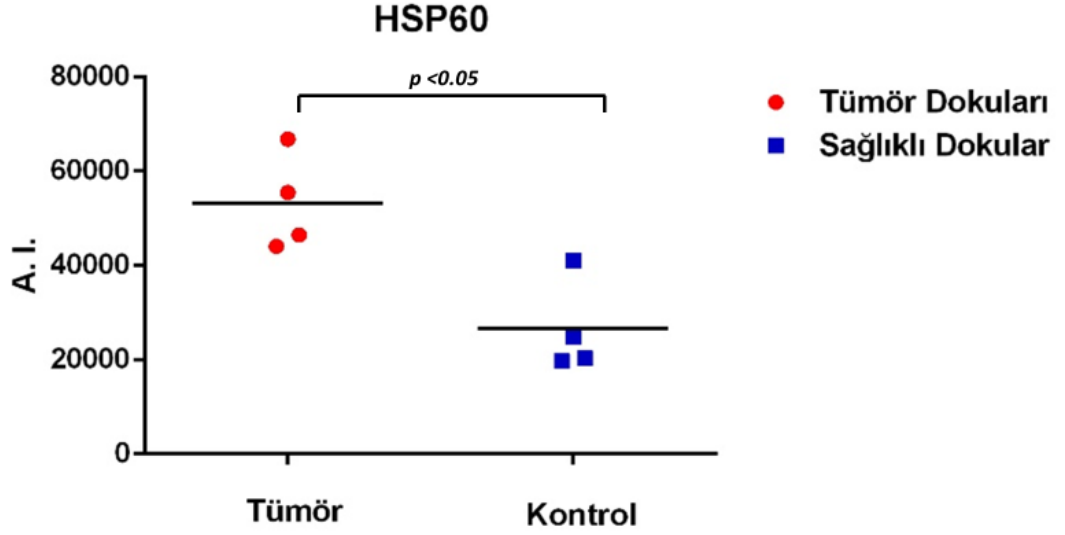
Şekil 25. Galektin-3 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.



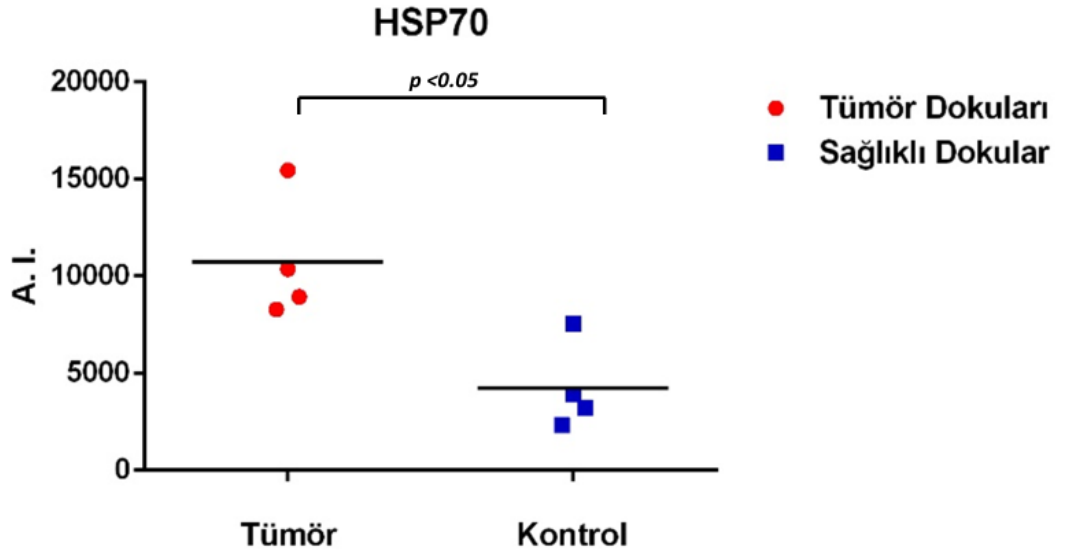
Şekil 26. S100A11 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.



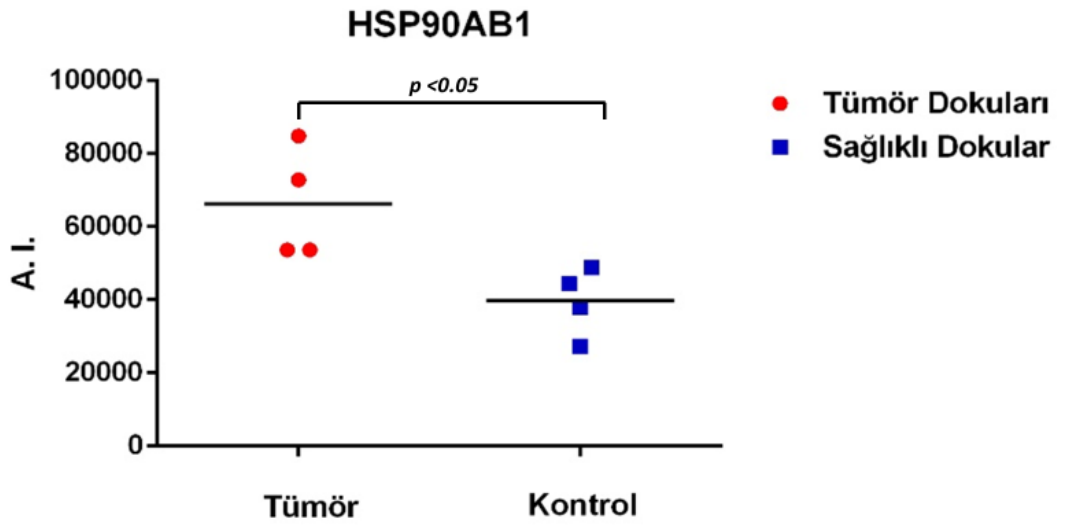
Şekil 27. Fibronectin proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.



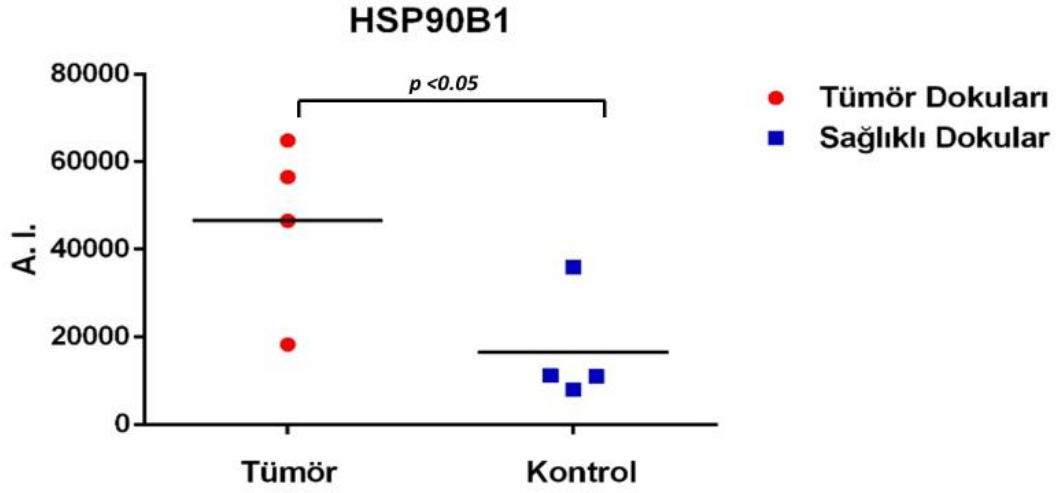
Şekil 28. HSP60 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.



Şekil 29. HSP70 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.



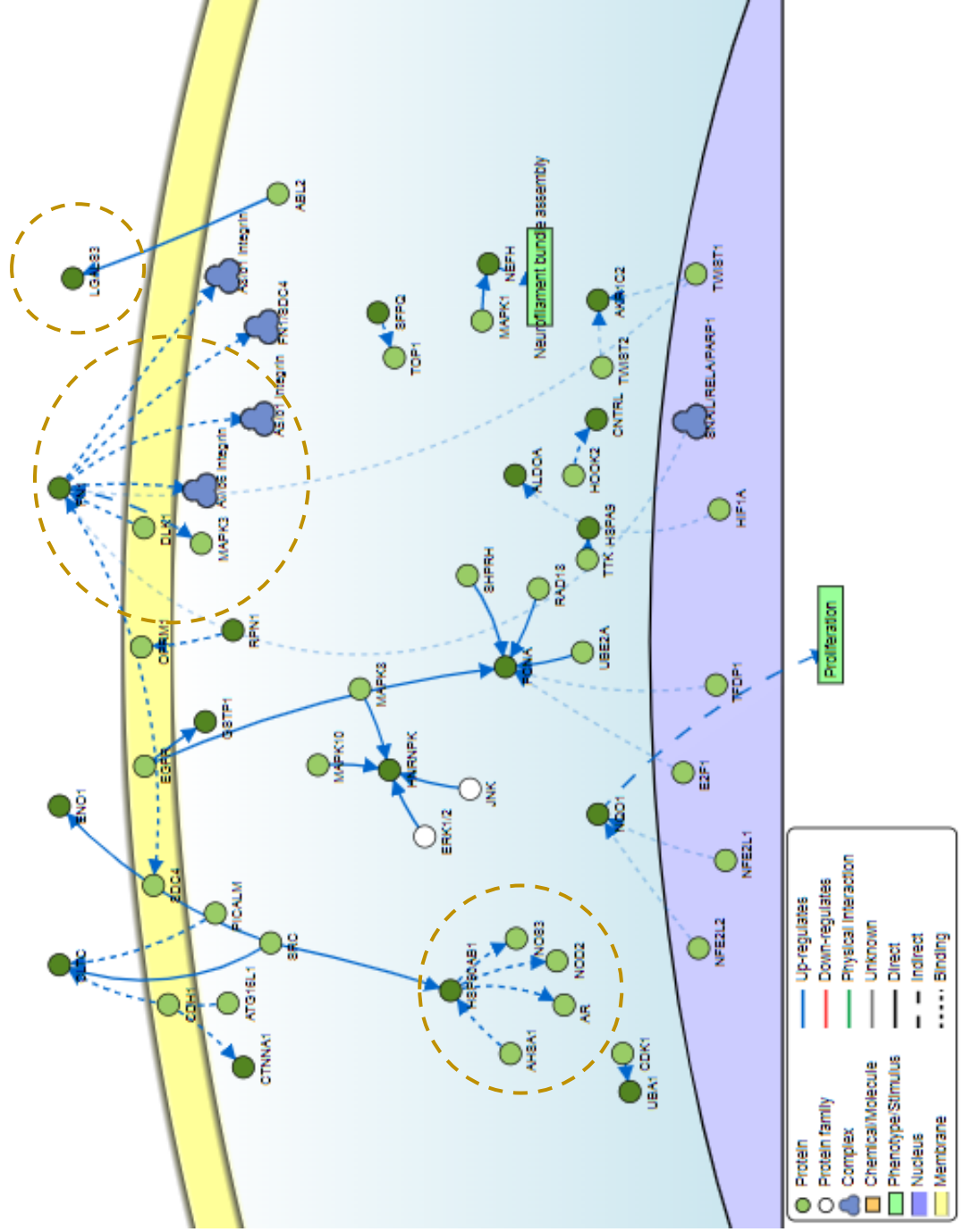
Şekil 30. HSP90AB1 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.



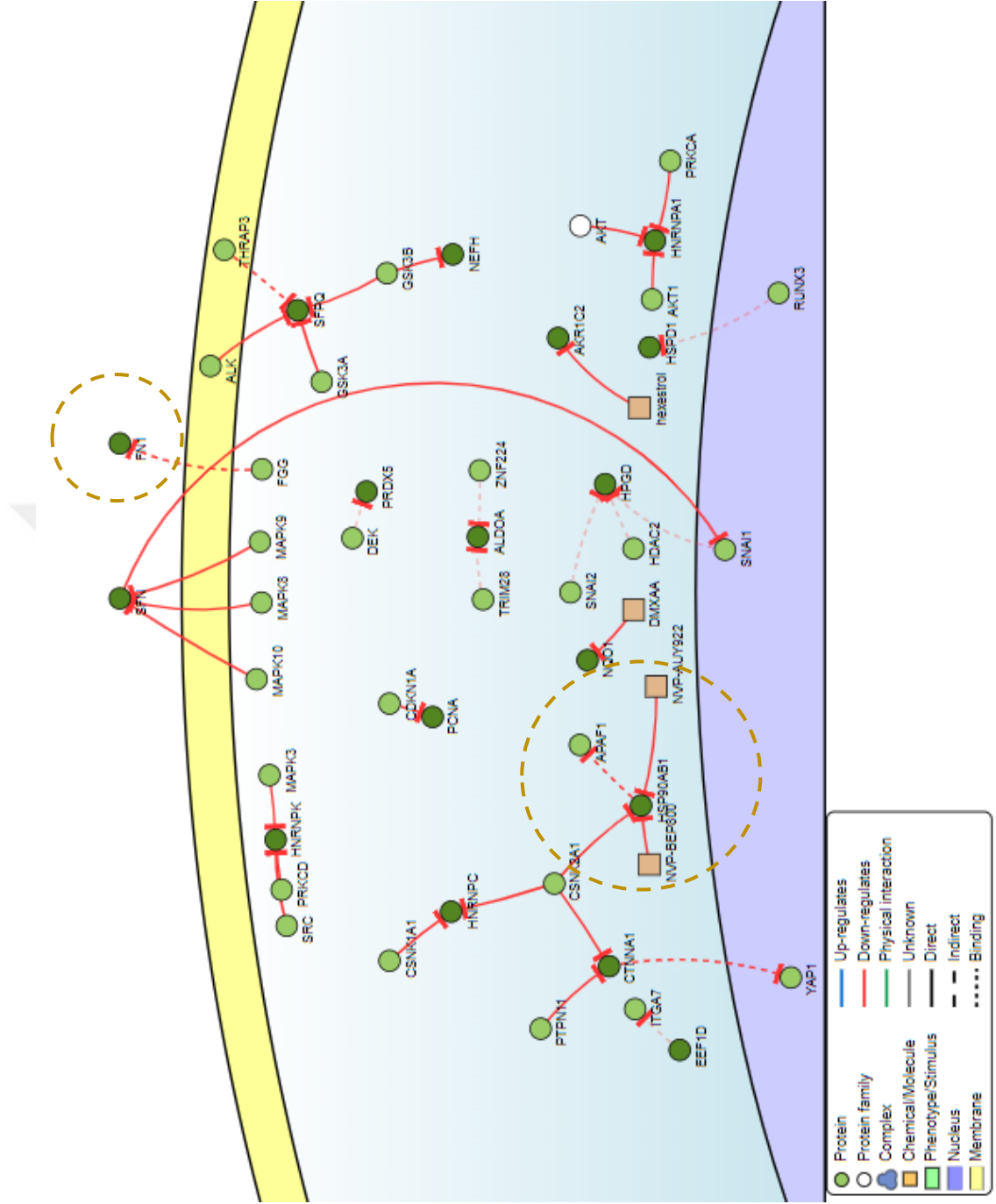
Şekil 31. HSP90B1 proteininin tümör ve kontrol dokularındaki miktar değişimi.

4.7. Tanımlanan Proteinlerin Signor Veri Tabanında Yolak Analiz

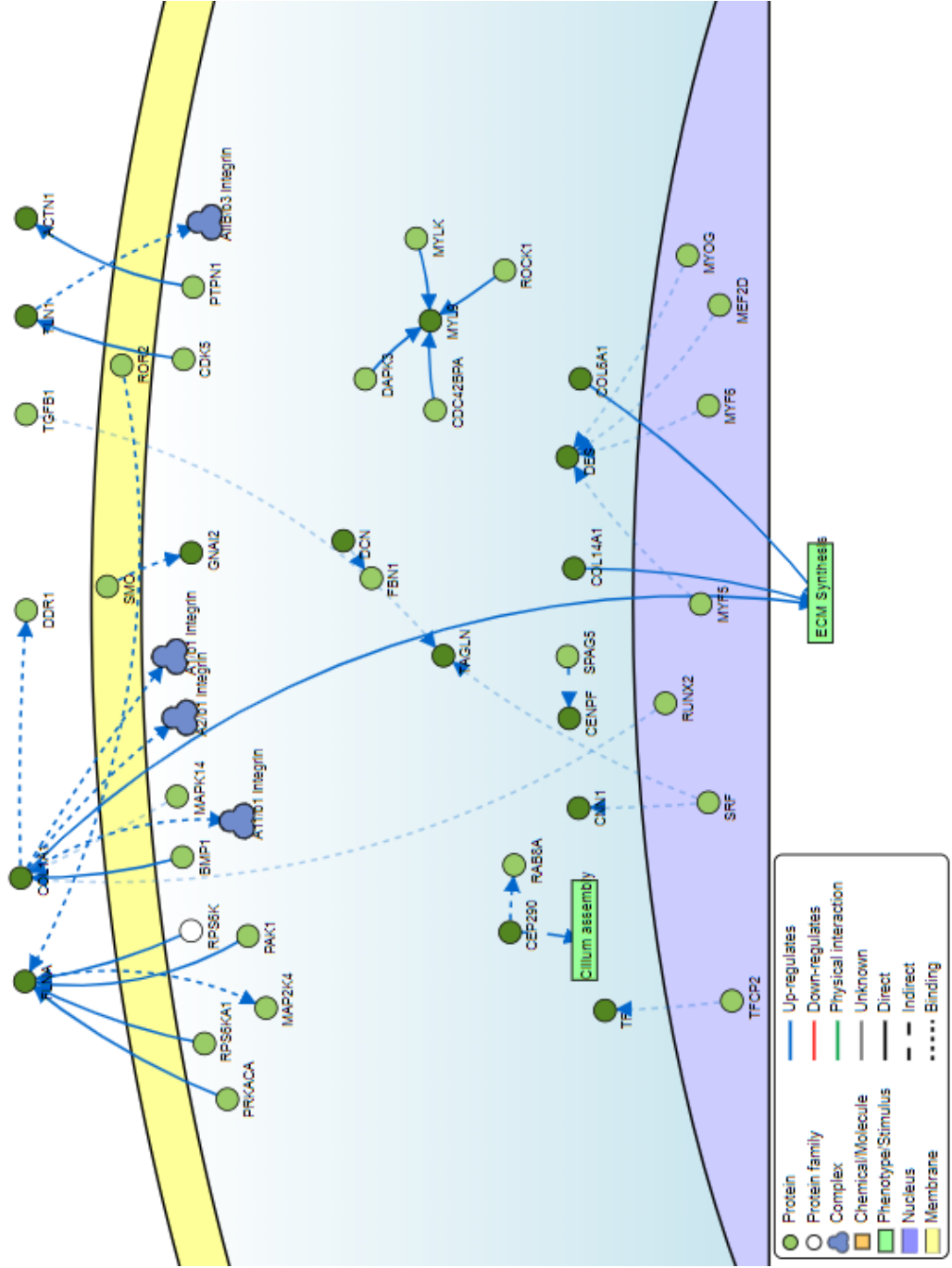
Tümör dokularında anlamlı olarak değişen ($p < 0.05$) 90 protein ile Signor veri tabanı kullanılarak yolak analizi yapılmıştır. Tümör dokularında anlamlı derecede artan proteinlerden ($n = 55$) up-regülatör olanlar ile oluşturulan yolak haritası Şekil 32’de, down-regülatör olanlar ile oluşturulan yolak haritası Şekil 33’de gösterilmiştir. Tümör dokularında anlamlı derecede azalan (sağlıklı mesane kontrol dokularında artan) proteinlerden ($n = 35$) up-regülatör olanlar ile oluşturulan yolak haritası Şekil 34’de, down-regülatör olanlar ile oluşturulan yolak haritası Şekil 35’de gösterilmiştir. Signor veri tabanı ile elde edilen bu yolak haritaları, tanımlanan proteinlerin yanında, bu proteinlerin etkileşmesinin muhtemel olduğu diğer proteinleri ve tüm proteinlerin bulunması muhtemel olduğu selüler ya da ekstraselüler lokalizasyonu bütünsel olarak göstermektedir. Galektin-3, Fibronektin ve HSP90AB1 proteinlerine ait etkileşimler ağ haritaları üzerinde işaretlenmiştir.



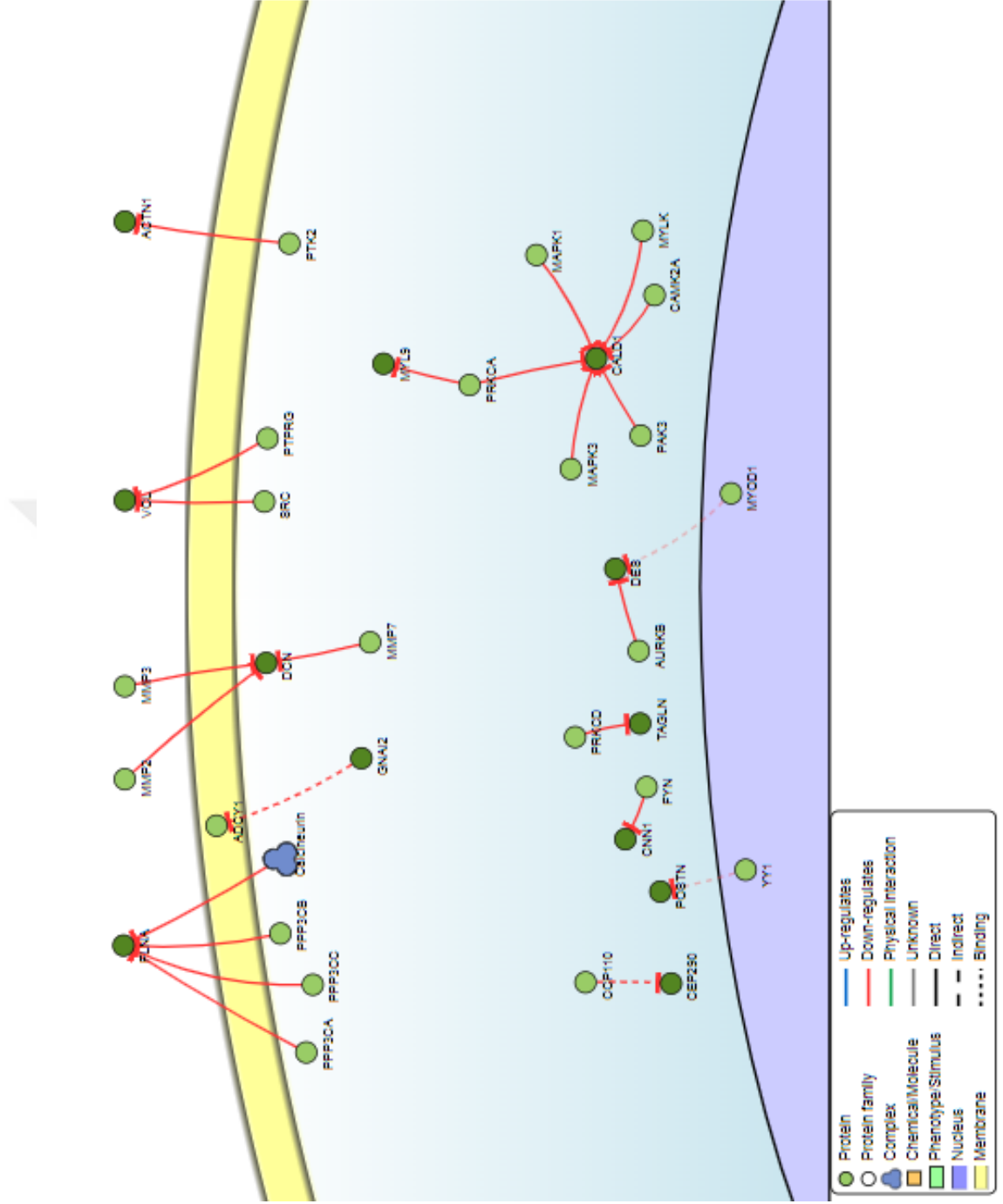
Şekil 32. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerden up-regülatör olanların Signor analizi. Galektin-3, Fibronektin ve HSP90A1 proteinlerine ait etkileşimler daire içerisinde gösterilmiştir.



Şekil 33. Tümör dokularında artış gösteren proteinlerden down-regülatör olanların Signor analizi. Fibronektin ve HSP90AB1 proteinlerine ait etkileşimler daire içerisinde gösterilmiştir.



Şekil 34. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerden up-regulatör olanların Signor analizi.



Şekil 35. Tümör dokularında azalış gösteren proteinlerden down-regülatör olanların Signor analizi.

5. TARTIŞMA

Mesane kanseri dünya genelindeki en yaygın kanser türlerinden biridir ve erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla 3.5 kat daha fazladır (5). Tüm mesane tümörleri içerisinde yüksek dereceli T1 evre tümörlerin (Hg-pT1) klinik olarak belirgin derecede heterojenite, nüks, progresyon ve kansere özgü mortalite gösterdiği bildirilmiştir (174). Literatüre baktığımızda, mesane tümörü hücrelerinin hangi alterasyonu akümüle ederek progresif özellik gösterdiğine ilişkin sorularımızı yanıtlayacak doku bazlı proteomik çalışmaların oldukça sınırlı olduğu ve özellikle tek başına Hg-pT1 tümörlerini ele alan proteomik yaklaşımlı bir çalışmanın bulunmadığı görülmektedir. Bu sebeple bu çalışmada Hg-pT1 tümörlerinin hedef alınması düşünülmüştür. Çalışma kapsamında 4 erkek hastadan elde edilen Hg-pT1 tümör dokuları ve bu dokulara komşu sağlıklı mesane kontrol dokuları LC-MS/MS ile analiz edilmiş ve toplamda 1166 protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden istatistiksel olarak ($p < 0.05$) 90 tanesinin anlamlı olduğu görülmüş ve bunlardan 55 tanesinin tümör dokularında artış, 35 tanesinin ise azalış gösterdiği anlaşılmıştır. Tümör dokusunda artış ve azalış gösteren proteinler hiyerarşik kümeleme analizi ve PCA analizi ile görselleştirilmiş ve tümör ile kontrol dokularını başarılı şekilde birbirinden ayırabildikleri gösterilmiştir. Sonraki aşamada biyoinformatik analizler yapılarak ilgili proteinlerin moleküler fonksiyonları, biyolojik prosesleri ve protein- protein etkileşimleri araştırılmıştır.

Tümör dokularında artış gösteren 55 proteinin protein- protein etkileşimlerini incelemek üzere yapılan STRING analizinde, proteinlerin büyük çoğunluğunun yüksek etkileşim gösterdiği ve aynı hücresel olayın regülasyonunda görev alan proteinlerin 3 farklı küme halinde gruplandığı görülmüştür (Şekil 18). STRING ağ haritasındaki kümelerden ilki heterojen nükleer Ribonükleoproteinler olarak adlandırılan HNRNPA1, HNRNPC, HNRNPF ve HNRNPK; RNA helikazlar olan DDX17 ve DDX39B ile SFN, SFPQ ve RALY proteinlerinden oluşmaktadır (Şekil 20). Bu proteinlerin hepsinin ortak olarak nükleusta yer aldığı ve heteronükleer RNA

metabolizmasında RNA splicing ve matürasyonunun regülatörü olarak görevli olan RNA'ya bağlanan proteinler olduğu görülmüştür. İmmortalize replikasyon yeteneği ve artmış hücre proliferasyonu kanser hücrelerinin en karakteristik özelliklerindedir (52). Bunun bir yansıması olarak heteronükleer RNA devrinde ve RNA metabolizmasının regülasyonunda görevli proteinlerde artış görülmesi beklenen bir durumdur. RNA'ya bağlanan proteinlerin ifadesi ve fonksiyonundaki değişikliklerin, kanserden sorumlu genlerin etkilerini arttırdığı ve tümör progresyonunu hızlandırarak agresifliğini şiddetlendirdiği bilinmektedir (175). Genetiği değiştirilmiş hayvan modelleri ile kombine edilen yeni teknolojiler, RNA'ya bağlanan proteinlerin kanserdeki prognostik değerinin daha detaylı olarak aydınlatılması ve potansiyel terapötik maddelerin tasarımı için yeni hedeflerin ortaya çıkarılmasına yardımcı olmaktadır. Bunlarla birlikte ağ haritasındaki kümelerden bir diğeri, ribozomal proteinler olan RPL7, RPL7A, RPS7 ve RPS8; elongasyon faktörleri olan EEF1D ve EEF1G ile RPN1, SRP14, TCP1 ve AHCY proteinlerinden oluşmaktadır (Şekil 21). Bu proteinlerin hepsinin ortak olarak sitoplazmik lokalizasyonlu olduğu ve translasyonun başlatılması, regülasyonu ve bazı translasyon sonrası proseslerde görevli RNA'ya bağlanan proteinler oldukları görülmüştür. Kanser hücrelerinin artan proliferasyonuna bağlı olarak translasyon ve translasyonla ilişkili proteinlerin de artış göstermesi beklenen bir durumdur ve ribozomal protein çeşitlerinin spesifik kanser türlerindeki ekspresyon paternini kanser türleriyle ilişkilendirmeyi hedef alan çalışmalar mevcuttur (176).

Tümör dokularında artış gösteren 55 protein ile yapılan STRING analizine ait ağ haritasındaki (Şekil 18) kümelerden sonuncusu HSPA9, HSPD1, HSP90AB1, PRDX2, PRDX5, PDIA3, PDIA4, P4HB, TPI1, PGD, ALDOA, ENO1, FN1, PRKCSH, SERPINH1, CNBP2, ERP29 ve PCNA (Şekil 22) proteinlerinden oluşmaktadır. Bu proteinlerden HSPA9 ve HSPD1'in Mitokondriyal strese, HSP90AB1, HSP90B1, PDIA3, PDIA4, P4HB, SERPINH1 ve ERP29'un ise Endoplazmik Retikulum stres cevabında görev aldıkları görülmüştür. Endoplazmik Retikulum stresi, katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin artışı sonrasında organel içi homeostazın bozulmasıyla karakterizedir ve başta kanser olmak üzere birçok hastalıkta karşılaşılan bir hücresel olaydır. Katlanmamış proteinlere erken

evrede hücrel yanıt şaperonların artışı şeklindedir (177). Kanser hücrelerinin artan enerji ihtiyacına yetişmeye çalışan mitokondrielerde de mitokondriyal stres gözlenebilmektedir. Mitokondriyal yük ile paralel olarak ETS'de üretilen süperoksit radikali düzeyi artmakta ve mitokondriyal matriks ya da sitozolde süperoksit radikalinin dismutasyonu ile hidrojen peroksit oluşmaktadır (178). Bu protein kümesinde yer alan PRDX2 ve PRDX5'in hidrojen peroksitin zararsızlaştırılmasında antioksidan olarak görev aldığı düşünüldüğünde, tümör dokusunda ekspresyonlarının artmasının nedenlerinden biri olarak yorumlanabilir. Genomik instabilite ve mutasyon kanser hücrelerinin en karakteristik özelliklerinden bir diğeridir (52). Bu protein kümesinde yer alan PCNA'nın hasarlı DNA'ya bağlanabildiği ve DNA tamir mekanizmasında rol oynadığı görülmektedir ve tümör dokusunda DNA hasarına cevaben artış gösterdiği söylenebilir. Protein kümesinde yer alan diğer proteinlerden TPI1, ENO1 ve ALDOA'nın glikolizde, PDG'nin ise pentoz fosfat yolağında görev yaptığı görülmüştür. Glikolizde görevli proteinlerin tümör dokusundaki artışı, tümör hücrelerinin Warburg etkisi ile aerobik glikoliz yaparak enerji elde ettiği yorumunu ortaya koymaktadır (179).

Tümör dokularında azalış gösteren 35 proteinin protein-protein etkileşimlerini incelemek üzere yapılan STRING analizinde, proteinlerin büyük çoğunluğunun yüksek etkileşim gösterdiği ve aynı hücrel olayın regülasyonunda görev alan proteinlerin 2 farklı küme halinde gruplandığı görülmüştür (Şekil 19). Ağ haritasındaki kümelerden ilki COL1A1, COL6A1, COL14A1, OGN, LUM, PRELP, POSTN ve DCN proteinlerinden oluşmaktadır (Şekil 23). Bu proteinlerin hepsinin ortak olarak ekstraselüler lokalizasyonlu olduğu ve hücrel adezyonda görev aldığı görülmüştür. Bu bağlamda kanser hücrelerinin metastatik eğilim göstermek üzere hücrel adezyonun kaybı yönünde strateji izlediği söylenebilir (180). Ağ haritasındaki kümelerden sonuncusunun MYL6, MYL9, FLNA, FLNB, FLNC, MYH11, ACTN1, CALD1, TPM1, TAGLN, VCL, PGM5 ve CNN1 proteinlerinden oluştuğu görülmektedir (Şekil 24). Bu proteinlerin çoğunun hücre iskeleti lokalizasyonlu olmasına karşın heterojen bir hücrel dağılım gösterdikleri görülmüş ve kas kasılması ile hücre iskeletinin regülasyonunda görev aldıkları anlaşılmıştır. Hücre iskelet proteinlerinin kanser hücrelerinin migrasyonu ve invazyonuyla ilişkili olduğunu

gösteren çalışmalar mevcuttur (181). Ancak T1-Hg tümörlerin muskularis propria invazyonu göstermediği düşünüldüğünde kas kasılması ve kas biyokimyasına ilişkin proteinlerin tümör dokularında azalış göstermesi (sağlıklı dokularda artış göstermesi), TUR ile çıkarılan sağlıklı kontrol dokularında kas dokusu örneklenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Tanımlanan tüm proteinler arasından Galektin-3, S100A11, Fibronektin, HSP60, HSP70, HSP90AB1 ve HSP90B1'in yüksek sinyal intensitesi ile tümör dokularındaki miktarlarının anlamlı derecede ($p < 0.05$) arttığı görülmüştür (Şekil 25-31). İlgili proteinlere ilişkin literatürde daha önceden yapılmış çalışmalar incelenerek Hg-pT1 mesane tümörlerinde bu proteinlerin prognostik önemi ele alınmıştır. Literatür ışığında Galektin protein ailesinin çeşitli üyelerinin mesane kanserine ilişkin fazla sayıda proteomik çalışmada ele alındığı görülmektedir. Shen ve arkadaşlarının T24 ve J82 mesane kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmada Galektin-1 ifadesi susturulmuş tümör hücrelerinin proliferasyonunda ve invaziv özelliklerinde azalma olduğu görülmüştür (182). Wu ve arkadaşlarının pT2- pT4 evre arası tümör dokularında yaptıkları çalışmada, protein ve mRNA düzeyinde artan Galektin-1 ifadesinin artmış tümör evresi, derecesi ve vasküler invazyonuyla korele olduğu ve mesane kanseri prognozunda önem teşkil ettiği bildirilmiştir (183). Li ve arkadaşları T24 hücre hattı ve tümör dokuları kullanarak yaptıkları LC-MS/MS bazlı proteomik çalışmada Galektin-1 aşırı ifadesinin mesane kanseri karsinogenezinde aminoasit, lipid ve glikoz metabolizması, hücre iskeletinin düzenlenmesi, transkripsiyon, protein degradasyonu ve invazyonu etkileyen multifonksiyonel etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir (184). Kramer ve arkadaşlarının 162 mesane dokusu kullanarak yaptıkları çalışmada sağlıklı dokuların tümör dokularına kıyasla daha fazla Galektin-8 ekspresye ettiği ve Galektin-8 ifadesindeki azalışın rekürrens için bir belirteç olabileceği bildirilmiştir (189). Liu ve arkadaşları farklı evrelerdeki 202 mesane kanseri hastasının tümör dokusu örneklerini kullanarak Galektin-9 ekspresyonunu IHC mikroarray ile analiz etmişler ve Galektin-9 düzeyi ile tümör evre ve derecesinin negatif korelasyon gösterdiğini ifade etmişlerdir (185). Gendy ve arkadaşları farklı evrelerdeki 55 mesane kanseri hastasının serum örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmada Galektin-3 düzeyi ile tümör evre ve derecesinin korele olduğunu görmüşler,

farklı evrelerdeki 70 mesane kanseri hastasının serum ve doku örneğini içeren bir diğer çalışmalarında da bunu konfirme etmişlerdir (186, 190). Fang ve arkadaşları, Modifiye Edilmiş Sitrus Pektin (MCP) ile muamele edilen T24 ve J82 mesane kanseri hücrelerinde Galektin-3'ün down regüle olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (187). Canesin ve arkadaşlarının 389 hasta örneği kullanılarak yaptıkları idrar ve doku bazlı çalışmada Galektin-3 düzeyinin tümör evresi ve derecesi ile korele olduğu bildirilmiş ve Galektin-3 düzeyinin Hg-pT1 hastalarının sağ kalımı ile ilişkili olduğu ($p < 0.001$) gösterilmiştir (188). Bu çalışma dahilinde Hg-pT1 tümör dokularında artış gösterdiği görülen proteinlerden birinin de Galektin-3 olduğu görülmüştür ve literatürden de hareketle Galektin-3'ün mesane kanseri için prognostik bir faktör olabileceği düşünülmektedir.

Mesane kanseriyle ilişkili olabileceği düşünülen proteinlerden bir diğeri de S100 Kalsiyum Bağlayan Protein Ailesi'dir. Bansal ve arkadaşları 32 yüksek dereceli ve 33 düşük dereceli mesane kanseri hastası ile 25 sağlıklı kontrolün serum örneklerini kullanarak yaptıkları proteomik bazlı çalışmada S100A8 ve S100A9 proteinlerinin birlikte mesane kanserli hastaları kontrol grubundan başarıyla ayırabildiğini, S100A4 ve S100A8 proteinlerinin ise birlikte düşük dereceli ve yüksek dereceli mesane kanseri hastalarını ayırabildiğini bildirmişler ve bu proteinlerin mesane kanseri evrelemesinde belirteç olarak kullanılabilceğini ifade etmişlerdir (163). Aynı grup sonraki çalışmalarında 55 pre-operatif, ve 53 post-operatif mesane kanseri hastası ile 52 sağlıklı kontrolün serum örneklerini kullanarak S100A4, S100A8 ve S100A9 düzeylerinin değişimini incelemişler ve post-operatif mesane kanserli hastalarda protein düzeylerinin anlamlı derecede azaldığını görmüşlerdir (192). Buna karşılık Yasar ve arkadaşları 52 sağlıklı kontrolün ve farklı evrelerdeki 82 mesane kanserli hastanın serum örneklerinde S100A8 ve S100A9 düzeyini analiz etmişler ve kontrol grubu ile hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır (191). Nishi ve arkadaşları farklı evrelerdeki 50 mesane kanseri hastası ve 30 sağlıklı kontrolün serum örneklerinde S100A6 düzeyini incelemişler ve özellikle non-invaziv tümörü bulunan hastaların serumlarında kontrol grubuna göre artış olduğunu bildirmişlerdir (194). Matsumoto ve arkadaşlarının farklı evrelerdeki 92 mesane tümör dokusu ve 38 sağlıklı mesane dokusunu kullanarak yaptıkları IHC bazlı çalışmada

S100A2 ve S100A4 ifadesinin evre, progresyon ve sağkalım ile korele olduğunu görmüşlerdir (195). Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada S100A9/ EGFR ifadesi düzeyinin kemoterapi sonrası tümör progresyonunun takibinde kullanılabileceği bildirilmiştir (196). Ismail ve arkadaşları farklı evrelerdeki 120 mesane kanseri hastasına ve 30 sağlıklı kontrole ait idrar ve kan örneklerinde S100A protein ailesinin bazı üyelerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını incelemişler ve S100A4 ile S100A6 ifadesinin mesane kanserinin evrelerine göre farklılık gösterdiğini, S100A7'nin squamöz hücreli karsinoma tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini, S100A8 ve S100A9'un invaziv mesane tümörlerini diğerlerinden ayırabildiğini ve S100A11'in yüzeysel mesane tümörlerini erken evrede tespit edebileceğini bildirmişlerdir (193). Memon ve arkadaşlarının farklı evrelerdeki 88 mesane tümör dokusu ile T24 (evre 3) ve RT4 (evre 1) hücre hatlarını kullanarak yaptıkları çalışmada S100A11 düzeyinin değişimi analiz edilmiş ve S100A11 down-regülasyonu ile artan tümör evresi ve azalan sağkalımın korele olduğu görülmüştür. Buna ek olarak pTa'dan pT1 tümörlere geçişte S100A11 ekspresyon düzeyinin tanısal değerde olabileceği bildirilmiştir (197). Bu çalışma dahilinde Hg-pT1 tümör dokularında artış gösteren proteinlerden bir diğerinin de S100A11 olduğu görülmüştür. Literatürden de hareketle S100A11'in de mesane kanseri için prognostik bir faktör olabileceği düşünülmektedir.

Mesane kanseriyle ilişkili olabileceği düşünülen proteinlerden bir diğeri Isı Şok Protein Ailesi (HSP)'dir. Li ve arkadaşları 5637 mesane kanseri hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmalarında HSP90 inhibisyonunun mesane kanseri tedavisinde terapötik hedef olabileceğini bildirmişlerdir (198). Cavanaugh ve arkadaşları ise farklı mesane kanseri hücre hatları kullanarak yaptıkları çalışmalarında HSP70 ve HSP90 inhibisyonunun invaziv mesane tümörü hücrelerinin progresyonundaki anahtar sinyal yollarını blokladığını göstererek tedavi amaçlı kullanılabileceğine işaret etmişlerdir (199). Karkoulis ve arkadaşları T24 ve RT4 hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarında 17-DMAG kullanarak HSP90 ve onunla ilişkili proteinleri down-regüle etmişler ve bunun mesane kanseri tedavisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir (200). Bunlara karşılık Lee ve arkadaşları 6 farklı mesane kanseri hücre hattı ve farklı evrelerdeki mesane kanseri hastalarına ait tümör dokuları kullanarak yaptıkları çalışmalarında

HSP27'nin prognostik biyobelirteç ve terapötik hedef olma yönünden limitli kaldığını bildirmişlerdir (201). Behnsawy ve arkadaşları farklı evrelerdeki 235 mesane kanseri hastasına ait tümör dokusu örnekleri ve KoTCC-1 hücre hattı kullanarak yaptıkları çalışmalarında, HSP70'in tümör derecesi ve evresinde prognostik önemi olduğunu belirtmişler ve siRNA aracılığıyla HSP70 susturulmasının kemosenitiviteyi arttırdığını bildirmişlerdir (202). Matsui ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada antisense oligonükleotid ile hedef alınan HSP27'nin yüksek dereceli mesane tümörlerinde intravezikal tedavi yönünden faydalı olabileceğine işaret edilmiştir (203). Prince ve arkadaşlarının farklı mesane kanseri hücre hatları kullanarak yaptığı çalışmada HSP70 inhibisyonunun kasa invaze mesane tümörlerinde hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir (204). Syrigos ve arkadaşlarının farklı evrelerdeki 67 mesane tümör dokusu, 10 inflamatuvar mesane dokusu ve 10 sağlıklı kontrol dokusu kullanarak yaptığı IHC bazlı çalışmada HSP70 ekspresyon düzeyine bakılmış ve istatistiksel olarak anlamlı şekilde tümör derecesi ($p < 0.001$), evresi ($p < 0.001$) ve kansere bağlı sağ kalım ($p < 0.05$) ile korele olduğu görülmüştür (205). Bu çalışma dahilinde Hg-pT1 tümör dokularında artış gösteren proteinler arasında HSP60, HSP70 ve HSP90 analogları olan HSP90AB1 ile HSP90B1 yer almaktadır. Literatürden de hareketle bu Isı Şok Proteinleri'nin mesane kanseri için prognostik bir faktör olabileceği düşünülmektedir.

Mesane kanserinde prognostik önemi olabileceği düşünülen proteinlerden bir diğeri de Fibronektin'dir. Dong ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları meta analizde, mesane kanseri tanısında idrar sitolojisi ile kombine olarak Fibronektin'in bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi sonucu ortaya koyulmuştur (206). Gao ve arkadaşlarının T24 ve J82 mesane kanseri hücre hatlarını kullanarak yaptıkları çalışmada CIP2A'nın β -katenin stabilizasyonunu arttırdığı ve Fibronektin kaynaklı mesane tümörü hücre proliferasyonunun önemli bir aracısı olduğu gösterilerek Fibronektin ve CIP2A'nın mesane kanseri tedavisinde önemli terapötik hedefler olabileceği bildirilmiştir (207). Eissa ve arkadaşlarının mesane kanserli 100 hastanın, benign ürolojik hastalığı bulunan 93 hastanın ve 47 sağlıklı kontrolün idrar örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmada mutant p53 ve Fibronektin'in mesane kanseri için tanısal değerde olduğu bildirilmiştir (208). Carbayo ve arkadaşlarının 931 idrar örneği

kullanarak yaptığı çalışmada Sitokeratin 18 ve Fibronektin'in güçlü üriner tümör belirteçleri oldukları bildirilmiştir (209). Fibronektin'i mesane kanserinde önemli kılan noktalardan bir diğeri pTa, pT1 ve CIS gibi süperfisiyal tümörlerinde uygulanan Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immünoterapisinde BCG'nin mesane duvarına Fibronektin aracılı bağlanma gösterdiğinin düşünülmesidir (210). Bu bilgi ışığında tümör hücrelerinde artış gösteren Fibronektin düzeyinin BCG'nin yarışmalı bağlanmasında bir avantaj olabileceği düşünülebilir. Bu çalışma dahilinde Hg-pT1 tümörlerinde artış gösteren proteinlerden bir diğerrinin Fibronektin olduğu görülmüştür. Literatürden de hareketle Fibronektin'in mesane kanseri progresyonunda önemli bir protein olduğu söylenebilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışma ile tümör dokularında Heteronükleer RNA metabolizması, translasyonel regülasyon aktivitesi, Endoplazimik Retikulum stresi, Mitokondriyal stres ve Warburg etkisine bağlı aerobik glikolizi tarif eden proteinlerin artış gösterdiği buna karşılık hücresel adezyon ve hücre iskeletinin regülasyonundan sorumlu proteinlerin azalış gösterdiği görülmüştür. Tanımlanan tüm proteinler arasından yine tümör dokularında artış gösteren Galektin-3, S100A11, Fibronektin, HSP60, HSP70 ile HSP90'ın analogları olan HSP90AB1 ve HSP90B1 proteinlerinin literatürden de hareketle Hg-pT1 tümörleri için prognostik önem taşıdığı anlaşılmıştır. Bu bağlamda ilgili proteinlerin mesane kanseri tedavisinde potansiyel terapötik hedefler ve biyobelirteçler olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Çalışmanın daha fazla örnek sayısı ve farklı proteomik metotları da içerecek şekilde genişletilmesi faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. Elsevier Health Sciences, 2010.
2. Kelly, Christopher R., and Jaime Landman. The Netter Collection of Medical Illustrations Urinary System e-Book. Vol. 5. Elsevier Health Sciences, 2012.
3. Dinçer Ç. Üroonkoloji. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, 2007.
4. Türkeri L, Özeri A, Narter F. Moleküler Üroloji. Pelin Ofset Tipo Matbaacılık, 2012.
5. Sanli O, Dobruch J, Knowles AM, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen EM, Lotan Y. Bladder cancer. Nature reviews Disease primers 2017; 3(1).
6. Yarış, Füsün, and H. Hilmi Sabuncu. Mesane kanserinde etiyolojik faktörler. Türkiye Aile Hekimliği Dergisi 2007; 6 (2): 67-73.
7. Hansel, Donna E., and Seth P. Lerner. Precision Molecular Pathology of Bladder Cancer. Springer, 2018.
8. Konety, Badrinath R., and Sam S. Chang, eds. Management of Bladder Cancer: A Comprehensive Text With Clinical Scenarios. Springer, 2014.
9. Lerner, Seth P., Mark P. Schoenberg, and Cora N. Sternberg, eds. Bladder cancer: Diagnosis and clinical management. John Wiley & Sons, 2015.
10. Reid ML, Leav I, Kwan PL, Russel P, Merk FB. Characterization of a human, sex steroid-responsive transitional cell carcinoma maintained as a tumor line (R198) in athymic nude mice. Cancer research 1984; 44(10): 4560-4573.
11. Özveren B. Mesane Kanserlerinde Tanı ve Evrelendirme. Kanser Gündemi Dergisi 2016; 4(4): 25-30.
12. Ataus S. Mesane kanseri tanı ve tedavisi. Klinik Gelişim Dergisi 2008; 21(3):130-136.
13. Wiener HG, Mian CH, Haitel A, Pycha A, Schatzl G, Marberger M. Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer? The Journal of urology 1998; 159(6): 1876-1880.
14. Wynder, Ernst L, and Robert Goldsmith. The epidemiology of bladder cancer. A second look. Cancer 1977; 40(3): 1246-1268.
15. Vineis P, Jacques E, Benedetto T. Bladder cancer and smoking in males: types of cigarettes, age at start, effect of stopping and interaction with occupation. International journal of cancer 1984; 34(2); 165-170.
16. Freedman ND, Silverman DT, Hollanbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. Jama 2011; 306(7): 737-745.

17. Donato F, Boffetta P, Raffaella F, Aulenti V, Gelatti U, Porru S. Bladder cancer, tobacco smoking, coffee and alcohol drinking in Brescia, northern Italy. *European journal of epidemiology* 1997; 13(7); 795-800.
18. Stern MC, Umbach DM, Gills CH, Lunn RM, Taylor JA, DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2001; 10(2); 125-131.
19. Narter KF, Cahit S. Mesane Kanseri için Tarama: Uygunluğu ve Kısıtlılıkları. *Bulletin of Urooncology* 2015;14: 38-45.
20. Vineis P, Lorenzo S. Proportion of lung and bladder cancers in males resulting from occupation: a systematic approach. *Archives of Environmental Health: An International Journal* 1991; 46(1); 6-15.
21. Skipper PL, Tannenbaum SR, Ross RK, Yu MC. Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk." *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2003; 12(6); 503-507.
22. Guha N, Steenland NK, Meritti F, Alteri A, Cogliano V, Straif K. Bladder cancer risk in painters: a meta-analysis. *Occupational and environmental medicine* 2010;67(8); 568-573.
23. Kantor AF, Patricia H, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *American journal of epidemiology* 1984; 119(4); 510-515.
24. Rosin MP, Wagida A. Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic *Schistosoma haematobium* infections. *International journal of cancer* 1992; 50(4); 539-543.
25. Hodder SL. Predisposition to urinary tract epithelial metaplasia in *Schistosoma haematobium* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2000; 63(3): 133-138.
26. Çalışır B, Yavaşcaoğlu İ, Yerci Ö. Mesane yerleşimli şistozomiazis. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2003; 29(3): 77-79.
27. West DA. Role of chronic catheterization in the development of bladder cancer in patients with spinal cord injury. *Urology* 1999; 53(2): 292-297.
28. Kaufman JM. Bladder cancer and squamous metaplasia in spinal cord injury patients. *The Journal of urology* 1977; 118(6); 967-971.
29. Fairchild WV, Spencer RC, Solomon HD, Gangi MP. The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. *The Journal of urology* 1979; 122(2): 163-164.

30. Travis LB, Curtis LE, Glimelius B. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87(7): 524-531.
31. Castela JE, Yuan JM, Dominguez MG, Yu MC, Ross RK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *British journal of cancer* 2000; 82(7): 1364.
32. McCredie M, Stewart JH, Ford JM, MacLennan RA, Phenacetin-containing analgesics and cancer of the bladder or renal pelvis in women. *British journal of urology* 1983; 52(2): 220-224.
33. Fortuny J. Analgesic and anti-inflammatory drug use and risk of bladder cancer: a population based case control study." *BMC urology* 2007; 7(1): 13.
34. Cohen SM, Garland MS, Okamura T, Smith RA. Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer research* 1992; 52(13): 3577-3581.
35. Castela JE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *British journal of cancer* 2000; 82(7): 1364.
36. DeGorge KC, Harry RH, Stephanie CH. "Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *American family physician* 2017; 96(8).
37. Moch H, Peter AH, Thomas MU. Who classification of tumours of the urinary system and male genital organs. *Who classification of tumours of the urinary system and male genital organs*. 2016.
38. Özcan SS. Mesane kanserinde toll-benzeri reseptörlerin ekspresyon profillerinin belirlenmesi. Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2014 (Danışman: Doç. Dr. Vildan Caner).
39. Robinson BD, Francesca K. Grading, Staging, and Morphologic Risk Stratification of Bladder Cancer. *Precision Molecular Pathology of Bladder Cancer*. Springer, Cham, 2018: 29-42.
40. Wang G, Jesse KM. Urinary bladder pathology: World Health Organization (WHO) classification and american joint committee on cancer (AJCC) staging update. *Archives of pathology and laboratory medicine* 2018.
41. Paner GP. Updates in the eighth edition of the tumor-node-metastasis staging classification for urologic cancers. *European urology* 2018; 73(4): 560-569.
42. Bostwick DG. Natural history of early bladder cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 1992: 31-38.

43. Choong NW, Quevedo JF, Judith SK. Small cell carcinoma of the urinary bladder: the Mayo Clinic experience. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 2005; 103(6): 1172-1178.
44. Eser S, Yakut C, Özdemir R, Karakiliç H, Özalan S, Marshall SF, Özen E. Cancer incidence rates in Turkey in 2006: a detailed registry based estimation. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 2010; 11(6): 1731-1739.
45. Delclos GL, Seth PL. Occupational risk factors. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 2008; 42(sup218): 58-63.
46. Yikilmaz TN, Mesanenin nadir görülen kanserleri: Olgu serisi ve literatürün gözden geçirilmesi/Rare malignancies of the bladder: Case series and review of the literature. *Dicle Tıp Dergisi* 2014; 41(4): 767.
47. Kaldor JM. Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: A case control study. *International journal of cancer* 1995; 63(1): 1-6.
48. Neugut AI, Ahsan H, Robinson E, Ennis RD. Bladder carcinoma and other second malignancies after radiotherapy for prostate carcinoma. *Cancer* 1997; 79(8): 1600-1604.
49. Aktaylı E, Sezgin G. Mesane Kanseri Gelişiminde Moleküler Mekanizmaların Rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 2011; 31(1): 191-205.
50. Tuttle TM, Williams GM, Marshall FF. Evidence for cyclophosphamide-induced transitional cell carcinoma in a renal transplant patient. *The Journal of urology* 1988; 140(5): 1009-1011.
51. Travis LB. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *JNCI* 1995; 87(7): 524-531.
52. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-674.
53. Zhang X, Han C, He J. Research progress of oncogene and tumor suppressor gene in bladder cancer. *Panminerva medica* 2015; 57(4): 191-200.
54. Przybojewska B, Jagiello A, Jalmuzna P. H-RAS, K-RAS, and N-RAS gene activation in human bladder cancers. *Cancer genetics and cytogenetics* 2000; 121(1): 73-77.
55. Czerniak B. Ha-ras gene codon 12 mutation and DNA ploidy in urinary bladder carcinoma. *British journal of cancer* 1990; 62(5): 762.
56. Saito S, Hata M, Fukuyama R, Sakai K, Kudoh J, Tazaki H, Shimizu N. Screening of H-ras gene point mutations in 50 cases of bladder carcinoma. *International journal of urology* 1997; 4(2): 178-185.
57. Fontana D. Evaluation of c-ras oncogene product (p21) in superficial bladder cancer. *European urology* 1996; 29: 470-476.

58. Fitzgerald JM. Identification of H-ras mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87(2): 129-133.
59. Lin CY. Searching cell-secreted proteomes for potential urinary bladder tumor markers. *Proteomics* 2006; 6(15): 4381-4389.
60. Knowles MA. Molecular pathogenesis of bladder cancer. *International journal of clinical oncology* 2008; 13(4): 287-297.
61. Evan G, Harrington E, Fanidi A, Land H, Amati B, Bennett M. Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 1994; 345(1313): 269-275.
62. Amati B, Hartmut L. Myc, Max, Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death." *Current opinion in genetics and development* 1994; 4(1): 102-108.
63. Kotake T, Saiki S, Kinouchi T, Shiku H, Nakayama E. Detection of the c-myc gene product in urinary bladder cancer. *Japanese journal of cancer research* 1990; 81(12): 1198-1201.
64. Drager BJ, Schulz WA, Jürgens B, Gerharz CD, Roeyen CRC, Büttel H, Ebert T, Ackerman R. c-myc in bladder cancer Clinical findings and analysis of mechanism. *Urological research* 1997; 25(1): 45-S49.
65. Hurlin PJ, Queva C, Koskinen PJ, Steingrimsson E, Ayer DE, Copeland NG, Jenkins NA, Eisenman RN. Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *The EMBO journal* 1995; 14(22): 5646-5659.
66. Lipponen PK. Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer. *The Journal of pathology* 1995; 175(2): 203-210.
67. Kramer C, Klasmeyer K, Bojar H, Schulz WA, Ackermann R, Grimm MO. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor isoforms and epidermal growth factor receptor/ErbB1 expression in bladder cancer and their relation to clinical outcome. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 2007; 109(10): 2016-2024.
68. Ouzana DA, Bieche I, Tozlu S, Botto H, Debre B, Rosette L. Gene expression profiling of ERBB receptors and ligands in human transitional cell carcinoma of the bladder." *The Journal of urology* 2006; 175(3): 1127-1132.

69. Kruger S, Weitsch G, Buttner H, Matthiensen A, Bohmer T, Marquardt T, Sayk F, Feller AC, Bohle A. Overexpression of c-erbB-2 oncoprotein in muscle-invasive bladder carcinoma: relationship with gene amplification, clinicopathological parameters and prognostic outcome *International journal of oncology* 2002; 21(5): 981-987.
70. Underwood M, Bartlett J, Reeves J, Gardiner DS, Scott R, Cooke T. C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? *Cancer research* 1995; 55(11): 2422-2430.
71. Li W, Wang Y, Tan S, Rao Q, Zhu T, Huang G, Li Z, Liu G. Overexpression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and HER-2 in bladder carcinoma and its association with patients' Clinical Features. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 2018; 24: 7178.
72. Xu HJ, Cairns P, Hu SX, Knowles MA, Benedict WF. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *International journal of cancer* 1993; 53(5): 781-784.
73. Cardo CC, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1992; 84(16): 1251-1256.
74. Cote R. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer research* 1998; 58(6): 1090-1094.
75. Grossman HB, Liebert M, Antelo M, Dinney CP, Hu SX, Palmer JL, Benedict WF. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clinical Cancer Research* 1998; 4(4): 829-834.
76. Efeyan A, Manuel S. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell cycle* 2007; 6(9): 1006-1010.
77. Mitra AP, Ram HD, Richard JC. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24(35): 5552-5564.
78. Esrig D. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *New England Journal of Medicine* 1994; 331(19): 1259-1264.
79. Sarkis AS, Dalbagni G, Cardo CC, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1993; 85(1): 53-59.

80. Lacombe L, Dalbagni G, Zhang ZF, Cardo CC, Fair WR, Herr WR, Reuter VE. Overexpression of p53 protein in a high-risk population of patients with superficial bladder cancer before and after bacillus Calmette-Guérin therapy: correlation to clinical outcome. *Journal of clinical oncology* 1996; 14(10): 2646-2652.
81. Stein JP. Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90(14): 1072-1079.
82. Horikawa Y, Jian G, Xifeng W. Genetic susceptibility to bladder cancer with an emphasis on gene–gene and gene–environmental interactions. *Current opinion in urology* 2008; 18(5): 493-498.
83. Hung RY. GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *International Journal of Cancer* 2004; 110(4): 598-604.
84. Inatomi H. NAT2 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to bladder cancer in Japanese. *International journal of urology* 1999; 6(9): 446-454.
85. Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporasso NE, Vineis P, Hayes RB, Teitel CH, Massengill JP, Lowsen MF, Kadlubar FF. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics* 1992; 2(3): 116-127.
86. Okkels H. Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) polymorphisms in susceptibility to bladder cancer: the influence of smoking. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 1997; 6(4): 225-231.
87. Blum M. Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA and cell biology* 1990; 9(3): 193-203.
88. Cartwright RA, Rogers H, Hall DB, Glashan RW, Ahmad RA, Higgins E, Kahn MA. Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *The Lancet* 1982; 320(8303): 842-846.
89. Engel LS. Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. *American journal of epidemiology* 2002; 156(2): 95-109.
90. Qingwen MA, Guofang L, Yiqiu Q, Daru L, Klaus G, Frank G, Jigang C, Jianhua S. GSTP1 A1578G (Ile105Val) polymorphism in benzidine-exposed workers: an association with cytological grading of exfoliated urothelial cells." *Pharmacogenetics and Genomics* 2003; 13(7): 409-415.
91. Choi JY. CYP2E1 and NQO1 genotypes, smoking and bladder cancer. *Pharmacogenetics and Genomics* 2003; 13(6): 349-355.

92. Vineis P. CYP1A1 T3801 C polymorphism and lung cancer: a pooled analysis of 2,451 cases and 3,358 controls." *International journal of cancer* 2003; 104(5): 650-657.
93. Nakajima M. Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 1994; 3(5): 413-421.
94. O'Brien T. "Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Research* 1995; 55(3): 510-513.
95. Ravery V, Jouanneau J, Diez SG, Abbou CC, Caruelle JP, Barritault D, Chopin DK. Immunohistochemical detection of acidic fibroblast growth factor in bladder transitional cell carcinoma. *Urological research* 1992; 20(3): 211-214.
96. Campbell SC. Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer." *Cancer Research* 1998; 58(6): 1298-1304.
97. Gazzaniga P, Gandini O, Gradilone A, Silvestri I, Giuliani L, Magnanti M, Gallucci M, Saccani G, Frati L, Agliano AM. Detection of basic fibroblast growth factor mRNA in urinary bladder cancer: correlation with local relapses. *International journal of oncology* 1999; 14(6): 1123-1130.
98. Kim EJ. Genotypes of TNF- α , VEGF, hOGG1, GSTM1, and GSTT1: useful determinants for clinical outcome of bladder cancer. *Urology* 2005; 65(1): 70-75.
99. Crew JP. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer research* 1997; 57(23): 5281-5285.
100. Crew JP. Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates. *The Journal of urology* 1999; 161(3): 799-804.
101. Kim SI. Association of cyclooxygenase-2 expression with prognosis of stage T1 grade 3 bladder cancer. *Urology* 2002; 60(5): 816-821.
102. Goddard JC. Reduced thrombospondin-1 at presentation predicts disease progression in superficial bladder cancer. *European urology* 2002; 42(5): 464-468.
103. Grossfeld GD. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression." *Journal of the National Cancer Institute* 1997; 89(3): 219-227.
104. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Susan G, Chen SC, Skinner DG, Nicholas PW. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87(21): 1603-1612.
105. Chaudhary R. Prognostic relevance of micro-vessel density in cancer of the urinary bladder." *Anticancer research* 1999;19: 3479-3484.

106. Papathoma AS. Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer research* 2000; 20(3): 2009-2013.
107. Davies B. Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Research* 1993; 53(22): 5365-5369.
108. Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, Murakami Y, Nishitani M, Kagawa S. Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 1998; 87(2): 1359-1366.
109. Fouand H, Salem H, Ellakwa DS, Hamid NA. MMP-2 and MMP-9 as prognostic markers for the early detection of urinary bladder cancer. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 2019; 33(4): e22275.
110. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Molecular Pathology* 1999; 52(4): 189.
111. Ross JS. Expression of the CD44 cell adhesion molecule in urinary bladder transitional cell carcinoma." *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology* 1996; 9(8): 854-860.
112. Wu CT, Lin WY, Chen WC, Chen WF. Value of CD44 in muscle-invasive bladder cancer and its relationship with IL-6 signaling. *Annals of surgical oncology* 2018; 25(12): 3518-3526.
113. Suwannakul N. Overexpression of CD44 variant 9: A novel cancer stem cell marker in human cholangiocarcinoma in relation to inflammation." *Mediators of inflammation* 2018.
114. Southgate J. Patterns of splice variant CD44 expression by normal human urothelium in situ and in vitro and by bladder-carcinoma cell lines." *International journal of cancer* 1995; 62(4): 449-456.
115. Sugiyama M, Woodman A, Sugino T, Crowley S, Ho K, Smith J, Matsumura Y, Tarin D. Non-invasive detection of bladder cancer by identification of abnormal CD44 proteins in exfoliated cancer cells in urine." *Clinical molecular pathology* 1995; 48(3):142-147.
116. Frixen UH. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of cell biology* 1991; 131(3): 173-185.
117. Jackson AM. Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) immunotherapy. *Clinical and Experimental Immunology* 1995; 99(3): 369-375.
118. Griffiths TRL. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *British journal of cancer* 1996; 74(4): 579.

119. Cavallaro U, Gerhard C. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4(2): 118.
120. Mitra AP, Ram HD, Richard JC. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24(35): 5552-5564.
121. Klemm SL., Zohar S, William JG. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature Reviews Genetics* 2019; 20(1): 207-220.
122. Özen A, Ali Ü, Cavit C. Epigenetik degisiklikler ve mesane kanseri arasindaki Iliski/The relationship between bladder cancer and epigenetic alterations. *Bulletin of Urooncology* 2017; 16(1): 17-22.
123. Feinberg AP, Rolf O, Steven H. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature reviews genetics* 2006; 7(1): 21.
124. Jones PA, Stephen BB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews genetics* 2002; 3(6): 41-45.
125. Kim EM. Evaluation of an epigenetic profile for the detection of bladder cancer in patients with hematuria. *The Journal of urology* 2016; 195(3): 601-607.
126. Renard I. Identification and validation of the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples. *European urology* 2010; 58(1): 96-104.
127. Wolff EM. Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PLoS genetics* 2010; 6(4): e1000917.
128. Catto, JWF, MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *European urology* 2011; 59(5): 671-681.
129. Schneider AC. Global histone H4K20 trimethylation predicts cancer-specific survival in patients with muscle-invasive bladder cancer. *BJU international* 2011; 108(8): 290-296.
130. Murphy WM. Urinary cytology and bladder cancer. The cellular features of transitional cell neoplasms. *Cancer* 1984; 53(7): 1555-1565.
131. Lokeshwar VB. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers *Urology* 2005; 66(6): 35-63.
132. Frantzi M, Antonia V. Ten years of proteomics in bladder cancer: progress and future directions. *Bladder Cancer* 2017; 3(1): 1-18.
133. Halling KC, Benjamin RK. Bladder cancer detection using FISH (UroVysion assay). *Advances in anatomic pathology* 2008; 15(5): 279-286.

134. Kehinde EO. Comparison of the sensitivity and specificity of urine cytology, urinary nuclear matrix protein-22 and multitarget fluorescence in situ hybridization assay in the detection of bladder cancer." Scandinavian journal of urology and nephrology 2011; 45(2): 113-121.
135. Greene KL, Anna B, Badrinath R, Konety R. Diagnostic utility of the ImmunoCyt/uCyt+ test in bladder cancer. Reviews in urology 2006; 8(4): 190.
136. Budman LL. Wassim K, Jordan RS. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. Canadian Urological Association Journal 2008; 2(3): 212.
137. Landman j. Sensitivity and specificity of NMP-22, telomerase, and BTA in the detection of human bladder cancer. 1998; 52(3): 398-402.
138. Kaya E, Atakan İH, Alagöl B, Ersoy E, Kaplan M, İnci O. Mesanenin değişici epitel hücreli kanseri tanısında Nükleer Matriks Protein 22 (NMP22)'nin yeri. Türk Üroloji Dergisi 2001; 27(3): 279- 284.
139. Şahinli S, Çağatay G, Orhan G. Mesane tümörlerinde tümör belirleyicileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2003; 56(3).
140. Liang Q. Comparison of the diagnostic performance of fluorescence in situ hybridization (FISH), nuclear matrix protein 22 (NMP22), and their combination model in bladder carcinoma detection: a systematic review and meta-analysis. OncoTargets and therapy 2019; 12: 349.
141. Pode D. Noninvasive detection of bladder cancer with the BTA stat test. The Journal of urology 1999; 161(2): 443-446.
142. Halling KC. A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. The Journal of urology 2002; 167(5): 2001-2006.
143. Chautard D. Comparison of the Bard Trak™ Test with voided urine cytology in the diagnosis and follow-Up of bladder tumors. European urology 2000; 38(6): 686-690.
144. Dündar M., Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları. M Grup Matbaacılık A.Ş. 2016.
145. Bal SH, Budak F. Genomik, proteomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları."Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2013; 39(1): 65-69.
146. Gezici S. Kanser araştırmalarında proteomiks teknikler ve uygulamaları." Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 2018; 10(2): 54-61.
147. Srinivas PR. Proteomics for cancer biomarker discovery. Clinical chemistry 2002; 48(8): 1160-1169.
148. Linden M. Proteomic analysis of urinary bladder cancer: Aiming for novel biomarkers. Uppsala Üniversitesi, Doktora Tezi, İsveç, 2013 (Danışman: Makmström PU)

149. Aebersol R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422(6928): 198.
150. John R. Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry* 1998; 33(1): 1-19.
151. Horgan RP, Louise CK. Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician and Gynaecologist* 2011; 13(3): 189-195.
152. Lehninger AL. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2005.
153. Biberoglu G. Kütle spektrometresi ve tıp alanında kullanımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 2003; 23(6): 491-498.
154. Theodorescu D. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *The lancet oncology* 2006; 7(3): 230-240.
155. Schiffer E. Prediction of muscle-invasive bladder cancer using urinary proteomics. *Clinical cancer research* 2009; 15(5): 4935-4943.
156. Frantzi M. Development and validation of urine-based peptide biomarker panels for detecting bladder cancer in a multi-center study. *Clinical Cancer Research* 2016; 22(16): 4077-4086.
157. Shimizu Y. A multiplex immunoassay for the non-invasive detection of bladder cancer. *Journal of translational medicine* 2016; 141(1): 31.
158. Huang S. A nomogram derived by combination of demographic and biomarker data improves the noninvasive evaluation of patients at risk for bladder cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2016; 25(9): 1361-1366.
159. Rosser C. Urinary protein biomarker panel for the detection of recurrent bladder cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2014; 23(7): 1340-1345.
160. Goodison S. A multi-analyte assay for the non-invasive detection of bladder cancer. *PloS one* 2012; 7(10): e47469.
161. Urquidi V. CCL18 in a multiplex urine-based assay for the detection of bladder cancer. *PLoS One* 2012; 7(5): e37797.
162. Kim S. A simple electrochemical immunosensor platform for detection of Apolipoprotein A1 (Apo-A1) as a bladder cancer biomarker in urine. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2019; 27(8): 103-109.
163. Bansal N, Gupta A, Sankwar SN, Mahdi AA. Low-and high-grade bladder cancer appraisal via serum-based proteomics approach. *Clinica chimica acta* 2014; 436: 97-103.
164. Tyan YC. Urinary protein profiling by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: ADAM28 is overexpressed in bladder transitional cell carcinoma. *Rapid communications in mass spectrometry* 2011; 25(19): 2851-2862.

165. Shimwell NJ. Combined proteome and transcriptome analyses for the discovery of urinary biomarkers for urothelial carcinoma. *British journal of cancer* 2013; 108(9): 1854.
166. Taylor JM, Yaneva M, Velasco K, Philip J, Erdjument Bromage H, Ostrovnaya I, Aminopeptidase activities as prospective urinary biomarkers for bladder cancer. *Proteomics Clinical Applications* 2014; 8(5-6):317-26.
167. Barboro P. Differential proteomic analysis of nuclear matrix in muscle-invasive bladder cancer: potential to improve diagnosis and prognosis. *Analytical Cellular Pathology* 2008; 30(1): 13-26.
168. Chung H. Does phosphorylation of cofilin affect the progression of human bladder cancer? *BMC cancer* 2013; 13(1): 45.
169. Wu TT. Galectin-1 dysregulation independently predicts disease specific survival in bladder urothelial carcinoma. *The Journal of urology* 2015; 193(3): 1002-1008.
170. Chen CL. Comparative tissue proteomics of microdissected specimens reveals novel candidate biomarkers of bladder cancer. *Molecular and cellular proteomics* 2015; 14(9): 2466-2478.
171. Srinivasan H. Prediction of recurrence of non muscle-invasive bladder cancer by means of a protein signature identified by antibody microarray analyses. *Proteomics* 2014; 14(11): 1333-1342.
172. Wiśniewsk JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* 2009; 6(5): 359.
173. Turan T, Yıldırım A. Mesane Kanserinde pT1 Alt Tiplemenin Klinik Önemi *Ürolojik Onkoloji Bülteni* 2018; 2(1): 28- 90.
174. Reisz PA, Aaron AL, Sam SC. Management of High-grade T1 Urothelial Carcinoma. *Current urology reports* 2018; 19(12): 103.
175. Pereira B, Marc B, Raquel A. RNA-binding proteins in cancer: old players and new actors. *Trends in cancer* 2017; 3(7): 506-528.
176. Lai MD, Jing X. Ribosomal proteins and colorectal cancer. *Current genomics* 2007; 8(1): 43-49.
177. Tatar M, Tuğba T. Endoplazmik Retikulum Stresi ve İlişkili Hastalıklar. *Osmangazi Tıp Dergisi* 2018.
178. Çiftçi N. Oksidatif Stresin Kanserdeki Rolü: Antioksidanlar Kansere Progresyonunun Yakıtı Olabilir mi? *Ahi Evran Tıp Dergisi* 2017; 1(1): 8-13.
179. Kısaçam MA, Penbe S, Temizer O. Kansere Hücresinin Metabolik İhtiyaçları ve Bağımlılıkları. *Fırat Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*. 2017; 31(1): 67- 72.

180. Oh ES, Seiki M, Gotte M, Chung C. Cell adhesion in cancer. *International journal of cell biology* 2012.
181. Yamaguchi H, John C. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2007; 1173(3): 642-652.
182. Shen KH. Role of galectin-1 in urinary bladder urothelial carcinoma cell invasion through the JNK pathway. *Cancer science* 2016; 107(10): 1390-1398.
183. Wu TF. Galectin-1 dysregulation independently predicts disease specific survival in bladder urothelial carcinoma. *The Journal of urology* 2015; 193(3): 1002-1008.
184. Li CF. Proteomic identification of the galectin-1-involved molecular pathways in urinary bladder urothelial carcinoma." *International journal of molecular sciences* 2018; 19(4): 1242.
185. Liu Y. Galectin-9 as a prognostic and predictive biomarker in bladder urothelial carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2017; 35(6).
186. Gendy H. Galectin 3 for the diagnosis of bladder cancer. *Arab journal of urology* 2014; 12(2): 178-181.
187. Fang T. Modified citrus pectin inhibited bladder tumor growth through downregulation of galectin-3. *Acta pharmacologica Sinica* 2018; 39(12): 1885.
188. Canesin G, Peramato P, Palov J, Urrutia M, Cardo CC, Carbayo MS. Galectin-3 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome." *Tumor Biology* 2010; 31(4) 277-285.
189. Kramer MW. Decreased galectin-8 is a strong marker for recurrence in urothelial carcinoma of the bladder. *Urologia internationalis* 2011; 87(2): 143-150.
190. Gendy H, Madkour B, Abdelaty S, Essawy F, Kattab D, Hammam O, Nour HH. Diagnostic and prognostic significance of serum and tissue galectin 3 expression in patients with carcinoma of the bladder. *Current urology* 2013; 7(4): 185-190.
191. Yasar O. Significance of S100A8, S100A9 and calprotectin levels in bladder cancer. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2017; 77(6): 437-441.
192. Bansal N. Serum-based protein biomarkers of bladder cancer: A pre-and post-operative evaluation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2016; 124:22-25.
193. Ismail MF, Bodhdady NAE, Shabayek MI, Awida HA, Abozeed H. Evaluation and screening of mRNA S100A genes as serological biomarkers in different stages of bladder cancer in Egypt. *Tumor Biology* 2016; 37(4): 4621-4631.
194. Nishi M. Serum expression of S100A6 is a potential detection marker in patients with urothelial carcinoma in the urinary bladder. *Biomedical research* 2014; 35(6): 351-356.

195. Matsumoto K, Irie A, Satoh T, Ishii J, Iwabuchi K, Iwamura M, Egawa S, Baba S. Expression of S100A2 and S100A4 predicts for disease progression and patient survival in bladder cancer. *Urology* 2007; 70(3): 602-607.
196. Kim WT, Kim J, Yan C, Jeong P, Choi SY, Lee OJ, Chee YB, Yun SJ, Lee SC, Kim WJ. S100A9 and EGFR gene signatures predict disease progression in muscle invasive bladder cancer patients after chemotherapy. *Annals of Oncology* 2014; 25(5) 974-979.
197. Memon AA. Down-regulation of S100C is associated with bladder cancer progression and poor survival." *Clinical cancer research* 2005; 11(2): 606-611.
198. Li QQ. Proteomic analysis of proteome and histone post-translational modifications in heat shock protein 90 inhibition-mediated bladder cancer therapeutics. *Scientific reports* 2017; 7(1): 201.
199. Cavanaugh A. Combined inhibition of heat shock proteins 90 and 70 leads to simultaneous degradation of the oncogenic signaling proteins involved in muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget* 2015; 6(37): 39821.
200. Karkoulis PK, Dimitrios JS, Gerassimos EV. 17-DMAG induces heat shock protein 90 functional impairment in human bladder cancer cells: knocking down the hallmark traits of malignancy. *Tumor Biology* 2016; 37(5): 6861-6873.
201. Lee MS, Lee J, Lee S, Yoo SM, Kim JH, Kim WT, Kim WJ, Park J. Clinical, prognostic, and therapeutic significance of heat shock protein 27 in bladder cancer. *Oncotarget* 2018; 9(8): 7961.
202. Behnsawy HM. Small interfering RNA targeting heat shock protein 70 enhances chemosensitivity in human bladder cancer cells. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2013; 31(6).
203. Matsui Y, Hadaschik BA, Fazli L, Anderson RJ, Gleave ME, So AI. Intravesical combination treatment with antisense oligonucleotides targeting heat shock protein-27 and HTI-286 as a novel strategy for high-grade bladder cancer. *Molecular cancer therapeutics* 2009; 8(8): 2402-2411.
204. Prince T. Dual targeting of HSP70 does not induce the heat shock response and synergistically reduces cell viability in muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget* 2018; 9(66): 32702.
205. Syrigos KN. Clinical significance of heat shock protein-70 expression in bladder cancer. *Urology* 2003; 61(3): 677-680.

206. Dong F, Shen Y, Xu T, Wang X, Gao F, Zhang S, Chen S, Shen Z. Effectiveness of urine fibronectin as a non-invasive diagnostic biomarker in bladder cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *World journal of surgical oncology* 2018; 16(1) 61.
207. Gao F. CIP2A mediates fibronectin-induced bladder cancer cell proliferation by stabilizing β -catenin. *Experimental and Clinical Cancer Research* 2017; 36(1): 70.
208. Eissa S, Zohny SF, Zekri arn, Zayat TM, Maher AM. Diagnostic value of fibronectin and mutant p53 in the urine of patients with bladder cancer: impact on clinicopathological features and disease recurrence. *Medical Oncology* 2010;27(4): 1286-1294.
209. Marta SC. Evaluation of two new urinary tumor markers: bladder tumor fibronectin and cytokeratin 18 for the diagnosis of bladder cancer. *Clinical cancer research* 2000; 6(9): 3585-3594.
210. Tokgöz H. Necmettin AM. Kasa invaze olmayan mesane tümörlerinde BCG tedavisinin yeri. *Üroonkolji Bülteni* 2010;1: 14-21.

8. EKLER

Ek 1. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi (GEAH) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (2013-KAEK-64) Onayı.







9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tunay	Soyadı	Doğan
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	
Uyruğu	Türk	Telefon	
E-mail	tunaydogan94@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

KPDS	Yabancı Dil Sınav Notu								
	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE	Diğer

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer