



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA SAĞLIK UYGULAMA VE ARAşTIRMA MERKEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

İdari ve Eğitim Sorumlusu: Doç. Dr. Doğan YÜCEL

MESANE KANSERLİ HASTALARDA SERUM HYALÜRONİDAZ AKTİVİTESİ

Dr. Tuba Özgün

TIBBİ BİYOKİMYA UZMANLIK TEZİ

ANKARA
2018



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

İdari ve Eğitim Sorumlusu: Doç. Dr. Doğan YÜCEL

**MESANE KANSERLİ HASTALARDA SERUM
HYALÜRONİDAZ AKTİVİTESİ**

Dr. Tuba Özgün

Tez Danışmanı: Uzm. Dr. Elmas Ögüş

(TIBBİ BİYOKİMYA UZMANLIK TEZİ)

ANKARA
2018

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	ii
TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	20
BULGULAR	31
TARTIŞMA	56
SONUÇ VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	78
EKLER	79

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum, her konuda desteğini bizlerden hiç esirgemeyen, kapısı her daim herkese açık olan, yoğun çalışma programına rağmen tez çalışmam boyunca desteğini hiç eksik etmeyen ve tez çalışmam sırasında dikkat ve titizliği sayesinde çalışmamın verimliliğini ve motivasyonumu arttıran, mesleğini hakkıyla yapan, İdari ve Eğitim Sorumlumuz, kıymetli hocam Doç. Dr. Doğan Yücel'e,

Asistanlık eğitimim boyunca yakın ilgi ve desteğini hissettiğim, tezimin her aşamasında bilgisini ve emeğini esirgemeyen tez danışmanım, başasistanımız, sevgili ablam Uzm. Dr. Elmas Öğüş'e ,

Tez çalışmamda olduğu gibi, diğer konularda da değerli destek ve katkılarını benimle paylasan, kapısını rahatça çalabildiğim, bizimle gülüp bizimle ağlayan, başasistanımız, sevgili abim, Doç. Dr. Mehmet Şeneş'e,

Hastalarımı toplamaya başladığım dönemdeki Üroloji Kliniği şefi Prof. Dr. Ali Ayyıldız hocam başta olmak üzere yorulmadan özveriyle çalışan, Dr. Demirhan Örsan Demir, Dr. Yusuf Gökkurt ve servis hemşiresi Nursen Altay Çoknaz'a,

Bizleri kırmadan bölümümüze kadar gelip gönüllü istatistik kursu veren, tezimde kullandığım excel makrolarında olduğu gibi notlarını bizimle paylaşan güler yüzlü hocamız Prof. Dr. Muhittin A. Serdar'a,

İhtisas sürem boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Kübra Doğan, Dr. Cevdet Yılmaz, Dr. Serkan Bolat, Dr. Selin Yıldız ve 2017 yılı itibariyle bölümümde tanıdığım hepsi birbirinden güzel ve asistanlığımın son yılını çok güzel anıya dönüştüren asistan arkadaşlarımdan hepsine,

2012-2018 yılları arasında hastanem ya da bilimsel toplantılar da tanıdığım hocalarıma, uzman abla ve abilerime, tüm diğer asistan arkadaşlarıma,

Asistanlık sürem boyunca yardım ve güler yüzlerini esirgemeyen teknisyen arkadaşlara, iş ortağımız Detay Medikal'e, otomasyon ve bilgi sistemde görevli Alper Büyükkaygıncı'ya ve kliniğimizin personellerine,

Öncelikle hakları ödenmez olan, hayatımın her aşamasında bana her bakımdan destek olan annem, babam, abim ve yengeme;

Danıştığım ilk günden beri her konuda yanımda olan biricik eşim ve varlığıma anlam katan canım çocuklarıma,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

KISALTMALAR

CIS	: Karsinoma <i>In Situ</i>
DD-PUK	: Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom
DMA	: Düşük Molekül Ağırlıklı
DMP- PUN	: Düşük Malign Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplazi
EORTC	: Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Topluluğu
ESM	: Ekstraselüler Matriks
HA	: Hyalüronik Asit
HRP	: Horseradish Peroxidase
HYAL	: Hyalüronidaz
LOB	: Limit of Blank (Kör Sınırı)
LOD	: Limit of Detection (Saptama Sınırı)
LOQ	: Limit of Quantification (Ölçüm Sınırı)
LR	: Likelihood Ratio (Olabilirlik Oranları)
MK	: Mesane Kanseri
RHAMM	: Hyalüronan-Media Motilite Reseptörü
SEER	: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
TUR-M	: Trans Üretral Rezeksiyon- Mesane
UICC	: Union Internationale Contre le Cancer
USG	: Ultrasonografi
VK	: Varyasyon Katsayıları
YD-PUK	: Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom
YMA	: Yüksek Molekül Ağırlıklı

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Yüzeysel mesane kanserlerinde idrar belirteçlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması	8
Tablo 2. Mesane Kanserlerinin Sınıflandırılması	9
Tablo 3. Mesane ürotelyal karsinomlarında farklı histolojik derecelendirme sistemlerinin karşılaştırılması	10
Tablo 4. 2009 TNM evrelemesi	12
Tablo 5. Kontrol grubunun demografik özellikleri	21
Tablo 6. MK hastalarının demografik özellikleri	22
Tablo 7. EORTC risk sınıflandırmasına göre düşük, orta, yüksek riskli tümörler	23
Tablo 8. Hasta grubunun klinik evresi (TNM) ve histolojik (patolojik) evresinin birlikte değerlendirilmesi	23
Tablo 9. Serum ve plazma HYAL aktivitesi çalışma prosedürü	27
Tablo 10. MK ve normal bireyler arasındaki değişkenlerin karşılaştırılması	32
Tablo 11. MK ve kontrol gruplarındaki hastaların yaş ve cinsiyet dağılımları	32
Tablo 12. MK ve kontrol grubunun sigara içimi yönünden değerlendirilmesi	33
Tablo 13. Tüm grubunun sigara içimi yönünden değerlendirilmesi ve serum HYAL aktivitesi ile karşılaştırılması	34
Tablo 14. MK ve kontrol gruplarındaki serum HYAL aktivitesi	35
Tablo 15. MK ve kontrol gruplarındaki plazma HYAL aktivitesi	36
Tablo 16. MK ve kontrol gruplarındaki serum ve plazma HYAL aktivitesi.....	37
Tablo 17. Tüm gruplardaki serum HYAL aktivitesinin dekadlarla ilişkisi	43
Tablo 18. Tüm gruplar birleştirildiğinde 55 yaş altı ve üstü serum HYAL aktivitesi	44
Tablo 19. Tüm gruplar birleştirildiğinde cinsiyete göre serum HYAL aktivitesi	45
Tablo 20. MK ve kontrol grubunda erkekler değerlendirildiğinde serum HYAL aktivitesi	46
Tablo 21. Doğrusallık çalışmasında elde edilen HYAL aktivitesi ve seyreltme oranları	47
Tablo 22. HYAL düşük seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları	49
Tablo 23. HYAL düşük seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları	49
Tablo 24. HYAL orta seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçlar	50

Tablo 25. HYAL orta seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları	50
Tablo 26. HYAL yüksek seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları	51
Tablo 27. HYAL yüksek seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları	51
Tablo 28. HYAL geri kazanım çalışması	52
Tablo 29. HYAL kör okuma sınırı (LOB) belirleme çalışması	53
Tablo 30. Serum HYAL aktivitesinin (mU/L) ROC grafiğinin koordinatları (n = 86)	55



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. WHO 1973-2004 patolojik evrelemelerinin karşılaştırılması	11
Şekil 2. Katalitik mekanizmalarına göre HYAL türlerinin sınıflandırılması	17
Şekil 3: Hyalüronidaz ile hyalüronik asitin oluşturduğu tepkime	25
Şekil 4: Tüm gruplardaki sigara alışkanlığı ile serum HYAL aktivitesi arasındaki ilişki.....	34
Şekil 5. MK ve kontrol gruplarındaki serum HYAL aktivitesi	35
Şekil 6. MK ve kontrol gruplarındaki plazma HYAL aktivitesi	36
Şekil 7. Kontrol grubunun serum ve plazması HYAL aktivitesi	37
Şekil 8. MK hastalarında serum ve plazması HYAL aktivitesi	37
Şekil 9. TNM evresine göre MK'li hastaların serum HYAL aktivitesi	38
Şekil 10. Patolojik evresine göre MK'li hastaların serum HYAL aktivitesi	39
Şekil 11. Tümör boyutuna göre MK'li hastaların serum HYAL aktivitesi	40
Şekil 12. Tümörün tutulum sayısına göre MK'li hastaların serum HYAL aktivitesi	40
Şekil 13. EORTC risk skoruna göre serum HYAL aktivitesi	41
Şekil 14. Dekatlar ile serum HYAL aktivitesinin tüm gruplardaki ilişkisi	43
Şekil 15. Tüm gruplar birleştirildiğinde 55 yaş altı ve üstünün serum HYAL aktivitesi	44
Şekil 16. Tüm gruplar birleştirildiğinde cinsiyete göre serum HYAL aktivitesi	45
Şekil 17. Sadece erkeklere bakıldığında MK ve kontrol grubunda serum HYAL aktivitesi	46
Şekil 18. Doğruluk çalışması sonuçlarının Lineer regresyon grafiği ve denklemi	47
Şekil 19. NAG konsantrasyon-absorbans Lineer regresyon grafiği ve denklem	47
Şekil 20. HYAL düşük seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları	49

Şekil 21. Hyal orta seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları	50
Şekil 22. HYAL yüksek seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları	51
Şekil 23: Serum HYAL aktivitesinin (mU/L) ROC grafiği (n = 86; 43 MK, 43 kontrol hastası)	54
Şekil 24: Serum HYAL aktivitesinin (mU/L) ROC grafiği (n = 54; 16 MK, 38 kontrol hastası)	55



ÖZET

MESANE KANSERLİ HASTALARDA SERUM HYALÜRONİDAZ AKTİVİTESİ

Amaç: Mesane kanseri (MK), üriner sistemin en sık görülen malignansisidir. Hyalüronidaz (HYAL), ekstrasellüler matriksin yapısal bileşeninden biri olan hyalüronik asidi (HA) parçalar. Çalışmada amacımız MK ile HYAL aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmak ve serum HYAL aktivitesi ölçüm yönteminin klinik ve analitik performansını değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamız 43 MK hastası ve aynı semptomlara sahip ama MK tanısı almamış 43 kontrol hastasını içermektedir. Gruplarda yaş dağılımının eşitlenmesi için uç değerler atıldı. Sonuçta 39 MK hastası ve 38 kontrol grubu çalışmaya dahil edildi. MK'nin prognostik parametrelerle ilişkisi 43 MK hasta verisinden yapıldı. MK hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırması ise yaş ve cinsiyet bakımından eşleştirilmiş grupta yapıldı. Serum HYAL aktivitesi ölçümünde Morgan-Elson kolorimetrik tayin yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde HA, HYAL ile parçalanır, kromojen 1 ve 2 oluşur. Dimetilamino benzaldehit ayırıcının eklenmesi sonucu kromojen 3 meydana gelir. Oluşan renk değişikliği 585 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilir.

Bulgular: MK hastalarında serum HYAL aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik gösterdiği bulundu ($p < 0.05$). Serum HYAL aktivitesinin MK'nin klinik ve/veya patolojik evresi ile uyumlu olarak anlamlı artış gösterdiği saptandı ($p < 0.05$). Serum HYAL aktivitesi sigara içenlerde, içmeyenlere göre daha yüksekti ($p < 0.05$). Hasta ve kontrol gruplarını birleştirdiğimizde ($n = 86$), serum HYAL aktivitesinin 55 yaşın altında, 55 yaşından büyük olanlara göre fark olmadığı saptandı ($p > 0.05$). Ölçülen diğer parametrelerde anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).

Sonuç: Yöntemin klinik performansı MK hastalarının değerlendirilmesinde yararlı olabilir. Yöntem analitik performans açısından da yeterlidir.

Anahtar Kelimeler: Hyalüronidaz, Hyalüronik asit, Mesane kanseri

ABSTRACT

SERUM HYALURONIDASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER

Aim: Bladder cancer (BC) is the most common malignancy of the urinary system. Hyaluronidase (HYAL) degrades hyaluronic acid (HA), one of the structural components of the extracellular matrix. Our aim is to investigate the relationship between BC and HYAL activity and to evaluate the clinical and analytical performance of serum HYAL activity measurement method.

Materials and Methods: Our study consisted 43 BC patients and 43 control groups with the same symptoms but without BC. After the removal of outliers of the age data of the groups, remained 39 BC patients and 38 control patients in the study. The association between BC and prognostic parameters was obtained from 43 BC patient data. All parameters were compared between age- and sex matched MK and control groups. HYAL activity was measured by Morgan-Elson colorimetric method. In this method, HA is degraded with HYAL, chromogen 1 and 2 are formed. Addition of dimethylamino benzaldehyde solution was allowed to form chromogen 3. The resulting color change was measured spectrophotometrically at 585 nm.

Results: Serum HYAL activity in BC patients was found to be significantly higher than control group ($p < 0.05$). Serum HYAL activity was found to be significantly increased proportionally with the clinical and / or pathological stage of BC ($p < 0.05$). Serum HYAL activity was significantly higher in smokers than non-smokers ($p < 0.05$). When we combined the patient and control groups ($n = 86$), serum HYAL activity was no significant difference in participants younger than 55 years old than those older than 55 years old ($p > 0.05$). There was no significant difference in other parameters ($p > 0.05$).

Conclusion: The clinical performance of the method may be useful in the evaluation of BC patients. The method is also sufficient in terms of analytical performance characteristics.

Key Words: Hyaluronic acid, Hyaluronidase, Bladder cancer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri (MK), mesanedeki normal transizyonel hücrelerin malign fenotip kazanarak kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu oluşur (1). MK, üriner sistemin en sık görülen kanseri olmakla birlikte dünya çapında kansere bağlı ölümler arasında dokuzuncu sırada yer almaktadır (2). Batı ülkelerinde yapılan çalışmalara göre MK sıklık sıralamasında erkeklerde dördüncü sırada yer almakta ve tüm kanserlerin %5-10'unu oluşturmaktadır. Kadınlarda ise sıklık bakımından sekizinci sırada yer almakta ve tüm kanserlerin %4'ünü oluşturmaktadır (3). MK, sanayileşmenin artması ve insan ömrünün uzaması ile birlikte insidansı artan kanser türlerinden biridir. MK'nin, dünya çapında erkekler için 100.000'de 9 ve kadınlar için 100.000'de 2 iken Avrupa Birliği'nde bu oran, erkekte 27 ve kadınlarda 6 bulunmuştur. 2008 yılında, MK Avrupa'da kansere bağlı ölümlerin en sık sekizinci nedeni olmuştur (4). Türkiye'de ise MK, ülke genelinde ölüme neden olan hastalıklar arasında, 60 yaş üstü erkeklerde onuncu (%1.6), aynı yaş grubundaki kadınlarda ise on dokuzuncu (%0.4) sırada yer almaktadır (5).

Mukoza veya submukozaya sınırlı MK mevcut hastaların yaklaşık %75'ini oluşturur ve bunlara yüzeysel MK denir. Bu evrede olmayan MK'leri kas invaziv mesane tümörleri olarak isimlendirilmiştir. Yüzeysel mesane tümörlerinin yüksek prevalans ve düşük progresyona sahip olması uzun süreli sağkalım oluşturmaktadır. Kas invaziv MK olan hastalar kansere özgü mortalite açısından daha yüksek risk oluşturmaktadır (6). İlk tanı anında MK'nin %60-75'i yüzeysel, %30'u kas invaziv ve %15'inde metastaz saptanmasına rağmen, yüzeysel tümörler her zaman invaziv hale geçip yaşamı tehdit edebilecek duruma gelebilir (7).

Yüzeysel lezyonlar tedavi sonrası tekrarlama eğilimi gösterebilir. MK'nin oldukça agresif doğası sık takipleri zorunlu kılmaktadır (8). MK'li hastaların tanı ve takibinde kullanılan rutin yöntemler sistoskopi ve ultrasonografi (USG) eşliğinde şüpheli alan biyopsileridir. Sistoskopi ve biyopsi sayısını azaltmak, hastanın hayat kalitesini bozmamak için MK tanısında invaziv olmayan tanı yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (9-11).

Bir glikozaminoglikan olan hyalüronik asit (HA) fizyolojik özelliklerinin yanı sıra spesifik hücre yüzey reseptörlerine (CD44, hyaluronektin vb.) bağlanarak hücre

adezyon, migrasyon ve proliferasyonunda rol alır. HA, hidrate edilince genişler, tümör hücresinin migrasyonu için boşluklar oluşmasını sağlar. HA ile zenginleşmiş tümör matriksi içinde tümör hücresi, hücre yüzey reseptörlerini kullanarak göç eder. Ayrıca tümör hücrelerini çevreleyerek immün sistemden izole eder ve kemorezistan hale gelmelerini sağlar (12). HA'ın bir endoglikozidaz olan hyalüronidaz (HYAL) (bir glikozid hidrolaz ailesi (EC 3.2.1.35) tarafından parçalanması sonucu anjiyogenik özelliğe sahip küçük fragmanlar ortaya çıkmaktadır. HYAL, birçok hastalık ve kanserde doku, serum ve idrarda farklı düzeylerde tespit edilmiştir (13-16). HYAL tümör dokusu tarafından salgılanır ve HYAL seviyesi tümörün invaziv potansiyeli ile korelasyon gösterir (14, 15). Derece 2 (G2) ve Derece 3 (G3) MK'li hastaların idrarlarında HYAL seviyelerinin 3-7 kat arttığı gösterilmiştir (16).

Hyalüronidaz-1 (HYAL-1), MK'de salınan major HYAL'dır ve yüksek dereceli (G2, G3) MK'lerde güvenilir bir belirteçtir (17-19). HYAL-1; serum, plazma ve idrarda tespit edilebilir (20). Mesane ve prostat kanserlerinde HYAL-1 mRNA ekspresyonunun ve HYAL-1 aktivitesinin arttığı saptanmıştır (21-24).

Bu çalışmanın amacı; MK'de prognostik parametrelerle (tümörün klinik evresi, tümör boyutu, tümör sayısı, tümörün patolojik evresi) serum HYAL aktivitesi arasındaki ilişkiyi incelemektir. Ayrıca HYAL ölçüm yönteminin doğrusalılık, kesinlik, duyarlılık, saptama sınırı, geri kazanım gibi analitik performans özellikleri ile receiver operating curve (ROC) analizi, kesim değeri, duyarlılık, özgüllük, olabilirlik oranları (likelihood ratio) gibi klinik performans özelliklerini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MESANENİN EMBRİYOLOJİSİ, HİSTOLOJİSİ VE ANATOMİSİ

Embriyonel hayatın dördüncü ve yedinci haftaları arasında ürogenital septum, kloakayı anorektal kanal ve primitif ürogenital sinüs şeklinde böler. Kloakal membranın kendisi de, önde ürogenital membran, arkada anal membran kalacak şekilde ikiye bölünür. Primitif ürogenital sinüs üç kısımdan oluşmakta olup, üstte olan en büyük parçası mesanedir (25).

Mesane içten dışa sırasıyla epitelyal tabaka, lamina propria, muskularis propria ve adventisya tabakalarından oluşur. Epitelyal tabaka endodermal, diğer tabakalar splanknik mezenkim kökenden gelişir (25).

Mesane de biri muskularis mukozaya diğeri lamina propriaya yakın iki farklı kapiller sistem vardır. Mesane epitelinde kapiller sistem bulunmaz (26). Bu durum mesane tümörlerinde, lamina propria invazyonunun önemini göstermektedir.

Mesanenin posterior yüzeyi, kadınlarda uterus serviksi ve vajina üst kısmı ile komşudur. Erkeklerde, rektumla aralarında vezika seminalisler ve vas deferensin ampullaları bulunur.

Mesane tümörlerinde, mesaneye komşu anatomik yapıların (özellikle posterior yüzeyin komşuluğu) kansere tutulması prognozu etkilediğinden, mesanenin anatomik ilişkileri klinik açıdan önemlidir.

2.2. MESANE KANSERLERİ

2.2.1. Mesane Kanserinin Epidemiyolojisi, İnsidansı ve Prevalansı

MK, tüm dünyada görülen kanserlerin %3.2'sini oluşturan en sık görülen yedinci kanser olup, erkeklerde dördüncü, kadınlarda ise sekizinci sık görülen organ kanseridir (27). En yüksek insidans gelişmiş ülkelerde görülmekle birlikte, insidansı coğrafi bölgeler arasında değişiklik göstermektedir (2).

Türkiye'de ise, MK erkeklerde en sık görülen üçüncü kanserdir (28). Ülkemizde Kanser İzleme ve Denetim Merkezi tarafından İzmir bölgesinde yapılan kanser insidans ve epidemiyoloji çalışmasında MK insidansı erkeklerde %6.8 ile 2. sıklıktaki kanser

olarak bulunmuş; yine aynı çalışmada erkek: kadın insidans oranları 8.6: 1 olarak bulunmuştur (29).

MK çocukluk dönemi dahil her yaşta görülebilmektedir. Ancak genel olarak orta ve ileri yaşların hastalığıdır. MK'nin tanı yaşı erkeklerde ortalama 69, kadınlarda ise 71'dir. Ayrıca MK insidansı yaşla birlikte artış gösterir. Amerikan verilerine göre 60-69 yaş arası erkeklerde ve kadınlarda sırası ile invaziv MK görülme olasılığı %0.26 ile %0.96 iken; 70 yaş üzeri erkek ve kadınlarda oranlar sırası ile %0.96 ile %3.41'dir (30).

Bir kanserin mortalite oranı, o kansere bağlı olarak 100.000 kişide o yıl içinde gerçekleşen ölümlerin sayısıdır. ABD'de 2015 yılı için tahmini yeni vaka sayısı 74.000 ve MK'den öleceği öngörülen muhtemel vaka sayısı 16.000'dir. Yaşlılardaki mortalite oranı daha yüksektir. Örneğin; Amerika'da hastalığa bağlı ölüm oranı 65-69 yaşları arası erkeklerde %14, kadınlarda %18 iken, 80-85 yaşları arasındaki erkeklerde %30; kadınlarda %37'dir. SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program)'e göre MK'nin beş yıllık yaşam beklentisi %79'dur (31).

Tanı anında vakaların %35'i lokalize evrede yakalanır ve %98'i epitelyal kaynaklıdır ve bunların da %90'ı ürotelyal (transizyonel) karsinomlardır. Yeni tanı almış vakaların %70-80'i non-invaziv veya erken invazivdir. Non-invaziv vakalar %50-70 oranında rekürrens ve %5 oranında kas invaziv hastalığa progresyon gösterir. Bu nedenle ömür boyu takip, çok sayıda endoskopik rezeksiyon ve intravezikal tedavi gerektirdikleri için, dünyada tüm kanserler içinde hasta başına maliyeti en yüksek kanserlerden biridir (32).

2.2.2. Mesane Kanserinin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

MK'nin etiyojisine yönelik ilk tanımlamalar ve gözlemler 19. yüzyılın sonlarında sanayileşmenin artmasıyla ortaya çıkmıştır. Ağır çalışma şartlarının yanı sıra sanayileşme ile birlikte, bazı iş kollarında kimyasallara yoğun maruziyet ve bu dönemde vakaların artması endüstriyel kimyasallara olan ilgiyi ön plana çıkarmıştır. Buradan yola çıkarak MK ile ilişkili tanımlanmış ilk etiyojik faktör boya sanayisinde kullanılan anilindir. Yirminci yüzyıla birlikte sigara kullanımının artması ve zamanla tütündeki toksik maddelerin onkojenik etkilerinin daha açık bir şekilde tanımlanması ile günümüzde tütün ve tütün mamülleri MK etiyojisinde en önemli faktör olarak tanımlanmıştır. Bunların dışında MK'nin gelişimi ve progresyonuna yol açan birçok

faktör bulunmaktadır. Bunları; hayat tarzı ile ilişkili faktörler, ilaçlar, çevresel faktörler, mesleki maruziyet ile ilişkili faktörler, tıbbi özegeçmiş, herediter ve enfeksiyonlarla ilişkili faktörler olarak sıralayabiliriz.

2.2.3. Mesane Kanserinin Semptomları

MK'nin en sık görülen semptomu ağrsız hematüri olup, hastaların %85'inde görülür (33). Hematüri, gros (makroskobik) veya mikroskobik olabilir. Mikroskobik hematüri hemen hemen bütün hastalarda mevcuttur. İleri yaştaki ve özellikle erkek hastalarda ağrsız gros hematüri öncelikle akla MK'yi getirmelidir.

Bazı hastalar irritatif mesane semptomları ile gelebilir. Bunlar sık idrara çıkma, acil işeme hissi ve dizüri gibi semptomlardır. İrritatif mesane semptomları ikinci en sık görülen geliş şeklidir ve hastaların %20'sinde gözlenir. Bu semptomların varlığı karsinoma in situ (CIS) ya da invazif MK'yi düşündürür (34).

Üreteral obstrüksiyona bağı şiddetli böğür ağrsı ve akut piyelonefrit, üşüme titreme görülebilir. Diğer semptomlar ise pelvik kitle ve lenfatik obstrüksiyona bağı olarak görülen lenfödemdir (35).

Çok nadir olarak da hastalar başvuru anında ilerlemiş hastalık belirtileri olan kilo kaybı, abdominal ağrı ya da kemik ağrsı ile başvurabilirler.

2.2.4. Mesane Kanserinin Tanısı

Makroskobik hematüri ve ürotelyal tümör şüphesinde standart görüntüleme çalışması eskiden ekskretuar ürografi iken günümüzde USG gibi kesitsel yöntemlere dönüşmüştür. Mesane tümöründe standart değerlendirme yöntemleri sistoskopi ve biyopsi olmasına rağmen kesin evreleme ve tedavi planı için görüntüleme yöntemleri önemlidir. Mesanede ki yüzeysel tümörleri saptamak zor olduğundan radyolojik olarak evrelendirmeleri zor olabilir. Bununla birlikte invaziv ürotelyal tümörlerde pelvik yan duvar invazyonunun olması ya da lenfadenopatinin saptanması kritiktir ve bu hastaların klinik olarak evrelenmesi tek başına yeterli olmadığından radyolojik görüntüleme yöntemlerine başvurulması gerekmektedir.

2.2.5. Mesane Kansesinde Tümör Belirteçleri

Tümör belirteçlerinin kullanım amacı MK tedavisinde ve izleminde yarar sağlayarak sağkalımı arttırmaktır. Tümör belirtecinin klinik yararı prospektif,

randomize kontrollu çalışmalar ile kanıtlanabilir. MK'ye yönelik böyle bir biyobelirteç henüz tanımlanmamıştır. Bugün MK'nin noninvaziv bir fizik muayene yöntemi yoktur. Henüz MK için prostat kanseri tarama ve takibinde kullanılan prostat spesifik antijen gibi bir biyobelirteç de yoktur. MK'lerin genel olarak gros hematüri ile erken belirti vermesi erken tespit açısından yararlıdır. Ancak risk gruplarında, gerek aile hikayesi olanlarda gerekse uzun yıllar sigara içenlerde tarama yapılabilir. Bunun için en faydalı ve noninvazif olan testler tam idrar tetkiki ve sitolojidir.

MK'leri noninvaziv yoldan tespit etmek amacıyla idrara salgılanan protein ve dökülen hücreleri inceleyen çeşitli idrar belirteçleri vardır. Bu testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü aktif tümörü olmayan ancak rekürrens için takip edilen hastalar ile düşük dereceli kanserli hastalarda daha düşük bulunmuştur (36). Viriesema ve ark., idrar belirteçlerinin sistoskopinin yerini alabilmesi için en az %90 duyarlılığa sahip olması gerektiğini bildirmiştir. (37). Günümüzde mevcut idrar belirteçlerinden hiçbiri %95 güven aralığında %90 duyarlılığı karşılamamaktadır. Tablo 1'de idrarda bakılan belirteçlerin duyarlılık ve özgüllükleri gösterilmiştir.

MK için kullanılan veya kullanılma potansiyeli olan tümör belirteçleri aşağıda verilmektedir.

İdrar sitolojisi:

Üriner sitoloji, diğer tanı yöntemlerine göre daha ucuz ve invaziv olmayan bir yöntemdir. İdrar sedimenti ya da mesane yıkamasının mikroskopik incelenmesi ile malign ürotelyal hücreler görülebilir. Bununla birlikte idrar sitolojisi yüksek dereceli tümörü olan hastalarda bile %20 oranında yanlış negatif sonuç verebilmektedir. Ürotelyal atipi, enflamasyon, pelvik radyoterapi ya da kemoterapiye bağlı değişiklikler idrar sitolojisini değerlendirirken yanlış pozitifliğe neden olabilir (38).

Mesane tümör antijeni (BTA):

Bu test kompleman faktör H ile ilişkili proteini belirler. Hasta başı test olarak kullanılan formları geliştirilmiştir (39). İnvaziv tedavi, enfeksiyon ve taş yanlış pozitif sonuca neden olabilir.

Nüklear matriks proteinleri (NMP):

Mitoz bölünme esnasında hücre çekirdeğinin şeklini korumada görevli nükleer matriks proteinidir. Mitoz bölünmenin sık gerçekleştiği epitelyal hücrelerde ve agresif olarak hızlı çoğalan tümör hücrelerinde yaygın bulunur. MK, çoğunlukla üroepitel kaynaklıdır ve NMP'nin hastaların idrarında sağlıklı bireylere göre 20 kat fazla bulunduğu gösterilmiştir (40). İmmünokimyasal tekniklerle ölçülebilmektedir. Aktif üriner sistem enfeksiyonunda, böbrek taşında, benign prostat hiperplazisinde, ve gross hematüride yalancı pozitif sonuçlar vermesi testin duyarlılığını düşürür (41).

Floresan in situ hibridizasyon (FISH):

Tümör hücrelerinin intranükleer kromozamlara bağlanan floresan olarak işaretli DNA problemleri ile boyanarak tespit edilmesine yönelik bir tekniktir. İdrara dökülen MK hücreleri floresan ile boyanır ve floresan mikroskopisi ile incelenir. Anöploidili hücrelerin sayısının %10-20'den fazla olması durumunda FISH testi pozitif kabul edilir. MK rekürrensini izlenmesinde FDA onayı almış olmasına rağmen, MK tanısı için anöploidili hücre sayısının kaç olması gerektiği tartışılmaktadır. FISH testinin temeli kromozomal anomoliliğe dayandığından inflamatuvar hücre ile malign hücre ayrımını çok güzel değerlendirir (42).

Survivin:

Apopitozu inhibe ederek hücrenin ömrünü uzatan bir proteindir. FISH tekniği kullanılarak saptanabilir.

Urovisin:

FISH testinde olduğu gibi kromozom anöploidi ve tümör süpresör 9p21 gen lokusunun kaybını saptamaya yöneliktir. FISH testinden farkı, ölçüm mekanizmasının hibridizasyon yöntemine dayanmasıdır.

Telomeraz:

Kromozomların uçlarında bulunan telomerleri onaran bir enzimdir. Normalde her hücre siklusundan sonra telomerin boyu kısılır ve hücre ölüme doğru giderken, telomeraz hücrenin ölmesini engellemek için yıkılan telomerlerdeki DNA'ları tamir

eder. Normal hücrelerde telomeraz inaktif iken kanserli hücrelerde aktivitesi artmaktadır. Telomeraz aktivitesi moleküler tanı yöntemleriyle (PCR, RT-PCR) saptanmaktadır.

Sitokeratinler:

Epitel hücrelerinin iskeletini oluşturan hücre içi proteinlerdir. Dolayısıyla epitel hücre farklılaşmasını gösteren belirteçlerdendir. Mesane epitelinin idrara dökülmesi sonucunda idrarda yüksek saptanabilir. Sitokeratin tespit yöntemi, PCR ile mRNA ekspresyonunun belirlenmesine dayanmaktadır.

Fibrin yıkım ürünleri:

Kanserli hücrelerde damar duvarı geçirgenliği normal hücrelere oranla artmıştır. Bu geçirgenlik artışı, plazminojen ve fibrinogen gibi hücre içi proteinlerin idrara geçmesini sağlar. Ayrıca fibrini yıkan enzimlerden ürokinaz da idrarda bulunur. Ürokinazın görevi, plazminojeni aktif formu olan plazmine dönüştürmektir. Plazmin, fibrin ve fibrin yıkım ürünlerini parçalar. Fibrin yıkım ürünleri lateks-aglütinasyon analizi ile idrarda kalitatif olarak tespit edilebilir (43).

Tablo 1. Yüzeysel mesane kanserlerinde idrar belirteçlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması - Van Rhijn BW. et al'den.

Belirteç	Medyan Duyarlılık	Aralık(min. %- maks%)	Medyan Özgüllük	Aralık(min. %- maks%)
Sitoloji	48	31-100	94	62-100
BTA	50	28-80	86	66-95
BTA stat	70	24-89	75	52-93
BTA TRAK	69	57-79	65	48-95
NMP-22	73	47-100	80	56-95
Telomeraz	75	7-100	86	24-93
Sitokretin-20	91	82-96	84	67-97
FISH	84	73-92	95	92-100

2.3.6. Mesane Kanserinin Sınıflandırılması

MK'leri mesaneyi oluşturan tüm katlardan gelişebilir. Genel olarak epitelyal ve nonepitelyal (mezenkimal) olarak sınıflandırılırlar ve %95'i epitelyal kökenlidir. Tablo 2'de mesanede görülen epitelyal ve mezenkimal tümörler gösterilmektedir.

2.3.7. Mesane Kanserinin Patolojik (Histolojik) Evrelendirmesi

Histolojik derece, MK'de en önemli prognostik faktördür (44). Histolojik derecelendirme nispeten sübjektiftir ve aynı patoloğun dahi aynı tümörü farklı zamanlarda farklı derecelendirebilmesi olasıdır. Bu nedenle ürotelyal karsinomların derecelendirilmesinde, subjektiviteyi azaltmayı amaçlayan ve nispeten metrik verilere dayandırılan çeşitli derecelendirme sistemleri önerilmiştir (45).

Tablo 2. Mesane kanserlerinin sınıflandırılması - European Association of Urology Guidelines 2016 edition'dan.

EPİTELYAL TÜMÖRLER	MEZENKİMAL TÜMÖRLER
Benign Tümörler	Benign Tümörler
Papilloma Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal tümör	Leiomyom Paragangliyom Plazmositom Hemanjiom Soliter fibröz tümör Nörofibrom Lipom
Malign Tümörler	Malign Tümörler
Ürotelyal karsinom Skvamöz hücreli karsinom Adenokarsinom Küçük hücreli karsinom metastazları Nöroendokrin karsinom metastazları Karsinoid melanom	Rabdomyosarkom Leiomyosarkom Lenfoma Osteosarkom Anjiosarkom Malign fibröz histiosarkom

WHO, 1973 yılında, transizyonel hücreli tümörleri hücrel atipi oranına göre üç derecede toplamıştır. Bu sistem, geniş çaplı kabul gören ilk sınıflama olmuştur (46).

WHO/ISUP 1998 sınıflama sistemine göre, papiller ürotelyal tümörler; DMP-PUN (Düşük Malign Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplazi), DD-PUK (Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom) ve YD-PUK (Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom) olmak üzere üç alt grupta toplanmıştır. Bu sınıflamaya yönelik, yeterince kuvvetli veriler ile desteklenmediğine yönelik eleştiriler üzerine, 1999'da WHO/ISUP konsensus çalışması tekrar gerçekleşmiş ve papiller ürotelyal tümörler için; DMP-PUN, derece 1, derece 2 ve derece 3 alt sınıflarından oluşan sınıflama sistemi kabul edilmiştir.

Cheng ve arkadaşları, 2012 yılında dört aşamalı bir derecelendirme önermişlerdir. Bu öneriye göre, invaziv olmayan papiller ürotelyal karsinomlar dört kategoriye ayrılmaktadır: Derece 1 ürotelyal karsinom (düşük derece), derece 2 ürotelyal karsinom (düşük derece), derece 3 ürotelyal karsinom (yüksek derece) ve derece 4 ürotelyal karsinom (yüksek derece). DMP-PUN, bu dörtlü sınıflama içerisinde grade 1 (düşük dereceli) ürotelyal karsinom olarak tanımlanmıştır (47). Farklı yıllarda yapılan ve yaygın kullanılan MK'nin histolojik sınıflandırması tablo 3'te gösterildi.

Tablo 3. Mesane ürotelyal karsinomlarında farklı histolojik derecelendirme sistemlerinin karşılaştırılması - European Association of Urology Guidelines 2016 edition'dan.

1973 WHO	1998 WHO/ISUP	1999 WHO	2004 WHO	2012 Cheng ve Ark.
Papillom	Papillom	Papillom	Papillom	Papillom
Derece 1	DMP-PUN	DMP-PUN	DMP-PUN	Derece 1
Derece 2	Düşük Derece	Derece 1 Derece 2	Düşük Derece	Derece 2 (Düşük Derece) Derece 3 (Yüksek Derece)
Derece 3	Yüksek Derece	Derece 3	Yüksek Derece	Derece 4 (Yüksek Derece)



Şekil 1. WHO 1973-2004 patolojik evrelemelerinin karşılaştırılması – European Association of Urology Guidelines 2016 edition’ dan.

Tablo 4. 2009 TNM evrelemesi - European Association of Urology Guidelines 2016 edition’ dan.

T-Primer Tümör
Ta: İnvaziv olmayan papiller karsinom CIS: Karsinoma in situ T1: Tümör subepitelyal bağ dokuya invaze T2: Tümör kas dokusuna invaze T2a: Yüzeysel kas dokusu (iç yarı) T2b: Derin kas dokusu (dış yarı) T3: Tümör perivezikal dokuya invaze T3a: Mikroskopik olarak T3b: Makroskopik olarak T4: Tümör aşağıdakilerden herhangi birine invaze T4a: Prostat-uterus-vajina T4b: Pelvik duvar-abdominal duvar
N: Lenf Nodülleri
Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok N1: Pelviste tek lenf nodu metastazı var N2: Pelviste birden çok lenf nodu metastazı var N3: Ortak iliak lenf nodlarına metastaz
M: Metastaz
M0: Uzak metastaz yok M1: Uzak metastaz var

2.3.8. Mesane Kanserinin Klinik Evrelemesi

Tedavi ve prognozun değerlendirilmesinde evreleme önemli bir yer tutmaktadır (26). Evreleme hem homojen hasta popülasyonundan oluşan klinik çalışmaların dizayn edilmesini, hem de farklı merkezlerden elde edilen klinik ve patolojik bulguların karşılaştırılmasını mümkün kılar (48).

MK'lerde evreleme, tümörün invazyon yapıp yapmamasına ve bu invazyonun derinliğine göre belirlenir (49). "Union Internationale Contre le Cancer" (UICC) tarafından uygun bulunan ve genel olarak kabul gören 2002 TNM evrelemesi, 2009'da güncellenmiştir ve tablo 4'te gösterildi. Bu güncelleme lenf nodu tutulumu, lokalizasyon ve tek/multiple tutulumu temelinde yeniden şekillenmiştir (50).

2.4. HYALÜRONİK ASİT

Hyalüronat, hyalüronan olarak da bilinen HA yüksek molekül ağırlıklı, non sülfate (sülfatsız), lineer, dalsız bir glikozaminoglikandır (51). HA; Karl Meyer ve John Palmer tarafından, 1934 yılında ilk olarak sığır gözünün vitröz humorundan izole edilmiş ve adını yunanca camsı anlamına gelen hyaloid ve yapısında bulunan üronik asit kelimelerinden almıştır (52). Takip eden yıllarda HA hem çeşitli ökaryot yapılarından hem de prokaryotlardan izole edilmiştir. Biyokimya literatüründe vücutta mevcut olduğu polianyonik formunu ifade etmek için 'hyalüronan' terimi tercih edilir (53). HA, sodyum tuzu olan sodyum hyalüronat adıyla ticari olarak da mevcuttur. Bununla beraber genel olarak hyalüronan, sodyum hyalüronat ve HA literatürde aynı anlamı ifade etmek için kullanılır.

Glikozaminoglikan ailesinin bir üyesi olan hyalüronan, birbirine glikozidik bağlarla bağlı olan β -1,3-N-asetil-glukozamin ve β -1,4-D-glukronik asit moleküllerinden oluşan bir makromoleküldür (54,55).

HA'nın, diğer glikozaminoglikan üyelerden bazı farkları vardır (56). Bu farkları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

1) HA çok uzun bir zincir yapısına sahiptir. 25 000 kez kadar tekrar edebilen disakkarit birimi ile vücutta oldukça büyük boyutlarda bulunabilir. Değişik uzunluklarda olabilen bu polimer, yüksek molekül ağırlıklı (YMA) hyalüronan zinciri

ve YMA zincirin değişik boyutlarda parçalanmasıyla düşük molekül ağırlıklı (DMA) fragmanlara ayrılır (56-57).

2) Bir protein çekirdeğe bağlanma göstermediğinden proteoglikan yapısı oluşturmaz.

3) Sülfat grubu içermez.

4) Diğer glukozaminoglikanlar Golgi cisimciğinde sentezlenirken HA, plazma membranının sitoplazmasında sentezlenir (58).

2.4.1. Hyalüronik Asidin Sentezi

Vücutta hemen hemen bütün hücreler tarafından sentezlenmesine rağmen HA'nın sentezlenmesinde rol alan en önemli hücreler fibroblastlar, kondrositler, sinoviyal hücreler ve karaciğer hücreleri gibi mezenşimal hücrelerdir (59). Hücre membranının iç kısmında yer alan hyalüronan sentaz (HAS) olarak adlandırılan enzimler tarafından üretilir. Sentezlenen HA, hücre zarındaki por benzeri yapılardan ekstraselüler matrikse (ESM)'e salınır (54,60-62).

2.4.2. Hyalüronik Asidin Bulunduğu Doku ve Organlar

Vücutta her yerde dağılmış olmasına rağmen en yüksek oranda tüm dokularda ESM'de bulunan diğer glikozaminoglikanlar ile beraber ESM'nin temel zemin maddesini oluşturur ve tüm türlerde aynı, basit kimyasal yapıya sahiptir (56). Ayrıca periselüler ve intraselüler alanlarda da mevcuttur (63-64).

Ortalama 70 kiloda olan bir yetişkinin vücudunda yaklaşık 15 g HA vardır. Yapılan çalışmalarda tüm HA'nın yaklaşık olarak yarısının deride, ¼'lük kısmının da iskelet ve eklemlerde olduğu, geri kalanının ise kaslar ve iç organlara eşit miktarlarda dağılmış olarak bulunduğu gösterilmiştir. En yüksek HA derişimi göbek bağı, sinoviyal sıvı, deri ve vitreus cisimciği gibi bağ dokularında bulunur. Akciğer, böbrek, beyin ve kaslarda da kayde değer miktarlarda bulunurken karaciğerde az oranda bulunur. En düşük derişim kan serumunda olmasına rağmen siroz, romatoid artrit, skleroderma gibi enflamatuvar hastalıklarda ve çeşitli kanser türlerinde serum HA seviyelerinde patolojik artışlar olabilmektedir (64- 66).

2.4.3. Hyalüronik Asidin Fizyolojik Önemi ve Fonksiyonu

HA'nın molekül ağırlığı farklı doku ve sıvılarda 1×10^5 ile 10^7 Da arasında değişiklik göstermektedir. Bu farklı moleküler ağırlık sayesinde HA bazı makromoleküller için filtre olarak görev yaparken aynı zamanda hücre yüzey proteinlerine ve diğer matriks proteinlerine bağlanabilmektedir.

Hacminin 1000 katı kadar su bağlama kapasitesi sayesinde aşırı derecede hidrofilik özelliği olan HA, su bağladıkça viskoelastik özellik kazanır ve jelimsi bir hal alır. Sahip olduğu bu benzersiz reolojik özelliği moleküle lubrikasyon özelliği de kazandırır (54). Şok emici ve lubrikasyon sağlama özelliklerinin yanı sıra polimere oranla 1000 kat daha fazla su tutabilmesiyle HA; dermisin hacmini ve esnekliğini artırır (53, 54). ESM'nin ve periselüler ortamın yapısal bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur, vitröz humorda ise su bağlayarak kazandığı geniş hacim ve yoğun kıvam, yüzey doldurucu özelliği sağlamaktadır (57).

HA, sadece hücresel davranışlarda ve ESM bütünlüğünü sağlamada değil hücrelerin korunmasında da etkili bir moleküldür. Viral ve bakteriyel etkenlere karşı hücreleri koruduğu gözlenmiştir (56). Bunun dışında kartilaj gelişiminde, sinoviyal sıvının devamlılığında ve yara iyileşmesinde önemli rolü vardır (55).

HA, hücre yüzeyinde yer alan bir takım hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimini sağlayarak ve hücre içi reaksiyonları tetikleyerek fonksiyonları düzenler (57). HA için spesifik olan CD44, Toll-4, hyalüronan-media motilite reseptörü (RHAMM), lenfatik damar endotelial HA reseptörü-1, endositoz için hyalüronan reseptörü, ve layilin gibi çeşitli hücre yüzey reseptörleri tanımlanmıştır. Bu reseptörler içinde en fazla bilinenleri ise CD44 ve RHAMM'dır.

HA aynı zamanda aktif bir sinyal moleküldür. Hücrelerin; proliferasyonu, apoptozu, migrasyonu, diferansiyasyonu ve morfogenezi için ideal ortam oluşturur. Hücrelerde migrasyon ve proliferasyon gibi fonksiyonları özel membran proteinleri veya hyaladherin olarak adlandırılan özel proteinler ile gerçekleştirir (65, 67). Dokular arasında molekül transportunu kolaylaştırır, molekül ağırlığı yüksek olan proteinlerin dağılımını ve ozmotik basıncı dengeler (56-57, 67).

HA ve fragmanlarının tümör gelişiminde de önemli görevleri vardır. Sağlıklı epitel doku ile tümör gelişiminin görüldüğü epitel doku arasında HA yoğunluğu ve

molekül ağırlığı açısından ciddi fark olduğu görülmüştür. Ortamda HYAL enzimlerinin artması molekülün fragmanlarının artması anlamına gelir. Bu fragmaların artması tümör gelişimini tetikler ve artmış HA fragmanlarının anjiyojenik etkisi tümör metastazının gerçekleşmesinde rol alır (62).

HA'nın eksikliği ise özellikle yoğun ve molekül ağırlığı yüksek olarak bulunduğu dokularda, fonksiyon kaybına ve yapısal dejenerasyona neden olur.

Özetleyecek olursak, önceleri HA ekstrasellüler matriksin pasif, yapısal bir bileşeni olarak düşünülmeyle birlikte, günümüzde hücre migrasyonu ve morfogenezinin de içinde bulunduğu bazı biyolojik olaylarda dinamik olarak yer aldığı bilinmektedir. HA aktif hücre büyüme bölgelerinde lokalize olan spesifik reseptörlere de bağlanabilmektedir. Bu reseptörlerin, hücre siklusunun ayrılma periyoduyla ilişkili olduğu ve bölünmeyen hücrelerde hiç bulunmadığı bilinmektedir. Matriks polisakkariti olan HA hücre farklılaşması, motilitesi ve hücrelerin adherensi (bağlanması) üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir.

2.4.4. Hyalüronik Asidin Metabolizması

HA, HYAL adı verilen enzimler tarafından parçalanır. HYAL enzim grubunda HYAL1, HYAL2, HYAL3, P1 ve PH20 gibi çeşitli üyeler mevcuttur (57). Her bir enzim farklı molekül ağırlığına sahip HA'nın farklı bölgelerde yıkılmasında rol alır. HYAL enzimleri ile HA, DMA oligosakkarit birimlerine parçalanır. Tetrasakkarit seviyesinde parçalanan HA lizozomda bulunan β -glukuronidaz ve β -N-asetil-glukozaminidaz enzimleri vasıtasıyla en küçük (monosakkarit) birimine ayrılır (54).

Lokal metabolizma ile HA yıkımının %20-30 kadarı deri ve eklemlerde, geri kalanı ise lenfatik yolla olmaktadır. Kan dolaşımına ulaşan HA'nın yaklaşık %85-90'ı hepatik sinüsoidal hücrelerde katabolizmaya uğratılır. Böbreklerde yaklaşık %10 kadarı elimine edilir. Bununla birlikte, yalnızca %1-2 kadarı idrarla birlikte atılır.

2.5. HYALÜRONİDAZLAR (HYAL)

1941 yılında, Karl Meyer tarafından HA'yı parçalamasından dolayı enzime HYAL ismi verilmiştir (68).

Bunu izleyen yıllarda HYAL'lar çok sayıda dokularda ve organizmalarda tespit edildi. Örneğin bunlar bazı bakteriler (bakteriyofaj-bakteriyel), patojenik mantarlar

(Candida, Streptomisisler) ve omurgasız hayvanlardır (kabuklular, böcekler). Omurgalılarıdaki HYAL'lar kertenkele ve yılan zehrinde, testislerde, karaciğer, böbrek ve lenfatik sistem gibi çeşitli somatik dokularda bulunmaktadır. İzole edilmiş enzimlerin moleküler kütlesi, substrat spesifikliğı, optimum pH'sı ve substrat bozunum mekanizmaları farklıdır (69-71).

2.5.1 Hyalüronidazların Sınıflandırılması

HYAL'lar için ilk sınıflandırma şeması Karl Meyer tarafından 1971 yılında kurulmuştur. Katalitik mekanizmalarına göre HYAL türleri üç ana aileye ayrılmaktadır.

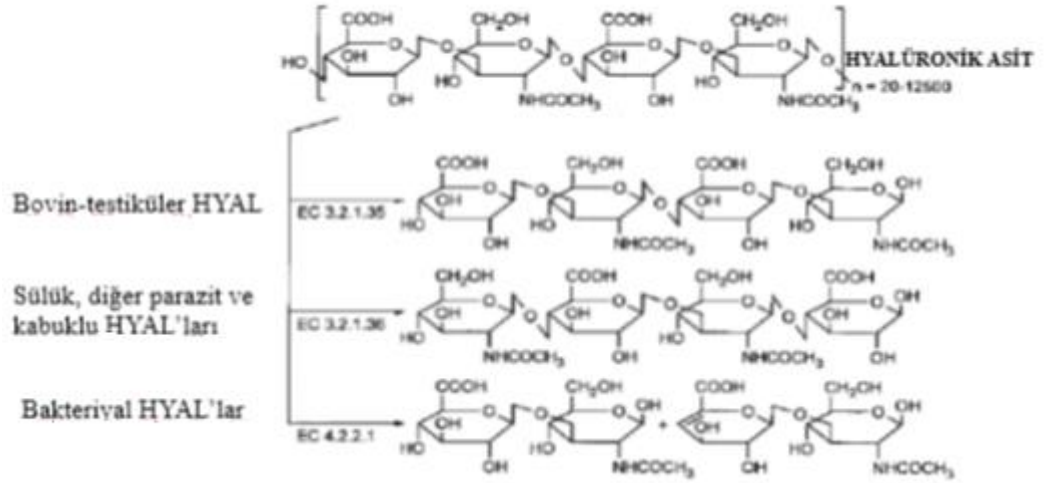
- 1) Memeli HYAL'ları (EC 3.2.1.35)
- 2) Bakteriyal HYAL'lar (EC 4.2.2.1)
- 3) Sülük, diğer parazit ve kabuklu HYAL'ları (EC 3.2.1.36)

Meyer tarafından kurulan HYAL'ların sınıflandırılması enzimler ve tepkime ürünlerinin biyokimyasal analizine dayanıyordu (72). Moleküler genetik analizi, alternatif olarak, HYAL'ların amino asit dizisi homolojisine göre iki ana grup altında ökaryotlar ve prokaryotlar olarak toplanabilirliğini göstermiştir.

Ökaryot hyalüronidazları:

Memeli Hyalüronidazları (EC 3.2.1.35):

Son yıllarda, insan genomunda birbirine yaklaşık %40 benzer kimliğe sahip altı HYAL gen dizisi, tespit edilmiştir. Üç gen (*HYAL1*, *HYAL2* ve *HYAL3*) 3p21.3 kromozomu üzerinde Hyal-1, Hyal-2 ve Hyal-3 enzimlerini kodlarlar. Diğer iki gen (*HYAL4* and *PH20 (SPAM1)*), Hyal-4 ve PH-20'yi kodlamak için ve psödogen (yalancı sözde gen) olarak ifade edilen (*HYALP1*) benzer şekilde 7q31.3 kromozomu üzerinde yer alırlar.



Şekil 2. Katalitik mekanizmalarına göre HYAL türlerinin sınıflandırılması - Muckensnabel I. et al'den.

Hyalüronidaz-1 (HYAL-1):

HYAL-1 ilk kez insan plazmasından izole edilmiştir. HYAL-1 memeli HYAL'larının içinde baskın olan HYAL'dir ve plazmada, idrarda, yüksek miktarda karaciğerde, böbreklerde, dalakta ve kalpte bulunmaktadır. HYAL-1 enzimi lizozomlarda lokalizedir ve asidik pH'larda aktiftir (73).

2.6. KANSER VE HYALÜRONİDAZLAR

HYAL'lar, HA metabolizmasında düzenleyici işlevlerinden dolayı dikkat ve önemi üzerine çekmiştir.

HYAL tarafından yıkılan HA oligosakkaritlerinin veya HA fragmanlarının anjiyogenezi arttırdığı gösterirmiştir (74). Tümör ekstrelerinde HA bozulmasından kaynaklanan daha kısa HA fragmanları bulunmuştur. Bu çalışmalar, HA'nın sadece kanser hücrelerindeki habis özellikleri uyarmadığını, aynı zamanda bozunma ürünlerinin de anjiyogenezin uyarılması yoluyla tümör ilerlemesini destekleyebileceğini düşündürmektedir (75).

Embriyonik gelişim, rejenerasyon ve iyileşme, kanser ve vasküler hastalıklarla ilgili çalışmalar, çoğalan ve göç eden hücreleri çevreleyen perisellüler matrikslerin HA'da oldukça zengin olduğunu göstermiştir (76, 77). Buradan anlaşılabileceği üzere

normal doku organizasyonu ve işlevi için HA sentezi ve yıkımı arasındaki denge önemlidir. HA yıkımının diğer ESM moleküllerine kıyasla nispeten hızlı olduğu bulunmuştur (77, 78). Bu gözlemlerden yola çıkarak, patolojik koşullarda hızlanan HA katabolizmasının, HYAL aktivitesindeki artışa ve katabolik yol boyunca üretilen ürünlere bağlı olduğu sonucuna varılabilir.

Yüksek moleküler ağırlıklı doku HA'ları; kimyasal, mekanik veya normal doku organizasyonunda görüldüğü gibi HYAL enzimleri ile yıkılabilir. Reaktif oksijen türleri (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, özellikle hidroksil (OH) radikali) HA'nın enzimatik olmayan yıkımında rol alırlar. Bu tip bozunma genellikle enflamasyon, doku hasarı ve kanserde ortaya çıkar (79, 80).

2.7. HYAL ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

HYAL aktivite ölçümleri; biyolojik, fizikokimyasal ve kimyasal yöntemlere ayrılabilir (81).

Biyolojik değerlendirmede, HYAL'in hayvan cildinde geçirgenliği arttırmasına bağlı olarak spesifik bazı boyaların dokuda yayılma etkisi belirlenir (82). Bir fizikokimyasal yöntem olarak müsin pıhtı önleme testi, çözeltilerde fibröz pıhtı halinde bulunan hyalüronanın HYAL ile inkübasyonundan sonra HYAL tarafından yıkımına bağlı olarak pıhtılaşmanın engellenmesi esasına dayanır (83). Her iki yöntem de HYAL aktivitesinin kantitatif tayini için uygun değildir. Bu yöntemler günümüzde oldukça eski ve egzotik olarak kabul edilir ve bugün artık kullanılmamaktadır.

Vizkozimetre, HYAL aktivitesinin ölçülmesi ve hyalüronanın ortalama molekül ağırlığının tahmini için hala yaygın olarak kullanılan bir fizikokimyasal yöntemdir. Yaygın kullanılmasına rağmen vizkozimetre tekniğinin bazı dezavantajları vardır. Bunlar, viskozimetrede belirlenen HYAL aktivitesinin başlangıçtaki viskoziteye bağlı olması ve yöntemin 1500 disakkarit ünitesinin altındaki HA'ları saptayamaması, ayrıca viskozimetrenin hassasiyetinin kullanılan HYAL türüne bağlı olarak değişmesidir (84).

Türbidimetrik yöntemler, HYAL aktivitesinin ve enzim inhibisyonunun belirlenmesinde kullanılan fizikokimyasal analizlerden biridir. İlk olarak 1944 yılında Kass ve Seastone tarafından tanımlanmıştır. Serumda enzimatik olarak yıkılamayan materyalin çökeltisi ve buna bağlı oluşan bulanıklık ölçülerek HYAL aktivitesi hesaplanır (85).

Kimyasal olarak karbonhidrat polimerlerinin HYAL aktivitesi sonucu açığa çıkan indirgeyici uçlar, şekerlerin indirgenmesine yönelik geleneksel kimyasal analizlerle belirlenebilir (86). Daha spesifik olarak, indirgeyici uçta N-asetil-D-glukozamin parçasının saptanması da mümkündür. Elson ve Morgan 1933'te, asidik bir p-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi (Ehrlich reaktifi) ile kolorimetrik olarak glukozamin ve kondrosaminin (galaktosamin) miktar tayinini yapmışlardır (87). Bir yıl sonra, yazarlar yöntemi modifiye etmişlerdir (88). Bu nedenle yöntem yaygın olarak “Morgan-Elson reaksiyonu” veya “Morgan-Elson testi” olarak adlandırılmaktadır. Reissig ve ark., Morgan-Elson yöntemini pH, substrat konsantrasyonu ve kromojen konsantrasyonu değişiklikleriyle optimize etmişlerdir (89). Bu değiştirilmiş versiyon, temel olarak, bugün hala sık kullanılan versiyonudur. Özellikle serum veya plazmada HYAL aktivitesini belirlenmek amacıyla bu protokole daha sonra bazı değişiklikler yapılmıştır (90, 91). Daha yeni modifikasyonlar, numunelerde proteinlerin neden olduğu bulanıklığı gidermeye yöneliktir veya alternatif olarak daha hassas olan floresan ölçümüne dayanmaktadır (92, 93).

HYAL derişiminin ELISA yöntemi ile immünokimyasal olarak tayin edilebilmektedir (94). ELISA yöntemi ile idrarda, dokuda, serumda MK ile HYAL aktivitesini araştıran ve hastaların HA düzeyleri ile kombine ederek değerlendiren birçok çalışma vardır (14, 17-18). ELISA prensibinde monoklonal antikorlarla kaplı reaksiyon plağına numunedeki ölçülecek ligand bağlanır. Bu ortama daha sonra HRP (Horseradish Peroxidase) enzimiyle işaretli ikinci bir monoklonal antikor bağlanır. Ortama kromojenik solüsyon eklenir. Enzim etkileşimi sonucu oluşan rengin şiddeti ile ölçülmek istenen HYAL'in konsantrasyonu doğru orantılıdır. ELISA yöntemiyle HYAL sonuçları kütle konsantrasyonu üzerinden ng/mL olarak standart grafikten belirlenir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTA VE KONTROL GRUPLARI

Çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Biyokimya Bölümü'nde yapıldı ve Üroloji Kliniği işbirliğiyle yürütüldü. Çalışma protokolü hastane Tıpta Uzmanlık Eğitim Kurulu tarafından onaylandı (Karar No: 0575; ve 24.12.2014) (Ek-1). Tüm hastalara ve kontrol bireylerine çalışma hakkında bildirim yapıldı, tüm katılımcıların sözlü ve yazılı onayları alındı (Ek-2).

Çalışmanın hasta grubu, Temmuz 2017-Mayıs 2018 tarihleri arasında hematüri, irritatif mesane semptomları veya alt üriner sistem şikayetiyle Üroloji Kliniği'ne başvuran ve ileri incelemelerinde MK tanısı konulan kişilerden seçildi. Çalışmaya yeni tanı almış veya tekrarlayan MK'si (rekürrensi) olan 43 MK hastası dahil edildi. Karşılaştırma grubuna ise, kliniğe yine aynı semptomlarla başvuran ancak ileri incelemelerinde MK tanısı dışlanan 43 kişi dahil edildi.

Başlangıçta topladığımız 43 hasta ve 43 kontrol grubunun demografik özelliklerinden yaş dağılımı dışında benzerdi. Yaş dağılımı HYAL aktivite düzeylerini etkileyeceğinden ve hasta ile kontrol grubunun aynı demografik özelliklere sahip olması için uç değerlerde bulunan yaşlar çalışmadan çıkarıldı. Sonuçta 39 MK hastası ve 38 kontrol grubu çalışmaya dahil edildi. Tablo 5'de kontrol grubunun ve Tablo 6'da hasta grubunun hem başlangıçtaki [kontrol (n = 43) ve hasta (n = 43)], hem de yaş dağılımını bozan uç değerler çıkarıldıktan sonraki [kontrol (n=39) ve hasta (n = 38)] demografik özellikleri gösterilmektedir.

Kontrol ve MK hasta gruplarının karşılaştırılması ise yaş ve cinsiyet bakımından eşleştirilmiş grupta yapıldı. Hastaları evrelere ayırdığımızda bu sayılar daha da azalacağından hasta grubunun kendi içinde karşılaştırılması başlangıçta topladığımız 43 hasta üzerinden gerçekleştirildi.

MK dışında başka kanseri olan ve HYAL aktivitesi yüksek olabilecek karaciğer hastalığı, romatolojik hastalıklar, transplant, kollajen doku hastalığı, dermatolojik rahatsızlığı olanlar hasta ve kontrol grubuna dahil edilmedi. Ama serum HYAL aktivitesini yükseltme olasılığı olan diabetes mellitus, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı, mevcut 43 MK hastamızın 27'sinde vardı. MK hasta sayımız azalacağından başlangıçta bu üç hastalığı dışlamadık. Kontrol grubunda ise bu üç hastalığı dışladık. Çalışmanın sonunda kontrol ve hasta grupları arasında spektrum bias'ını önlemek için

bu üç hastalığı da dışladık. Sonuçta 16 MK'lı hasta kaldı. Yaşa göre eşleştirdiğimiz 38 kontrol grubu ile 16 MK hastasının serum HYAL aktivitesini karşılaştırdık.

Ayrıca 18 yaş altı ve 80 yaşın üstünde olan hastalar ile hemolizli, lipemik ve ikterik numuneler de çalışmaya dahil edilmedi.

Kırk üç MK hastasının TNM evresi (klinik evre), grade evresi (patolojik evre); TUR-M (trans üretral rezeksiyon - mesane) ile tutulan odak sayısı ve kitlenin boyutu bakıldı. Hastalar tutulan odak sayısına göre multipl veya fokal; kitlenin boyutuna göre >3 cm ve <3 cm şeklinde sınıflandırıldı. Ayrıca Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Topluluğu (EORTC), kasa invazif olmayan MK'leri düşük, orta ve yüksek riskli olmak üzere üç grupta toplamıştır. Tablo 7, EORTC risk sınıflandırmasını göstermektedir. Kasa invazif olmayan MK'ler (n = 32), EORTC risk grubuna göre de gruplandırıldı.

Tablo 5. Kontrol grubunun demografik özellikleri

KONTROL GRUBU	n= 43*	n= 38**
Kadın; n (%)	7 (16.28)	2 (5.26)
Erkek; n (%)	36 (83.72)	36 (94.74)
Yaş, yıl; $\bar{x} \pm s$	52 $\pm$ 17 yıl	55 $\pm$ 17 yıl
Erkek yaş, yıl; $\bar{x} \pm s$	59 $\pm$ 15 yıl	59 $\pm$ 15 yıl
Sigara paket yıl; n ($\bar{x} \pm s$)	28 (25 $\pm$ 23) paket/yıl	25 (26 $\pm$ 21) paket/yıl
Kilo $\bar{x} \pm s$	68.2 $\pm$ 20.4 kg	69.4 $\pm$ 17.5 kg
Boy $\bar{x} \pm s$	171 $\pm$ 25.71 cm	170.3 $\pm$ 22.18 cm
Vücut kitle indeksi $\bar{x} \pm s$	23.32 $\pm$ 7.58 kg/m ²	24.02 $\pm$ 6.82 kg/m ²
İLK MUAYENEDEN SONRA PRİMER TANILARI		
Üriner sistem enfeksiyonu (n)	13	10
Üriner sistem taş hastalığı (n)	12	11
BPH (n)	5	5
Nörojenik mesane (n)	4	4
Üretra darlığı (n)	4	4
Aspirin kullanımı sonrası hematüri (n)	3	2
Egzersiz hematürisi (n)	2	2

* Başlangıçtaki hasta sayısı

** Yaş dağılımından uç veriler çıkarıldıktan sonraki hasta sayısı

Tablo 6. MK hastalarının demografik özellikleri

Hasta (n)	n= 43*	n= 39**
Kadın; n (%)	3 (6.98)	3 (7.69)
Erkek; n (%)	40 (93.02)	36 (92.31)
Yaş, yıl; $\bar{x} \pm s$	63 ± 13 yıl	61 ± 13 yıl
Erkek yaş, yıl; $\bar{x} \pm s$	62 ± 13 yıl	60 ± 12 yıl
Sigara paket yıl; n ($\bar{x} \pm s$)	33 (30 ± 25) paket/yıl	30 (30 ± 26) paket/yıl
DM (n)	6	5
HT (n)	17	16
KAH (n)	10	8
Astım (n)	3	2
KOAH (n)	3	2
Gut (n)	2	2
Hiperkolesterolemi (n)	4	3
Hipertriglisidemi (n)	2	2
Bening prostat hiperplazisi	1	1
Anemi (n)	1	1
İnguinal herni ameliyatı (n)	7	5
TUR-Prostat ameliyatı (n)	1	1
FAKO ameliyatı (n)	2	2
Kolesistektomi (n)	1	1
Günlük su tüketimi (L) $\bar{x} \pm s$	1.82 ± 0.82 L	1.78 ± 0.94 L
Kilo $\bar{x} \pm s$	76.2 ± 14.68 kg	74.1 ± 12.87 kg
Boy $\bar{x} \pm s$	159.8 ± 34.22 cm	162.7 ± 28.76 cm
Vücut kitle indeksi $\bar{x} \pm s$	28 ± 5.39 kg/m ²	$26,37 \pm 4,49$ kg/m ²
Tekrarlayan TUR-Mesane öyküsü (n)	10	9
Dengeli beslenen (n)	39	34
Et ağırlıklı beslenen (n)	3	3
Bitkisel ağırlıklı beslenen (n)	1	1
Ailede kanser öyküsü olan (n)	4	4
Yoğun egsoz dumanına maruz kalan (n)	1	1
MESLEKLERİNE GÖRE HASTA GRUBU		
Çiftçi	5	3
Mobilyacı	2	2
Marangoz	1	1
Kümes hayvancılığı (tavukculuk)	2	2
Benzinlikte işçi	1	1
Kaynakçı	1	1
Radyoloji teknisyeni	2	2
İnşaat işçisi	3	3
Boyacı	2	2
Kuru temizlemeci	1	1
Serbest meslek	11	9
Diğer meslekler***	12	12

* Başlangıçtaki hasta sayısı

** Yaş dağılımından uç veriler çıkarıldıktan sonraki hasta sayısı

***(antrenör, bahçıvan, öğretmen, astsubay, fırıncı, aşçı, veznedar, ev hanımı, aktarıcı)

Tablo 7. EORTC risk sınıflandırmasına göre düşük, orta, yüksek riskli tümörler - European Association of Urology Guidelines 2016 edition'dan.

RİSK GRUBU SINIFLAMASI	ÖZELLİKLER
Düşük riskli tümörler	Primer, tek, Ta, G1 (düşük dereceli), <3 cm, CIS yok
Orta riskli tümörler	Diğer iki kategoride tanımlanmayan tüm tümörler (düşük ve yüksek riske girmeyen)
Yüksek riskli tümörler	Aşağıdakilerden herhangi biri:
	-T1 tümör
	-G3 (yüksek dereceli) tümör
	-CIS
	-Çok sayıda ve tekrarlayan ve >3cm olan Ta, G1, G2 tümörler

43 MK hastası klinik evreye göre Ta (n = 17), CIS (n = 5), T1 (n = 10), T2 (n = 9), T3 (n = 2) ve patolojik evresine göre (2004 WHO) papillom (n = 10), DMP-PUN (n = 15), düşük derece (n = 12), yüksek derece (n = 6) olarak gruplara ayrıldı. Klinik evreyle patolojik evrenin birlikte değerlendirilmesi Tablo 8'de gösterildi.

Tablo 8. Hasta grubunun klinik evresi (TNM) ve histolojik (patolojik) evresinin birlikte değerlendirilmesi

KLİNİK EVRE					
PATALOJİK EVRE	Ta (n:17)	CIS (n:5)	T1 (n:10)	T2 (n:9)	T3 (n:2)
Papillom (n:10)	9	1	0	0	0
DMP-PUN (n:15)	6	2	6	1	0
Düşük derece (n:12)	2	2	3	5	0
Yüksek derece (n:6)	0	0	1	3	2

3.2. NUMUNELERİN ALINMASI VE HAZIRLANMASI

Kan numuneleri (serum ve plazma) hasta ve kontrol grubunda 10-12 saat açlığı takiben serum için jel ayırıcı 16×100 mm’lik Vacutainer SST tüplerine (Becton Dickinson); plazma için EDTA içeren Vacutainer tüplere (Becton Dickinson) alındı. Hasta ve kontrol grubundan alınan kan numuneleri 30 dakika içerisinde 1300 g’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra glikoz, üre, kreatinin, total protein, albümin, ALT, AST, sodyum, potasyum, kalsiyum, PSA ve hemogram testleri çalışılıp, geri kalan serum ve plazma numuneleri, HYAL aktivite ölçümü için -80 °C’de saklandı.

3.3. KULLANILAN KİMYASALLAR VE CİHAZLAR

- Rutin biyokimya testleri Roche Diagnostics-Cobas 8000 c702 analizöründe fotometrik yöntemle çalışıldı.
- PSA testi, Roche Cobas 6000 e601 analizöründe immünokimyasal olarak elektrokemilüminesan yöntemle çalışıldı.
- Hemogram testleri Sysmex XN-3000 analizöründe çalışıldı.
- Tüm bu testlerde üretici firma kitleri kullanıldı. Düzenli kalite kontrol işlemleri yapıldı.
- HYAL aktivite ölçümü için Novaspec II Spektrofotometre kullanıldı.

3.3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

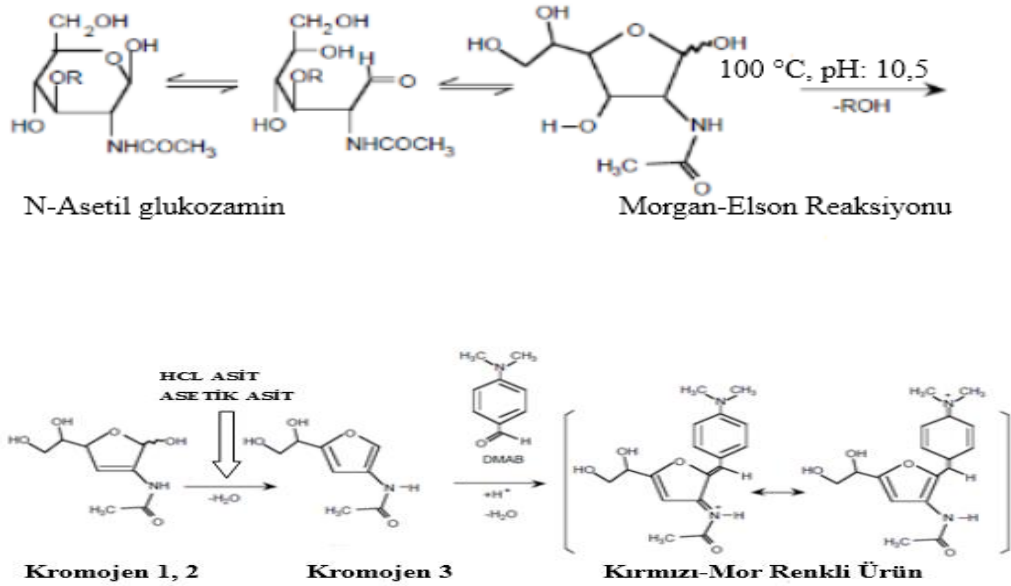
HYAL aktivite ölçümü için gerekli kimyasal listesi aşağıdaki gibidir.

- D-Sakkarik asit 1,4-lakton (Sigma Aldrich, Kod: S0375, 2 g)
- %99 N-Asetil-D-gukozamin $\geq$ %99 (Sigma Aldrich, Kod: A8625, 5 g)
 - Hyalüronik asit sodyum tuzu *F. streptococcus equi* sp. (Sigma Aldrich, Kod: H9390, 1 g)
- Potasyum tetraborat tetrahidrat (Sigma Aldrich, Kod: P5754, 500 g)
- DMAB (dimetil amino benzaldehyd) (Merck Schuchardt, 250 g)
- Formik asit (Sigma Aldrich, Kod: F0507, 1000 mL)
- Asetik asit
- Konsantre hidroklorik asit (10 N)
- Sodyum klorür

3.4. HYALÜRONİDAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ

Serum ve plazmada kolorimetrik HYAL aktivitesi ölçümü ilk kez, Morgan ve Elson tarafından yapılmıştır (1933). Reissig ve ark. Morgan-Elson kolorimetrik tayin yöntemini 1955'te modifiye etmiştir. Takahashi ve ark. 2003 yılında Reissig yöntemini optimize etmişlerdir. Biz çalışmamızda, Takahashi ve ark.'nın optimize ettiği yöntemi kullandık.

Prensip: Substrat olarak kullanılan HA, numunedeki HYAL ile 37 °C 'de 15 dakika inkübe edildi ve enzim reaksiyonunu durdurmak için 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda ısıtıldı. Reaksiyon ortamı oda sıcaklığına getirildikten sonra üzerine alkali ortamda tetraborat ayırıcı eklendi, ardından tekrar kaynar su banyosunda 3 dakika daha tutularak Morgan-Elson renk reaksiyonuna göre kromojen 1 ve 2 konfigürasyonunun oluşması sağlandı. Tekrar soğuk su banyosu ile oda sıcaklığına getirildikten sonra, asidik ortamda kromojen 1 ve 2 konfigürasyonu, kromojen 3 konfigürasyonuna dönerek DMAB ayırıcı ile tepkimeye girdi ve 20 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Bulanıklığı gidermek için 10 dakika boyunca 4 °C'de 1500 g'de santrifüjden sonra, temiz süpernatanın 585 nm'deki absorbansı, köre (blank) karşı ölçüldü. Körün hazırlanması enzim reaksiyon karışımının (numune) 0. dakikada inkübe edilmesi dışında aynı şekilde gerçekleştirildi. HYAL ile HA'nın 37 °C'de oluşturduğu renk Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3: Hyalüronidaz ile hyalüronik asidin oluşturduğu tepkime – Takahashi ve ark.'dan.

3.5. AYIRAÇLARIN, SUBSTRAT VE STANDARTLARIN HAZIRLANMASI

0.1 M tampon içinde 1.5 mg/mL HA içeren 0.1 M NaCl ve 1.5 mM D-sakkarik asit 1,4-lakton pH: 3.9 substrat tamponunun hazırlanışı:

150 mg HA sodyum tuzu *F. streptococcus* equi sp, 584.4 mg NaCl (MA: 58.44 g/mol), 31.5 mg D-sakkarik asit 1,4-lakton (MA: 210 g/mol) tartıldı. 0.1 M formik asit ile pH 3.9'a ayarlandı. Son hacim deiyonize su ilavesiyle 100 mL'ye tamamlandı.

0.8 M Tetroborat çözeltisi PH 10.5 hazırlanışı:

12.22 g potasyum tetraborat tetrahidrat (MA: 305.5 g/mol) tartılarak 50 mL deiyonize suya tamamlandı. Ek hiç bir işlem yapılmadan pH yaklaşık 10.5 idi

DMAB ayırıcının hazırlanışı:

Stok DMAB çözeltisi hazırlamak için, 10 g DMAB tartılarak 100 mL (12,5 ml'si konsantre (10 N) hidroklorik asit ve 87.5 mL'si asetik asitte çözöldü. Stok DMAB 2 °C'de 1 ay stabildir. Her çalışmadan önce stok çözelti 1/9 oranında asetik asitle seyreltirilerek taze DMAB çözeltisi hazırlandı.

Standart hazırlanışı:

25 mg N-Asetil D-Glukozamin 25 mL deiyonize suda çözölerek 1000 mg/L konsantrasyonda ön standart hazırlandı. Bu standarttan seri dilüsyonlarla 500, 200, 100, 50 mg/L N-Acetyl-D-glukozamin içeren standartlar hazırlandı. Sıfır standardı sadece deiyonize su içermekteydi.

3.6. HYALÜRONİDAZIN SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜMÜ

- Dondurulan serum ve plazma numuneleri oda sıcaklığına getirildikten sonra vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.
- 50 µL hasta serumu üzerine 250 µL substrat tampon eklenerek karıştırıldı ve 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Sonrasında enzim reaksiyonunu durdurmak için 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda (95 – 100 °C'de) tutuldu.
- Örnekler soğuk su ile soğutularak oda sıcaklığına getirildikten sonra alkali ortamda tetraborat ayırıcı ilave edilip karıştırılmasının ardından tekrar kaynar

- su banyosunda (95-100 °C'de) 3 dakika daha tutularak kromojen 1 ve 2 konfigürasyonun oluşması sağlandı.
- Örnekler soğuk su ile soğutularak oda sıcaklığına getirildikten sonra asit çözeltisi içinde DMAB ayırıcı eklendi ve karıştırıldı, 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi.
- Bulanıklığı gidermek için 10 dakika boyunca 4 °C'de 1500 g'de santrifüj edildikten sonra, temiz süpernatanın 585 nm'deki absorbansı, ayıraç körüne karşı ölçüldü.
- Ölçülen standart absorbansı kullanılarak HYAL aktivitesi hesaplandı.

Serum ve plazma HYAL aktivite çalışma prensibi aynıdır ve hem serum hem de plazma için HYAL aktivitesi çalışma prosedürü Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Serum ve plazma HYAL aktivitesi çalışma prosedürü

	Numune (µL)	Kör (µL)	Standart (µL)
Numune (µL)	50	-	-
Standart (µL)	-	-	50
Deiyonize su (µL)	-	50	-
Substrat çözelti	250	250	250
İnkübasyon	37 °C, 15 dk		
Su banyosu	95 -100 °C, 5 dk		
Tetraborat ayırıcı	100	100	100
Su banyosu	95 -100 °C, 3 dk		
Dimetilamino benzaldehit ayırıcı	1500	1500	1500
İnkübasyon	37 °C, 20 dk		
1500 g'de santrifügasyon	4 °C, 10 dk		
585 nm' de köre karşı okuma			

Hesaplama:

ϵ : NAG'nin 585 nm'deki molar absorbtivite katsayısının hesaplanması:

$A = a \times b \times c$ formülünden

A: Absorbans

a: Molar absorbtivite katsayısı (ϵ)

b: Işık yolu

c: Konsantrasyon

100 mg/L NAG standartının absorbansı = 0.248 bulundu.

100 mg/L NAG (MA: 221.2 g/mol) 452 μ mol gelir ve dilüsyon oranı da göz öüne alındığında (1900 μ L toplam hacim, 50 μ L standart hacmi) 11.894 μ mol bulunur.

$A = a \times b \times c$ formülünden eşitliğe konulduğunda molar absorbtivite katsayısı 20 850 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ olarak hesaplandı.

HYAL aktivitesi U/L (μ mol/dk/L) = $(\Delta A_{585}/dk \times 10^6 \times VT) / (\epsilon \times d \times VS)$

$\Delta A_{585}/dk$: dakikadaki absorbans değişikliği ($\Delta ANUMUNE/dk - \Delta AKÖR/dk$)

10^6 : mol/L'den μ mol/L'ye dönüştürme faktörü

ϵ : NAG'nin 585 nm'deki molar absorbtivite katsayısı; 20 850 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

d: ışık yolu (cm)

VT: toplam hacim

VS: numune hacmi

Verilen değerler denkleme yerleştirildiğinde;

HYAL aktivitesi U/L (μ mol/dk/L) = $(\Delta A_{585}/15 \times 10^6 \times 300) / (20\ 850 \times 1 \times 50)$

HYAL aktivitesi U/L (μ mol/dk/L) = $\Delta A \times 19.18$

Sonuçlar U/L olarak hesaplandı. Bir enzim ünitesi 37 °C'de 1 μ mol substratı (NAG) 1 dk'da ürüne dönüştüren enzim aktivitesi olarak tanımlandı.

3.7. METOT PERFORMANSI ÇALIŞMALARI

Doğrusallık Çalışması

Doğrusallık çalışmasında yüksek HYAL ve düşük HYAL içeren serum havuzları kullanıldı. Yüksek havuz, düşük havuz ile 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 oranında karıştırıldı. Sonuçlar lineer regresyon grafiği ve formülü ile verildi.

Kesinlik Çalışması

HYAL ölçüm yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik (presizyon) çalışması için düşük, orta ve yüksek düzeyde analit içeren serum havuzu oluşturuldu. Serum havuzları 40 eş numuneye ayrılarak -80 °C’de saklandı. Kesinlik çalışmasında her gün sabah 1 çift numune (düşük, orta ve yüksek konsantrasyondaki HYAL serum havuzu) ve akşam 1 çift numune (düşük, orta ve yüksek konsantrasyondaki HYAL serum havuzu) çözülerek (sabah – akşam farkı 4 saat aryla) günde iki kez ve her çalışma çift kez olacak şekilde yapıldı. Bu işlem art arda yirmi gün boyunca tekrarlandı. Tüm sonuçların ortalama, standart sapma ve % varyasyon katsayıları (%VK) hesaplandı.

Geri Kazanım Çalışması

HYAL geri kazanım çalışması için düşük ve yüksek düzeyde HYAL içeren iki ayrı serum havuzu kullanıldı. Düşük ve yüksek havuzların HYAL aktivitesi sırasıyla, 747 mU/L ve 8679 mU/L idi. Havuzlar 3Y:1D, 2Y:1D, 1Y:1D, 1Y:2D ve 1Y:3D oranında karıştırılarak aynı anda çift olarak çalışıldı ve % geri kazanım (recovery) hesaplandı. Hesaplama $\%R = \frac{\text{ölçülen analit konsantrasyonu}}{\text{beklenen analit konsantrasyonu}} \times 100$ formülü kullanıldı.

Saptama Sınırları (Limit of Blank, LOB; Limit of Detection, LOD; Limit of Quantification LOQ)

LOB, LOD, LOQ hesaplanmasında 20 kez çalışılan kör numune sonuçlarından elde edilen ortalama (xkör) ve standart sapmalar (skör) kullanıldı.

$$LOB = x_{\text{kör}} + 1.645 \cdot s_{\text{kör}}$$

$$LOD = x_{\text{kör}} + 3.3 \cdot s_{\text{kör}}$$

$$LOQ = x_{\text{kör}} + 10 \cdot s_{\text{kör}} \text{ formülü ile hesaplandı.}$$

Serum HYAL Aktivitesinin Receiver Operating Curve (ROC) Analizi, Kesim Değeri, Duyarlılık, Özgüllük ve Olabilirlik Oranları (Likelihood Ratio)

ROC eğrisinden Youden indeksi kullanılarak en uygun kesim değeri saptandı; biyopsi sonuçları ve kesim değeri esas alınarak klinik duyarlılık, özgüllük ve olabilirlik oranları hesaplandı.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tanımlayıcı istatistiksel analizler [x, s, standart hata (SH), ortanca (M), çeyrekler arası aralık (IQR), en küçük ve en büyük değerler] yapıldı. Grupların normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırmalar, normal dağılım gösteren parametreler için bağımsız Student t testi ile yapıldı. Hasta ve kontrol için serum-plazma arasında anlamlı fark olup olmadığı eşleştirilmiş Student t testi ile yapıldı. Hasta verilerindeki değişkenlerin çoğunun normal olmayan dağılım göstermesi ve hasta grubunda alt gruplara ayırma sonucu azalan hasta sayısı sebebiyle parametrik olmayan testler kullanıldı. Klinik ve patolojik evreleme ile risk skorları arasındaki çoklu karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi ile ikili karşılaştırmalar Mann Whitney U testi ile yapıldı. Kategorik verileri karşılaştırmak için Ki-Kare analizi yapıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi. Değişkenler arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayısı ile değerlendirildi. Tüm bu işlemler için "IBM SPSS for Windows versiyon 22.00" istatistik paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. MK VE NORMAL BİREYLERDE ÖLÇÜLEN DEĞİŞKENLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

MK ve kontrol grubunda glukoz, üre, kreatinin, total protein, albümin, ALT, AST, sodyum, potasyum, kalsiyum, hemoglobin ve total prostat spesifik antijen (PSA) değerleri ölçülmüştür. Gruplarda bakılan tüm analitlerin normal dağılım gösterdikleri Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendikten sonra ($p > 0.05$) bağımsız t-testi ile ölçülen analitler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). MK ve normal bireyler arasında ölçülen değişkenlerin karşılaştırılması ve tanımlayıcı istatistikleri Tablo 10'da gösterilmiştir.

4.2. MK VE KONTROL GRUPLARININ YAŞ VE CİNSİYET AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda MK ve kontrol gruplarının yaş dağılımı ve demografik bilgileri Tablo 11'de verilmiştir. Kolmogorov-Smirnov testi ile hasta ve kontrol grubunun yaş değerleri normal dağıldığı belirlendikten sonra ($p > 0.05$) parametrik testlerden bağımsız t-testi yapıldı ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Çalışmamızda MK ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımı ve demografik bilgileri Tablo 11'de verilmiştir. Kolmogorov-Smirnov testi ile hasta ve kontrol grubunun cinsiyet sayılarının dağılımının normal olduğu belirlendikten sonra ($p > 0.05$) parametrik testlerden bağımsız t-testi ile karşılaştırıldı ve gruplar arasında yaş açısından istatistiksel anlamlı fark görülmedi ($p > 0.05$).

Gruplardaki kadın-erkek sayıları Ki-kare testi ile karşılaştırıldı ve gruplar arasında cinsiyet açısından anlamlı fark görülmedi ($p > 0.05$).

Tablo 10. MK ve normal bireyler arasındaki değişkenlerin karşılaştırılması

Analit (birim)	MK $\bar{x} \pm s$ (n:39)	Kontrol $\bar{x} \pm s$ (n:38)	p
Glukoz (mg/dL)	94 $\pm$ 10 mg/dL	104 $\pm$ 44 mg/dL	>0.05
Üre (mg/dL)	33 $\pm$ 21 mg/dL	42 $\pm$ 22 mg/dL	>0.05
Kreatinin (mg/dL)	1.13 $\pm$ 0.99 mg/dL	1.16 $\pm$ 0.80 mg/dL	>0.05
Total protein (g/dL)	7.33 $\pm$ 0.45 g/dL	7.26 $\pm$ 0.51 g/dL	>0.05
Albumin (g/dL)	4.46 $\pm$ 0.35 g/dL	4.41 $\pm$ 0.46 g/dL	>0.05
ALT (U/L)	25 $\pm$ 29 U/L	18 $\pm$ 10 U/L	>0.05
AST (U/L)	21 $\pm$ 13 U/L	20 $\pm$ 16 U/L	>0.05
Na (mmol/L)	139 $\pm$ 3 mmol/L	140 $\pm$ 2 mmol/L	>0.05
K (mmol/L)	4.34 $\pm$ 0.36 mmol/L	4.43 $\pm$ 0.43 mmol/L	>0.05
Ca (mg/dL)	9.37 $\pm$ 0.51 mg/dL	9.43 $\pm$ 0.7 mg/dL	>0.05
Hb (g/dL)	14.7 $\pm$ 1.8 g/dL	14.1 $\pm$ 2.3 g/dL	>0.05
Total PSA (ug/L)*	1.48 $\pm$ 0.80 ug/L	2.42 $\pm$ 2.91 ug/L	>0.05

x: ortalama, s:standart sapma

* Sadece erkeklerde bakıldı MK (n = 36), kontrol grubu (n =36).

Tablo 11. MK ve kontrol gruplarındaki hastaların yaş ve cinsiyet dağılımları

	MK (n=39)	Kontrol (n=38)	p
Yaş, yıl; $\bar{x} \pm s$	61 $\pm$ 13 yıl	55 $\pm$ 17 yıl	>0.05
Kadın; n(%)	3 (7.69)	2 (5.26)	>0.05
Erkek; n(%)	36 (92.31)	36 (94.74)	>0.05
Erkek yaş, yıl; $\bar{x} \pm s$	60 $\pm$ 12 yaş	56 $\pm$ 14 yaş	>0.05
x: ortalama, s:standart sapma			

4.3. MK VE KONTROL GRUBUNUN SİGARA İÇİMİ YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

43 MK ve 43 kontrol grubunda sigara içen sırasıyla 33 ve 28 kişiydi. Sigara kullanımı yönünden Ki-kare testi ile gruplar karşılaştırıldığında sigara içen birey sayısında anlamlı fark yokken ($p > 0.05$) tüm gruplar birleştirilerek serum HYAL aktivitesi ile sigara kullanımı bağımsız t-testiyle değerlendirildiğinde sigara içen grupta serum HYAL aktivitesi (mU/L) daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Tablo 12’de MK ve kontrol grubunun sigara kullanımı yönünden demografik bilgileri verildi. Tablo 13’te ise tüm gruplar birleştirildiğinde sigara ile serum HYAL aktivitesi arasındaki ilişki ve Şekil 4’te de box-plot grafiği gösterildi.

Uç değerde gelen yaş verileri çalışmadan çıkarıldıktan sonraki 39 MK ve 38 kontrol grubunda sigara içen sırasıyla 30 ve 25 kişiydi. Sigara kullanımı yönünden Ki-kare testi ile gruplar karşılaştırıldığında sigara içen birey sayısında anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$) ve Tablo 11’de gösterildi. Başlangıçtaki veriler hasta ($n= 43$) ve kontrol ($n= 43$) ile uç değerler atıldıktan sonraki hasta ($n= 39$) ve kontrol ($n= 38$) grupları birleştirilerek sigara ile serum HYAL aktivitesi arasındaki ilişki Tablo 12’de gösterildi.

Tablo 12. MK ve kontrol grubunun sigara kullanımı yönünden değerlendirilmesi

	MK (n:43) Kontrol (n:43) p			MK (n:39) Kontrol (n:38) p		
Sigara içiyor	33	28	>0,05	30	25	>0,05
Sigara içmiyor	10	15	>0,05	9	13	>0,05

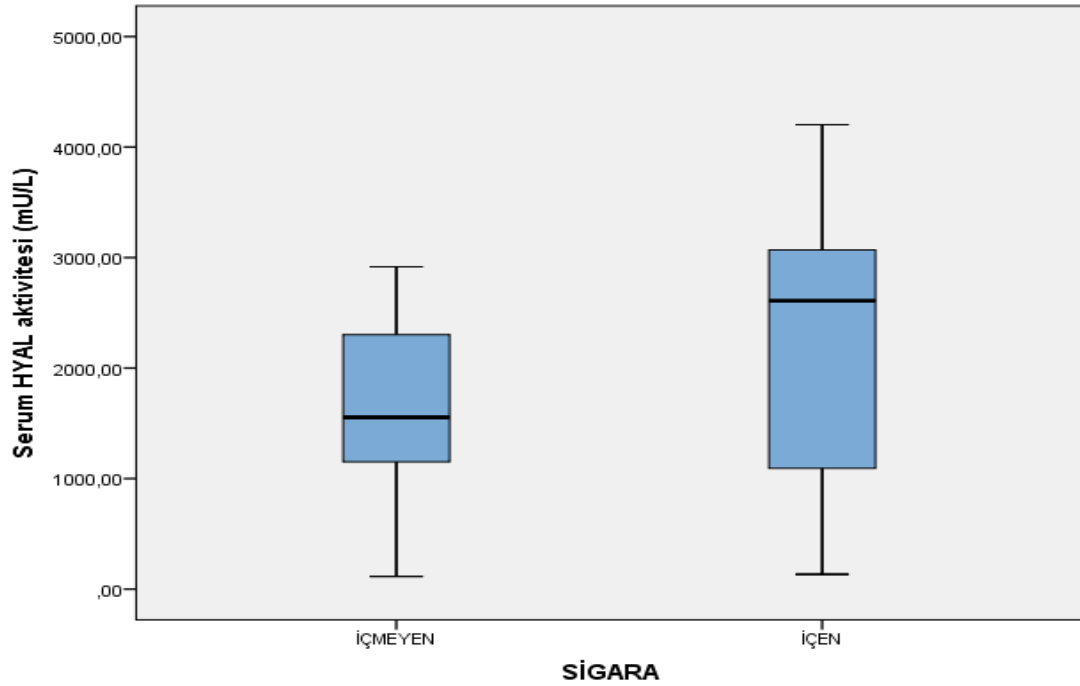
Tablo 13. Tüm grubunun sigara kullanımı yönünden değerlendirilmesi ve serum HYAL aktivitesi ile karşılaştırılması

TÜM GRUPLAR (n=86)*			
SİGARA	İÇMEYEN (n:25)	İÇEN (n:61)	p
SERUM HYAL(mU/L) $\bar{x} \pm s$	1655 $\pm$ 1062	2154 $\pm$ 1146	<0.05
TÜM GRUPLAR (n=77)**			
SİGARA	İÇMEYEN (n:22)	İÇEN (n:55)	p
SERUM HYAL(mU/L) $\bar{x} \pm s$	1645 $\pm$ 885	2140 $\pm$ 1103	<0.05

x: ortalama, s:standart sapma

* başlangıçtaki veriler n= 86 (43 MK, 43 Kontrol hastası)

** uç veriler atıldıktan sonra n= 77 (39 MK, 38 Kontrol hastası)



Şekil 4: Tüm gruplardaki (n=86) sigara alışkanlığı ile serum HYAL aktivitesi arasındaki ilişki

4.4. MK VE KONTROL GRUPLARI ARASINDA SERUM HYAL AKTİVİTE ÖLÇÜMLERİ VE KARŞILAŞTIRILMASI

MK ve kontrol grubuna ait serum HYAL aktivitesi (mU/L) ortalamaları, standart sapmaları ve p değeri Tablo 14’te gösterilmiştir.

Gruplar arasında HYAL aktivitesi bağımsız t-testiyle karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0.01$) (Şekil 5).

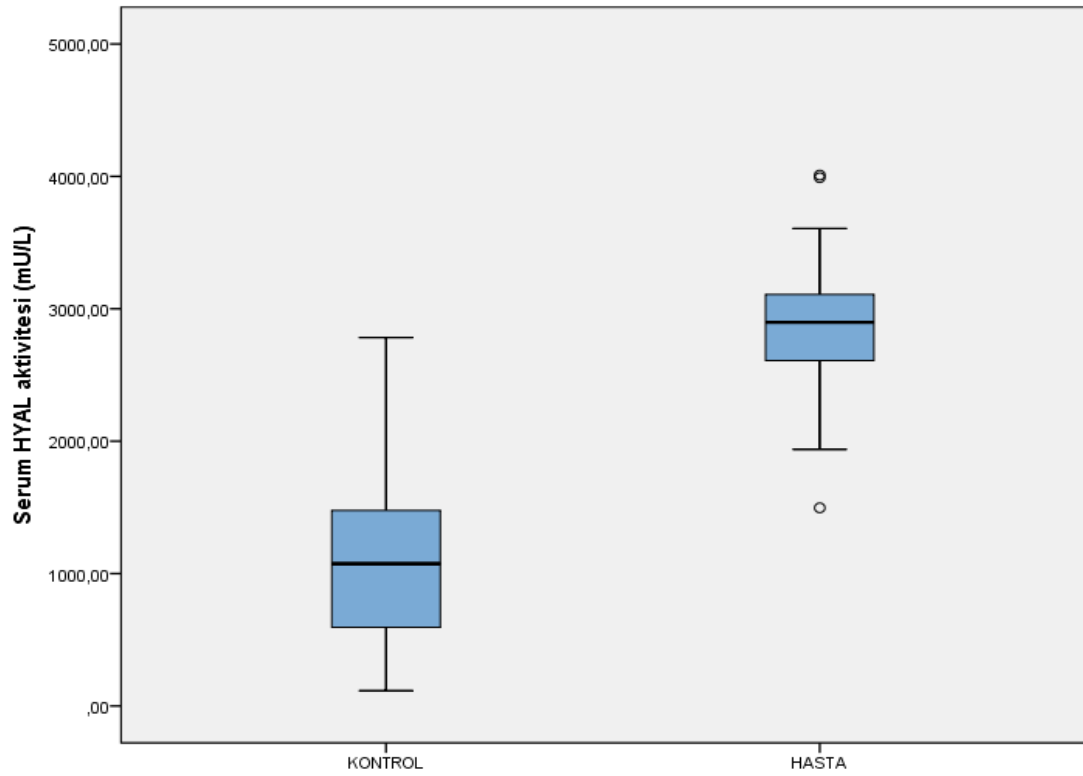
Yaşa göre eşleştirdiğimiz 38 kontrol grubu hastası ile 16 MK hastasının serum HYAL aktivitesini karşılaştırdık. Tablo 14’te grupların ortalama serum HYAL aktivitesi ve p değeri gösterildi.

Tablo 14. MK ve kontrol gruplarındaki serum HYAL aktivitesi

SERUM	MK $x \pm s$ (n:39)	Kontrol $x \pm s$ (n:38*)	p
HYAL (mU/L)	2866 $\pm$ 497	1109 $\pm$ 683	<0.01
SERUM	MK $x \pm s$ (n:16)	Kontrol $x \pm s$ (n:38*)	p
HYAL (mU/L)	2911 $\pm$ 688	1109 $\pm$ 683	<0.01

*Kontrol grubunda 16 hastanın HYAL aktivitesi <LOD (LOD = 901,05 mU/L) idi.

x: ortalama, s:standart sapma

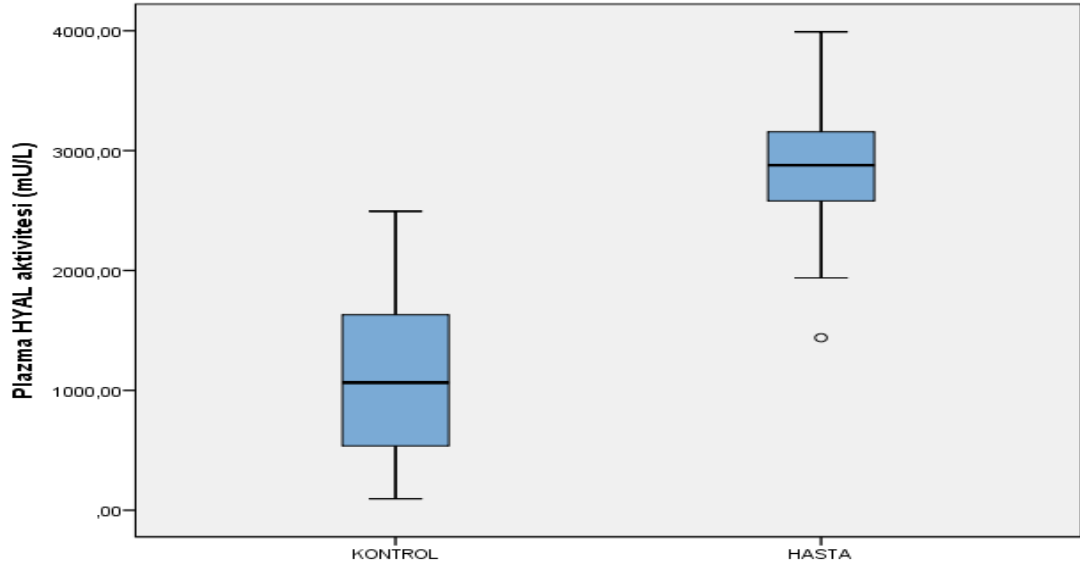


Şekil 5. MK ve kontrol gruplarındaki serum HYAL aktivitesi

° Kutudan 1.5 – 3 IQR (çeyreklikler arası aralık) uzaktaki değerler: uç değer

Tablo 15. MK ve kontrol gruplarındaki plazma HYAL aktivitesi

PLAZMA	MK $\bar{x} \pm s$ (n: 39)	Kontrol $\bar{x} \pm s$ (n: 38)	p
HYAL (mU/L)	2862 $\pm$ 533	1088 $\pm$ 606	<0.01



Şekil 6. MK ve kontrol gruplarındaki plazma HYAL aktivitesi

° Kutudan 1.5 – 3 IQR (çeyreklikler arası aralık) uzaktaki değerler: uç değer

4.5. MK VE KONTROL GRUPLARI ARASINDA PLAZMA HYAL AKTİVİTE VE KARŞILAŞTIRILMASI

MK ve kontrol grubuna ait plazma HYAL aktivite (mU/L) ortalamaları, standart sapmaları ve p değeri Tablo 15’te gösterilmiştir.

Gruplar arasında HYAL aktivitesi bağımsız t-testiyle karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0.01$) (Şekil 6).

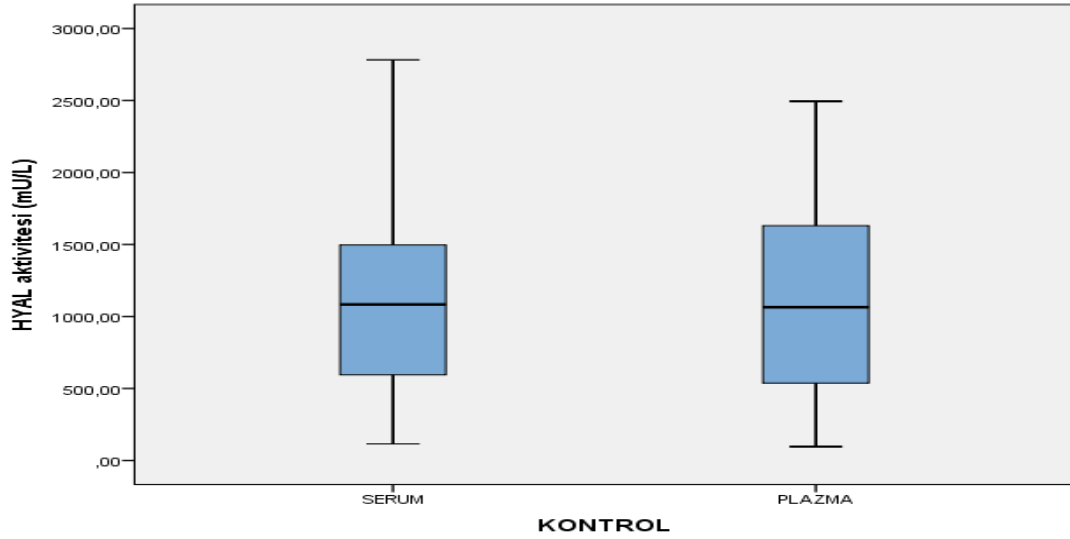
4.6. SERUM VE PLAZMA ARASINDA HYAL AKTİVİTESİ

MK’li hastaların hem serum hem de plazma HYAL aktivite ölçümü (mU/L) arasında anlamlı fark olup olmadığı bağımlı grup t-testi ile değerlendirildi ve istatistiksel olarak serum ve plazma HYAL aktivitesi arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Grupların ortalamaları, standart sapmaları ve p değeri Tablo 16’da gösterilmiştir. Ayrıca box-plot şekli de Şekil 7’de görülmektedir.

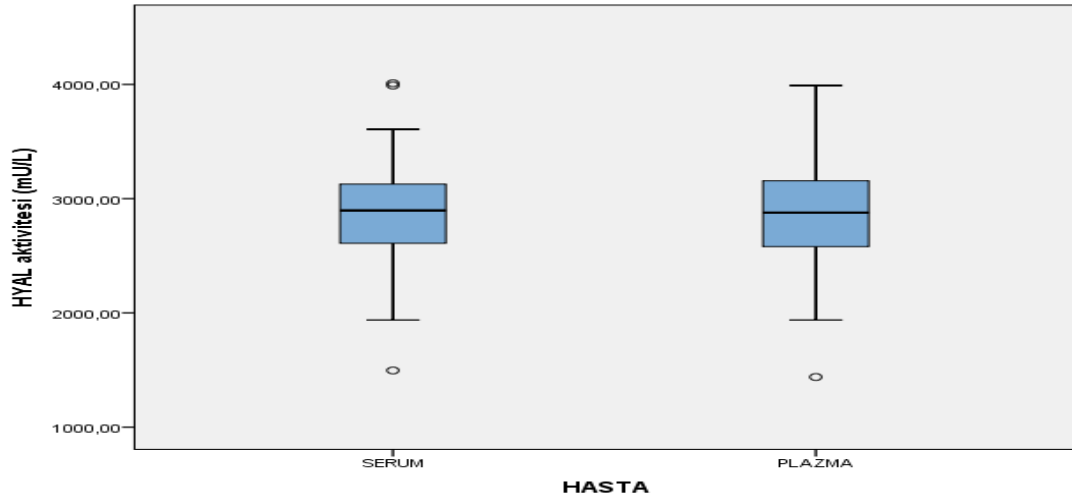
Aynı şekilde kontrol grubundaki bireylerin serum ve plazması ele alındığında, serum ve plazma HYAL aktivitesi (mU/L) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Grupların ortalamaları, standart sapmaları ve p değeri Tablo 16’da gösterilmiştir. Ayrıca box-plot şekli de Şekil 8’de görülmektedir.

Tablo 16. MK ve kontrol gruplarındaki serum ve plazma HYAL aktivitesi

	SERUM HYAL (mU/L)	PLAZMA HYAL (mU/L)	p
Kontrol (n: 38)	1109 ± 683	1088 ± 606	>0.05
Hasta (n: 39)	2866 ± 497	2862 ± 533	>0.05

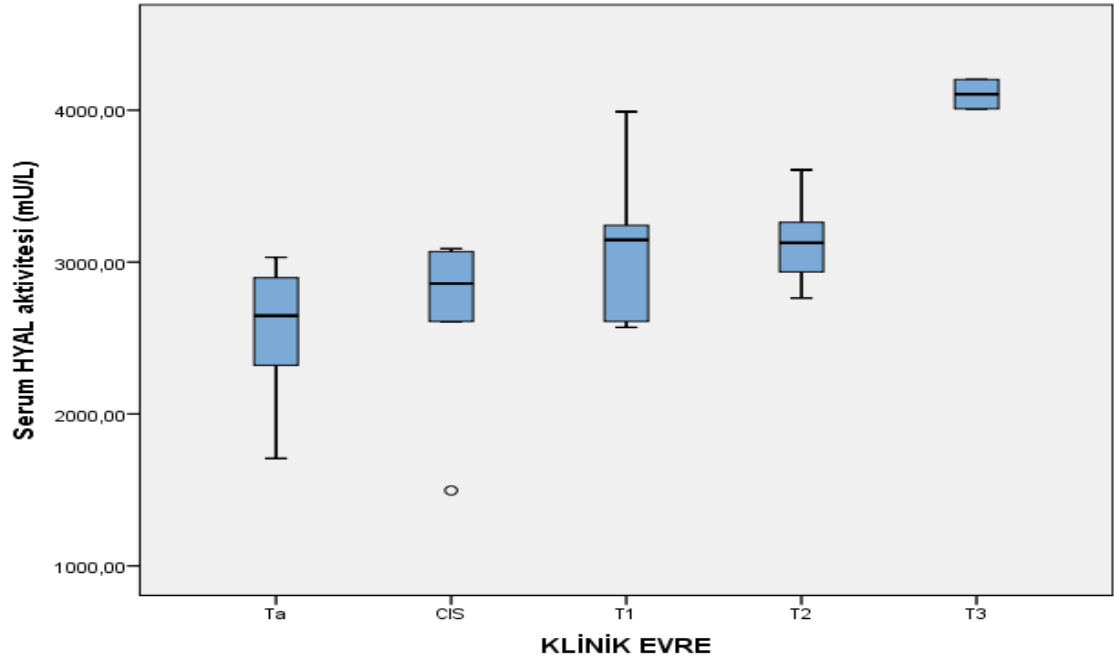


Şekil 7. . Kontrol grubunda serum ve plazma HYAL aktivitesi



Şekil 8. MK hastalarında serum ve plazma HYAL aktivitesi

° Kutudan 1.5 – 3 IQR (çeyreklikler arası aralık) uzaktaki değerler: uç değer



Şekil 9. TNM evresine göre MK'li hastaların serum HYAL aktivitesi

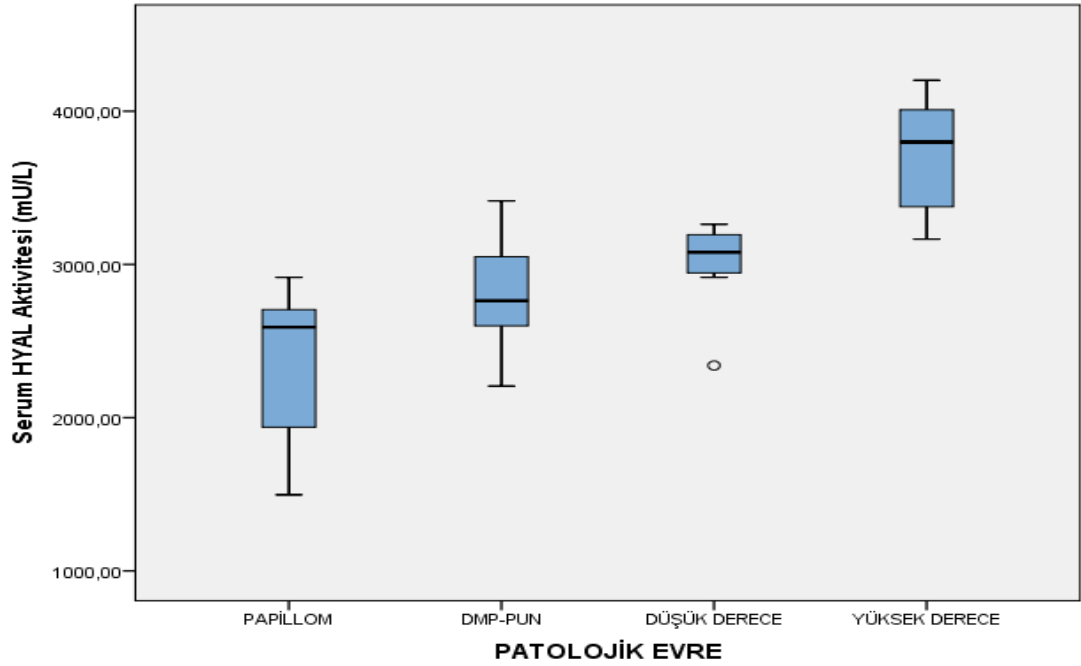
° Kutudan 1.5 – 3 IQR (çeyreklikler arası aralık) uzaktaki değerler: uç değer

4.7. MK HASTALARININ HYAL AKTİVİTESİ İLE KLİNİK EVRE KARŞILAŞTIRILMASI

43 MK hastası klinik evreye göre Ta (n = 17), CIS (n = 5), T1 (n = 10), T2 (n = 9) ve T3 (n = 2) olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Grupların serum HYAL aktivitesi (mU/L) Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p <0.05). TNM klinik evresine göre gruplar Şekil 9'da görülmektedir.

4.8. MK HASTALARININ HYAL AKTİVİTESİ İLE PATALojİK EVRE KARŞILAŞTIRILMASI

43 MK hastası 2004 WHO patolojik evre sınıflandırmasına göre papillom (n = 10), DMP-PUN (n = 15), düşük dereceli (n = 12) ve yüksek dereceli (n = 6) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Grupların serum HYAL aktivitesi (mU/L) Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p <0.05). Patolojik evresine göre gruplar Şekil 10'da görülmektedir.



Şekil 10. Patolojik evresine göre MK'li hastaların serum HYAL aktivitesi

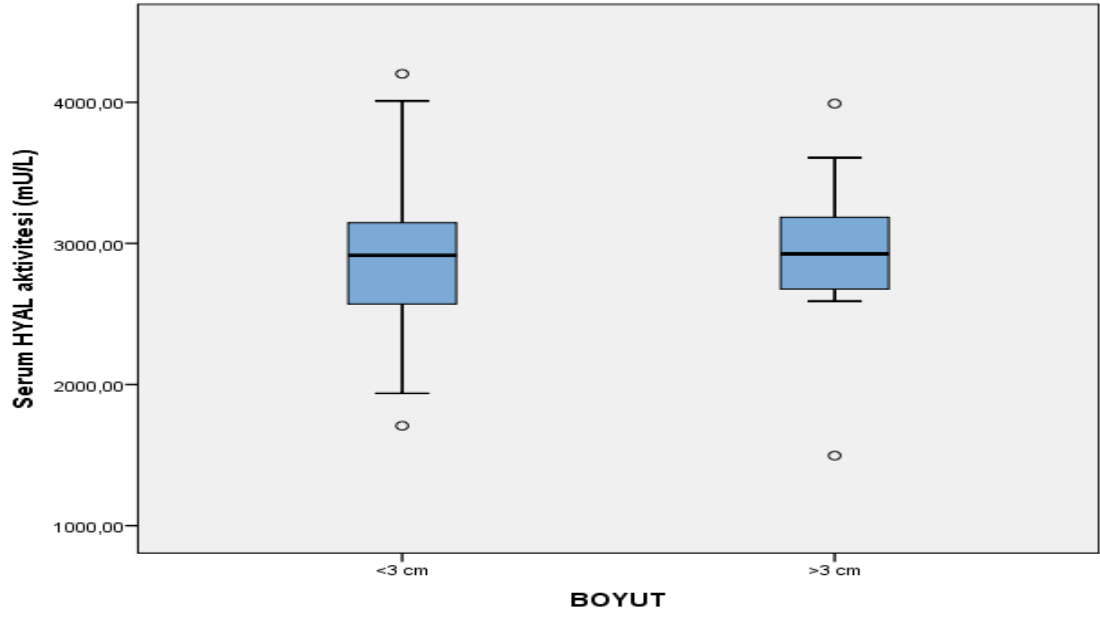
° Kutudan 1.5 – 3 IQR (çeyreklikler arası aralık) uzaktaki değerler: uç değer

4.9. MK HASTALARININ HYAL AKTİVİTESİ İLE TÜMÖR BOYUTUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

43 MK hastasına yapılan TUR-M sonuçlarından elde edilen verilerle tümör boyutu 3 cm'den büyük (n = 16) ve küçük (n = 27) olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı. Grupların serum HYAL aktivitesi (mU/L) Mann Whitney U testi ile değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p >0.05). Tümör boyutuna göre gruplar Şekil 11'de görülmektedir.

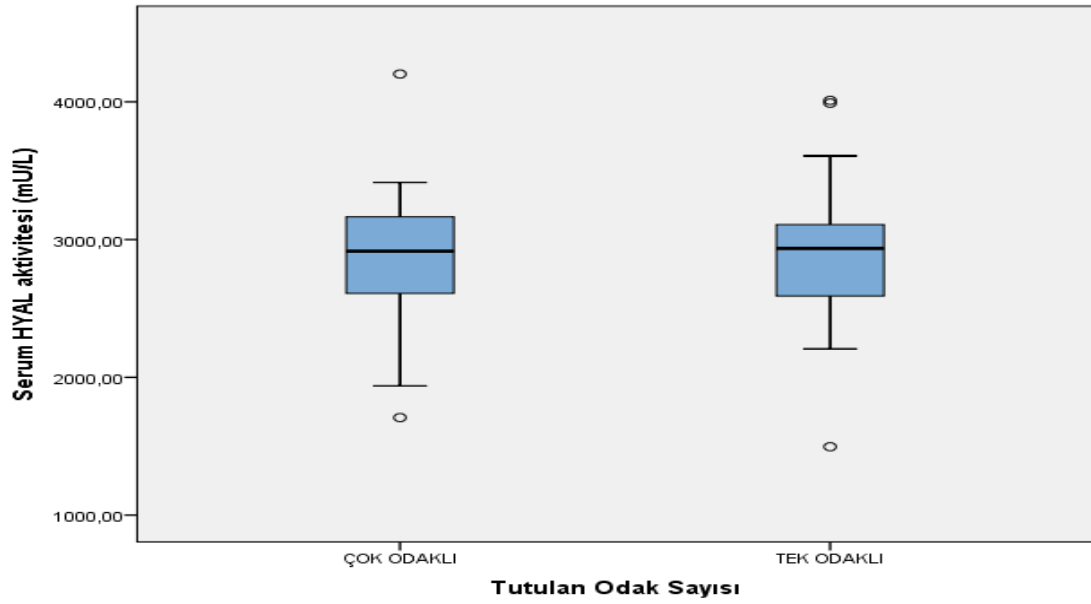
4.10. MK HASTALARININ HYAL AKTİVİTE ÖLÇÜMLERİ İLE TÜMÖR SAYISININ KARŞILAŞTIRILMASI

43 MK hastasına yapılan TUR-M sonuçlarından elde edilen verilerle tümör tutulum sayısı çok odaklı (multipl) (n = 22) ve tek odaklı (fokal) (n = 21) olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı. Grupların serum HYAL aktivitesi (mU/L) Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p >0.05). Tümörün tutulum sayısına göre gruplar şekil 12'de görülmektedir.



Şekil 11. Tümör boyutuna göre MK'li hastaların serum HYAL aktivitesi

° Kutudan 1.5 – 3 IQR (çeyreklikler arası aralık) uzaktaki değerler: uç değer

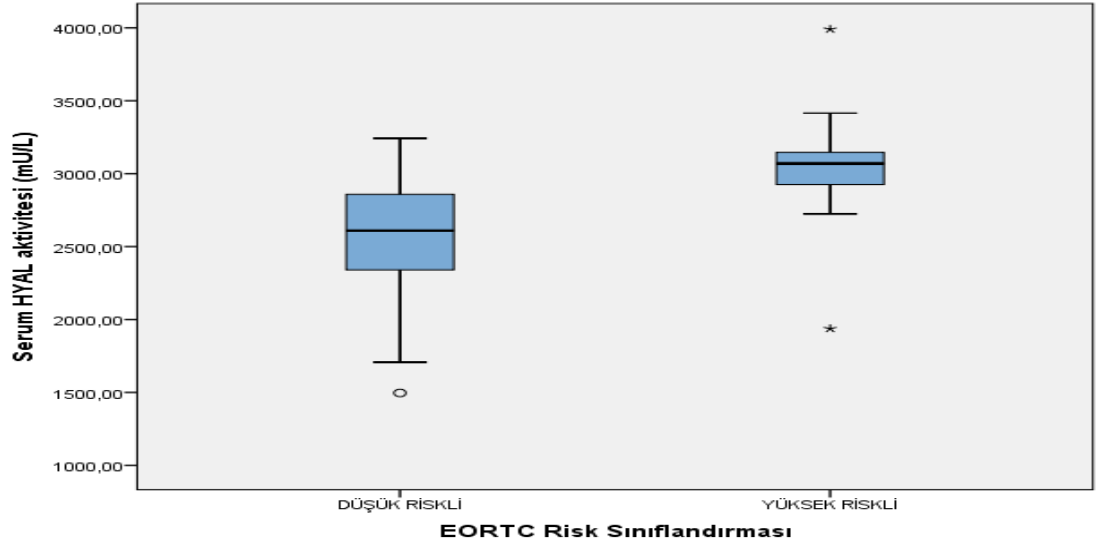


Şekil 12. Tümörün tutulum sayısına göre MK'li hastaların serum HYAL aktivitesi

° Kutudan 1.5 – 3 IQR (çeyreklikler arası aralık) uzaktaki değerler: uç değer

4.11. MK HASTALARININ HYAL AKTİVİTESİ İLE EORTC RİSK SKORUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

Avrupa Kanser Araştırma Ve Tedavi Topluluğu (EORTC) kasa invaze olmayan MK'leri düşük, orta ve yüksek riskli olmak üzere 3 gruba ayırmaktadır.



Şekil 13. EORTC risk skoruna göre serum HYAL aktivitesi

° Kutudan 1.5 – 3 IQR (çeyreklikler arası aralık) uzaktaki değerler: uç değer

* Kutudan 1.5 – 3 IQR (çeyreklikler arası aralık) uzaktaki değerler: aşırı uç değer

Bizim çalışmamızda orta derece riskli grup yoktu. 32 MK hastası düşük riskli (n = 11) ve yüksek riskli (n = 21) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Grupların serum HYAL aktivitesi (mU/L) Mann Whitney U testi ile değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p <0.05). EORTC risk skoruna göre gruplar Şekil 13'te görülmektedir.

4.12. TÜM GRUPLAR BİRLEŞTİRİLDİĞİNDE ÖLÇÜLEN DEĞİŞKENLER ARASINDAKİ KORELASYONLAR

Hasta (n = 43) ve kontrol (n = 43) gruplarında değişkenlerin ayrı ayrı ve birleştirilerek hesaplanan korelasyon katsayıları ve istatistiksel önemleri EK 3, 4, 5 ve 6'da verildi.

MK hasta grubu (n = 43) kendi içinde değerlendirildiğinde bulunan korelasyonlar aşağıdaki gibidir:

Serum HYAL aktivitesi ile total PSA arasında pozitif yönde zayıf korelasyon saptandı (r = 0.257, p = 0.12). Serum HYAL aktivitesi ile albumin (r = -0.226, p = 0.15) ve potasyum (r = -0.309, p = 0.04) arasında ise negatif korelasyon bulundu.

Klinik evre ile ALT ($r = 0.230$, $p = 0.14$), AST ($r = 0.232$, $p = 0.13$) ve paket/yıl sigara ($r = 0.210$, $p = 0.18$) arasında pozitif yönde zayıf korelasyon saptandı. Klinik evre ile potasyum arasında negatif yönde zayıf korelasyon bulundu (-0.256 , $p = 0.1$).

Patalojik evre ile içilen paket/yıl sigara arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı ($r = 0.495$, $p < 0.01$). Patalojik evre ile potasyum arasında negatif yönde zayıf bir korelasyon saptandı ($r = -0.273$, $p = 0.08$).

Tümörün tutulan odak sayısı ile sodyum arasında negatif yönde bir korelasyon izlendi ($r = -0.252$, $p = 0.10$).

Tümörün boyutu ile yaş arasında pozitif yönde zayıf bir korelasyon vardı ($r = 0.237$, $p = 0.13$). Tümörün boyutu ile üre, kreatinin arasında negatif bir korelasyon vardı ve sırasıyla $r = -0.204$, $p = 0.19$ $r = -0.247$, $p = 0.11$ ’dir.

EORTC risk skoru ile total PSA ($r = 0.401$, $p = 0.03$) ve vücut kitle indeksi ($r = 0.308$, $p = 0.09$) arasında pozitif yönde korelasyon bulundu. EORTC risk skoru ile yaş ($r = -0.277$, $p = 0.13$) ve potasyum (-0.374 , $p = 0.04$) arasında negatif yönde zayıf bir korelasyon bulundu.

Sigara (paket/yıl) ile kilo ($r = 0.284$, $p = 0.07$) arasında pozitif yönde zayıf bir korelasyon vardı. Buna rağmen sigara (paket/yıl) ile albumin düzeyleri arasında negatif yönde zayıf bir korelasyon bulundu ($r = -0.215$, $p = 0.17$).

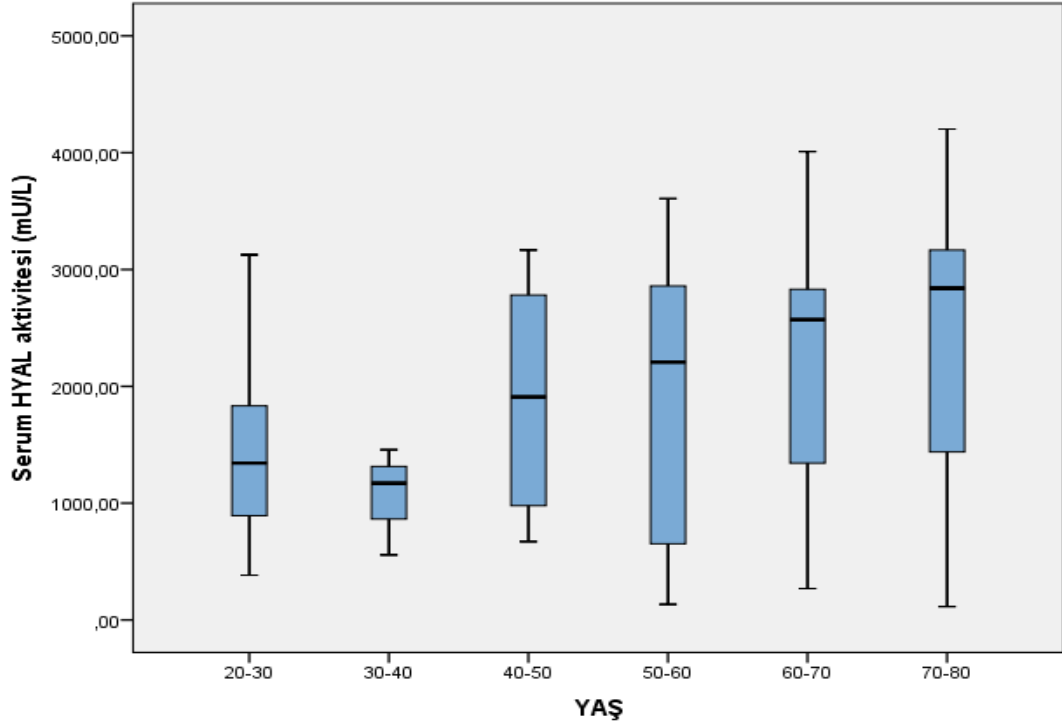
Tüm gruplar birleştirildiğinde ($n = 77$; 39 MK hastası, 38 kontrol grubu) serum HYAL aktivitesinin, üre ($r = -0.247$, $p < 0.05$), potasyum ($r = -0.253$, $p < 0.05$) ve paket/yıl olarak sigara kullanımı ($r = 0.211$, $p > 0.05$) ile zayıf bir korelasyon olduğu görüldü.

4.13. YAŞ İLE HYAL AKTİVİTE ARASINDAKİ İLİŞKİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Tüm gruplar birleştirildiğinde (hem MK ($n = 43$) hem de kontrol grubu ($n = 43$)) yaş ile HYAL aktivitesi arasında korelasyonu yapıldığına zayıf pozitif yönde korelasyon saptandı ($r = 0.274$; $p = 0.01$).

Tüm gruplardaki yaşlar dekadlar halinde 20-30 ($n = 11$), 30-40 ($n = 3$), 40-50 ($n = 10$), 50-60 ($n = 17$), 60-70 ($n = 23$) ve 70-80 ($n = 22$) olmak üzere 6 gruba bölünüp serum HYAL aktivitesinin normal dağıldığı Kolmogorov-Smirnov testi ile saptandıktan sonra ($p > 0.05$) grup karşılaştırılması Anova testi kullanılarak yapıldı ve

gruplar arasında serum HYAL düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) ama gruplar 55 yaştan büyük ve küçük olacak şekilde 2 alt gruba ayrılıp bağımsız t-testi ile değerlendirildiğinde de iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Tüm gruplardaki serum HYAL aktivitesinin dekadlarla ilişkisinin demografik



Şekil 14. Dekadlar ile serum HYAL aktivitesinin tüm gruplardaki ilişkisi

özellikleri Tablo 17’de ve box-plot grafiği Şekil 14’te gösterildi. Tüm gruplar birleştirildiğinde 55 yaş altı ve üstünün serum HYAL aktivitesinin demografik bilgileri Tablo 18’de ve box-plot grafiği Şekil 15’te gösterildi.

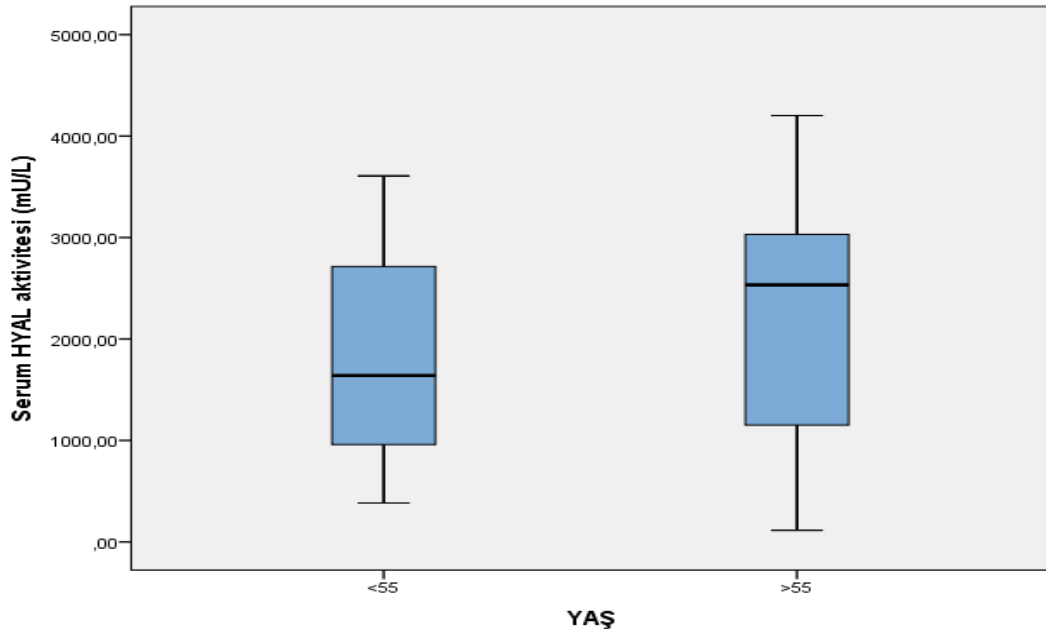
Tablo 17. Tüm gruplardaki serum HYAL aktivitesinin dekadlarla ilişkisi

Gruplar	1 (n:11)	2 (n:3)	3 (n:10)	4 (n:17)	5 (n:23)	6 (n:22)	p
Yaş Aralığı	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	
Yaş Aralığı ortalama	27	35	45	55	66	75	
Serum HYAL(mU/L)	1473	1062	1924	1858	2134	2434	>0,05

Tablo 18. Tüm gruplar birleştirildiğinde 55 yaş altı ve üstü serum HYAL aktivitesi

	<55 yaş (n:32)	>55yaş (n:54)	p
yaş $\bar{x} \pm s$	40 $\pm$ 11	68 $\pm$ 7	<0.05
SERUM HYAL (mU/L)	1838 $\pm$ 958	2110 $\pm$ 1143	>0.05

x: ortalama, s: standart sapma



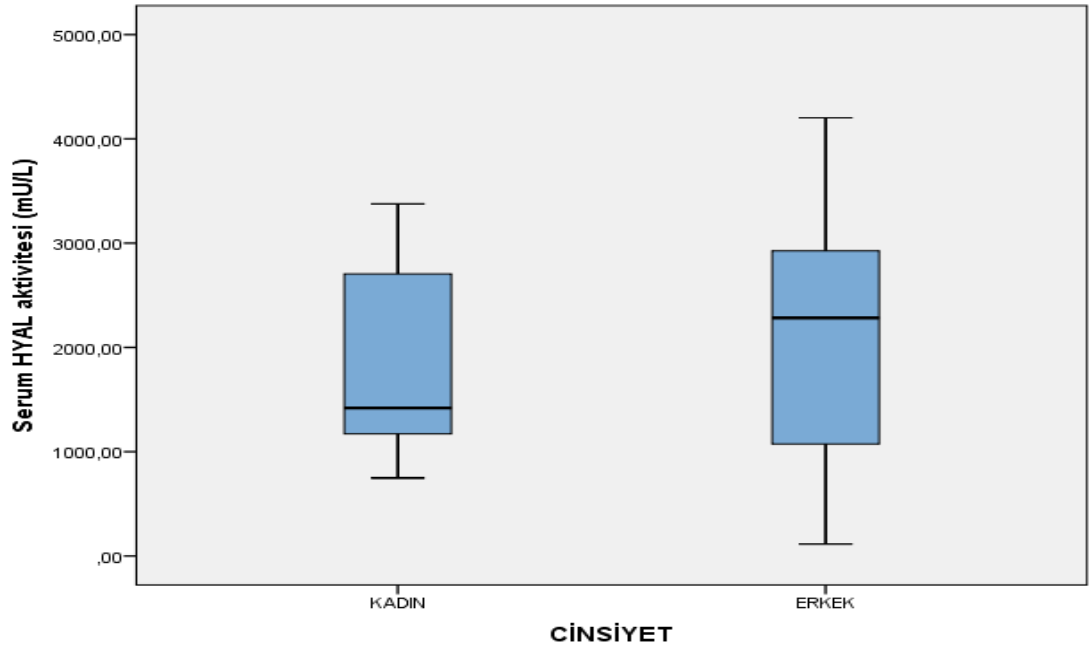
Şekil 15. Tüm gruplar birleştirildiğinde 55 yaş altı ve üstünün serum HYAL aktivitesi

4.14. CİNSİYET İLE SERUM HYAL AKTİVİTE (mU/L) ARASINDAKİ İLİŞKİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Tüm gruplar birleştirildiğinde kadın (n = 10) ve erkek (n = 76) birey vardı. Kadın ve erkek sayısı Kolmogorov-Smirnov testiyle normal dağılmadığı (p <0.05) ama serum HYAL aktivitesinin normal dağıldığı (p >0.05) bulunduktan sonra serum HYAL aktivitesinin cinsiyet üzerindeki ilişkisi Mann Whitney U testi ile değerlendirildi ve istatistiksel olarak anlamsız bulundu (p >0.05). Tablo 19’da serum HYAL aktivitesi (mU/L) ve her iki cinsiyetin demografik bilgilerini içermekte ayrıca Şekil 16’da box-plot grafiği görülmektedir.

Tablo 19. Tüm gruplar birleştirildiğinde cinsiyete göre serum HYAL aktivitesi

CİNSİYET	KADIN $\bar{x} \pm s$ (n:10)	ERKEK $\bar{x} \pm s$ (n:76)	p
Serum HYAL(mU/L)			
$\bar{x} \pm s$	1893 $\pm$ 999	2024 $\pm$ 1095	>0.05



Şekil 16. Tüm gruplar birleştirildiğinde cinsiyete göre serum HYAL aktivitesi

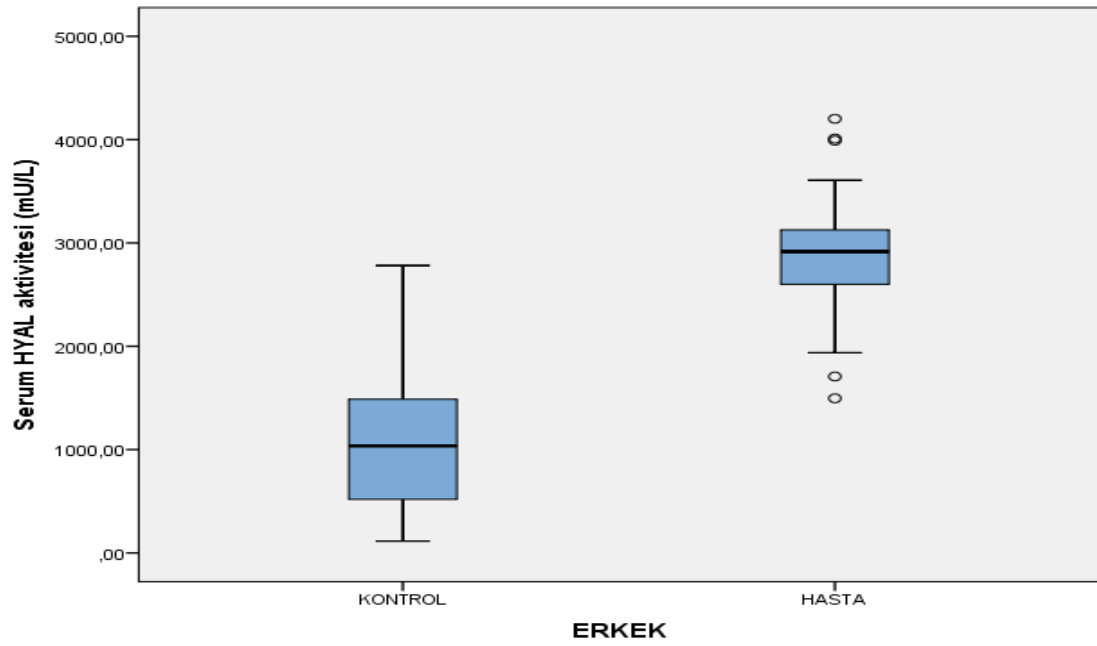
4.15. SADECE ERKEKLER ELE ALINDIĞINDA SERUM HYAL AKTİVİTESİNİN MK VE KONTROL GRUBUNDA KARŞILAŞTIRILMASI

Çalışmamızda kadın birey sayısı kontrol ve MK’li hasta grubunda sırasıyla 7 ve 3’tür. Çalışmadan kadınları çıkarıp sadece erkekleri ele alacak olursak kontrol ve MK’li hasta grubunda sırasıyla 36 ve 40’dır. Kolmogorov-Smirnov testiyle erkek sayısının normal dağıldığı gözlemlendikten sonra ($p > 0.05$) bağımsız t-testi ile iki grubun serum HYAL (mU/L) aktivitesi incelendiğinde MK’li erkek hasta ile sağlıklı erkekler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.01$). Tablo 20’de 40 MK ‘li erkek hasta ile 36 sağlıklı erkek hastanın serum HYAL aktivitesini göstermektedir. Şekil 17’de ise iki grubun box-plot grafiği görülmektedir.

Tablo 20. MK ve kontrol grubunda erkekler değerlendirildiğinde serum HYAL aktivitesi

ERKEK	KONTROL $\bar{x} \pm s$ (n:36)	HASTA $\bar{x} \pm s$ (n:40)	p
Serum			
HYAL(mU/L)	1083 $\pm$ 705	2872 $\pm$ 556	<0.01

x: ortalama, s:standart sapma



Şekil 17. Sadece erkeklere bakıldığında MK ve kontrol grubunda serum HYAL aktivitesi

° Kutudan 1.5 – 3 IQR (çeyreklikler arası aralık) uzaktaki değerler: uç değer

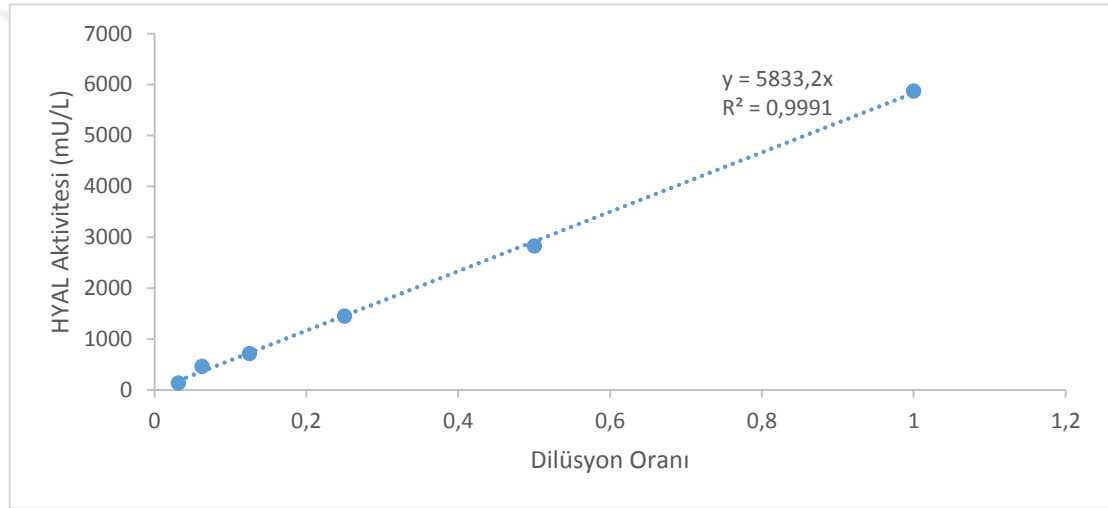
4.16. SERUM HYAL AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜNÜN PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

4.15.1. Doğrusallık Çalışması

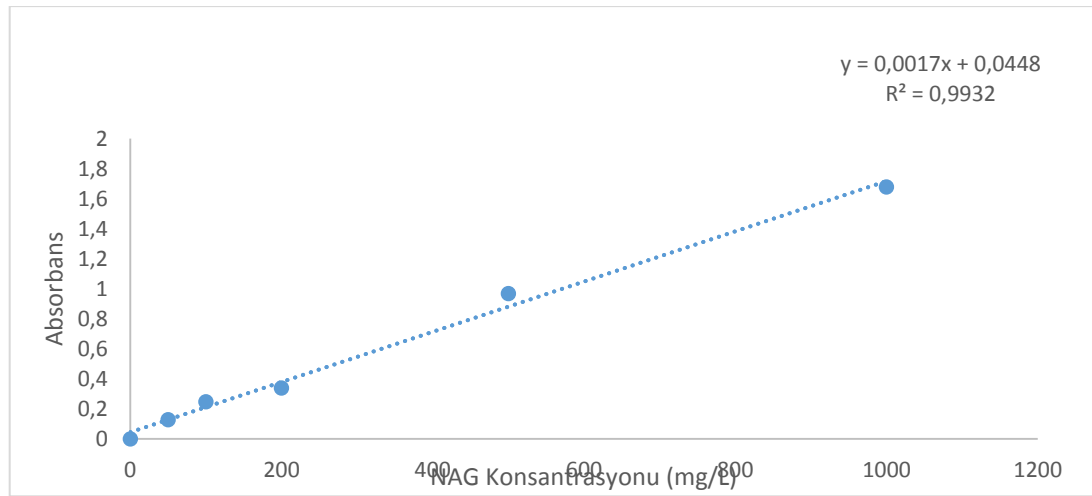
HYAL yüksek serum havuzu (5872 mU/L) ve bundan elde edilen seri dilüsyonlu numuneler (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) doğrusallık çalışması için kullanıldı. Yaptığımız doğrusallık çalışmasında yöntemin 142-5872 mU/L arasında lineer olduğu saptandı. Sonuçlar ve lineer regresyon grafiği tablo 21 ve şekil 18’de verilmiştir.

Tablo 21. Doğrusallık çalışmasında elde edilen HYAL aktivitesi ve seyreltme oranları

HYAL aktivitesi (mU/L)	Seyreltme oranları
5872	1/1
2833	1/2
1455	1/4
721	1/8
464	1/16
142	1/32



Şekil 18. Doğruluk çalışması sonuçlarının Lineer regresyon grafiği ve denklemi



Şekil 19. NAG konsantrasyon-absorbans lineer regresyon grafiği ve denklemi

4.16.2. N-Acetyl-D-Glukozamin'in Standart Absorbans Eğrisi

Seri dilüsyonlarla hazırlanan N-Acetyl-D-glucosamine (NAG) standart ölçümlerinin absorbans konsantrasyon grafiği Şekil 19'da gösterildi.

4.16.3. HYAL Kesinlik Çalışması

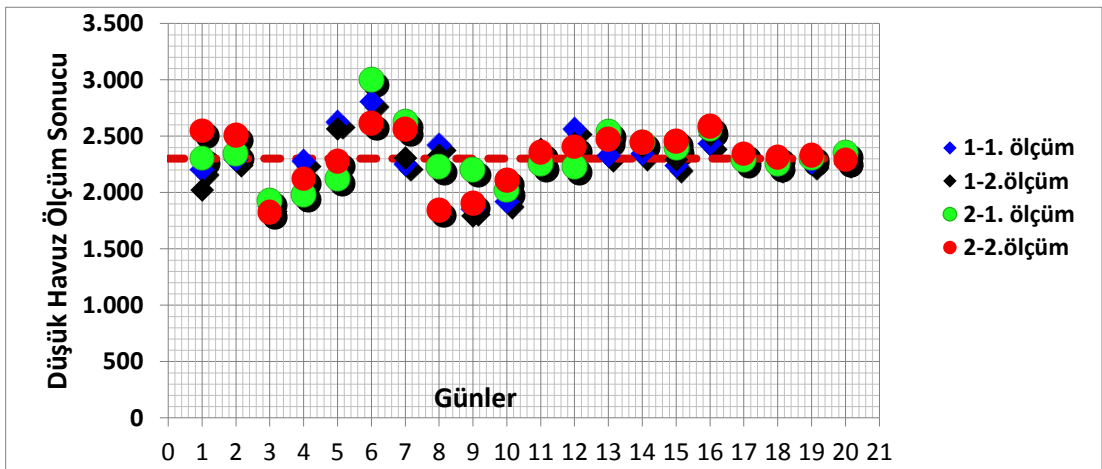
CLSI EP-5A önerileri doğrultusunda HYAL aktivitesi kesinlik çalışması için hazırlanan üç farklı konsantrasyondaki numuneler (düşük, orta, yüksek) 20 gün boyunca her gün 2 kez tekrarlanarak çift çalışıldı. Aynı kılavuzdaki formüllerle gün içi, günler arası ve laboratuvar içi standart sapmaları ve %VK hesaplandı. Sonuçlar düşük seviye için; Tablo 22 ve 23'te ve 20 günlük dağılımları Şekil 20'de orta seviye için; Tablo 24 ve 25'de ve 20 günlük dağılımları Şekil 21'de yüksek seviye için; Tablo 26 ve 27'de ve 20 günlük dağılımları Şekil 22'de gösterilmiştir.

Tablo 22. HYAL düşük seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları

	SABAH			AKŞAM			Total
Günler	1-1. ölçüm	1-2.ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2.ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	2201,986755	2021,707138	2111,846946	2305,003679	2549,668874	2427,336277	2269,591611
2	2292,126564	2382,266372	2337,196468	2343,635026	2511,037528	2427,336277	2382,266372
3	1880,058867	1802,796174	1841,42752	1931,567329	1828,550405	1880,058867	1860,743194
4	2279,249448	1931,567329	2105,408389	1983,075791	2124,724062	2053,899926	2079,654157
5	2626,931567	2562,54599	2594,738779	2124,724062	2279,249448	2201,986755	2398,362767
6	2807,211185	2614,054452	2710,632818	3000,367918	2614,054452	2807,211185	2758,922001
7	2253,495217	2305,003679	2279,249448	2626,931567	2562,54599	2594,738779	2436,994113
8	2420,897719	2330,75791	2375,827815	2227,740986	1841,42752	2034,584253	2205,206034
9	1854,304636	1789,919058	1822,111847	2201,986755	1905,813098	2053,899926	1938,005887
10	1918,690213	2060,338484	1989,514349	2021,707138	2111,846946	2066,777042	2028,145695
11	2279,249448	2382,266372	2330,75791	2253,495217	2356,512141	2305,003679	2317,880795
12	2562,54599	2433,774834	2498,160412	2227,740986	2408,020603	2317,880795	2408,020603
13	2330,75791	2549,668874	2440,213392	2536,791759	2472,406181	2504,59897	2472,406181
14	2343,635026	2408,020603	2375,827815	2446,65195	2446,65195	2446,65195	2411,239882
15	2240,618102	2292,126564	2266,372333	2395,143488	2459,529065	2427,336277	2346,854305
16	2433,774834	2511,037528	2472,406181	2562,54599	2588,300221	2575,423105	2523,914643
17	2305,003679	2330,75791	2317,880795	2292,126564	2343,635026	2317,880795	2317,880795
18	2240,618102	2292,126564	2266,372333	2253,495217	2317,880795	2285,688006	2276,030169
19	2266,372333	2305,003679	2285,688006	2305,003679	2330,75791	2317,880795	2301,7844
20	2279,249448	2253,495217	2266,372333	2356,512141	2292,126564	2324,319352	2295,345843
Ortalama	2290,8	2278,0	2284,4	2319,8	2317,2	2318,5	2301,5
SS	230,39	239,52	225,46	242,69	240,71	224,65	206,41
%CV	10,06	10,51	9,87	10,46	10,39	9,69	8,97

Tablo 23. HYAL düşük seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları

DÜŞÜK SEVİYE HAVUZ	
Çalışma içi %CV	4,71
Günler arası %CV	8,09
Çalışmalar arası %CV	4,34
Toplam %CV	10,32



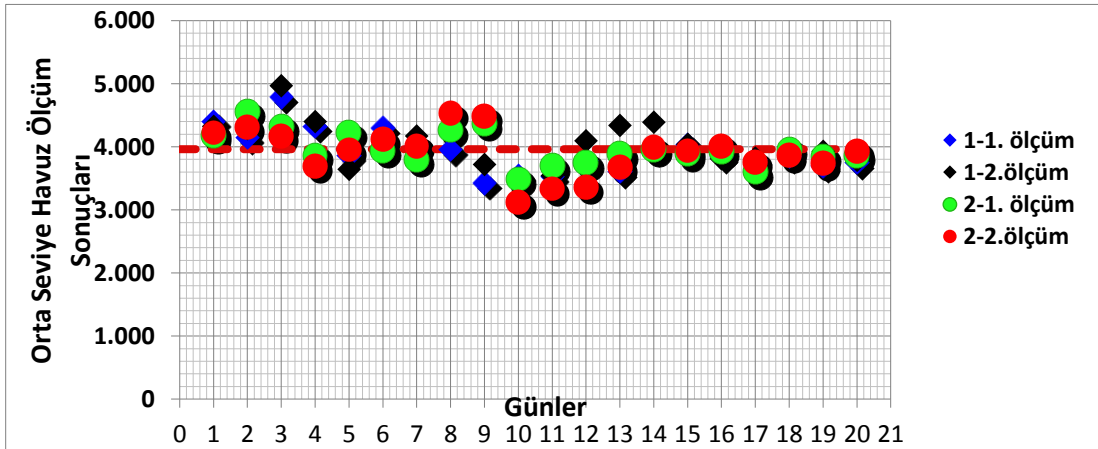
Şekil 20. HYAL düşük seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları

Tablo 24. HYAL orta seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları

Günler	SABAH (mU/L)			AKŞAM (mU/L)			Total (mU/L)
	1-1. ölçüm	1-2.ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2.ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	4404	4327	4365	4172	4224	4198	4282
2	4146	4288	4217	4558	4314	4436	4327
3	4790	4971	4880	4327	4172	4249	4565
4	4327	4404	4365	3863	3696	3779	4072
5	3863	3644	3754	4224	3953	4088	3921
6	4301	4134	4217	3940	4121	4031	4124
7	4018	4172	4095	3799	4018	3908	4002
8	3953	4301	4127	4262	4533	4398	4262
9	3425	3721	3573	4365	4481	4423	3998
10	3541	3155	3348	3490	3129	3309	3329
11	3528	3541	3535	3696	3335	3515	3525
12	3786	4095	3940	3747	3361	3554	3747
13	3606	4340	3973	3889	3683	3786	3879
14	3953	4391	4172	3953	3992	3973	4072
15	4043	4043	4043	3889	3940	3915	3979
16	3837	3812	3825	3928	4018	3973	3899
17	3799	3825	3812	3606	3760	3683	3747
18	3850	3889	3870	3953	3863	3908	3889
19	3696	3928	3812	3850	3734	3792	3802
20	3747	3786	3767	3863	3928	3895	3831
Ortalama	3930,7	4038,3	3984,5	3968,7	3912,7	3940,7	3962,6
SS	336,10	393,46	344,13	270,65	363,91	303,72	279,80
%CV	8,55	9,74	8,64	6,82	9,30	7,71	7,06

Tablo 25. HYAL orta seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları

ORTA SEVİYE HAVUZ	
Çalışma içi	4,26
Günler arası %CV	5,76
Çalışmalar arası %CV	4,93
Toplam %CV	8,69



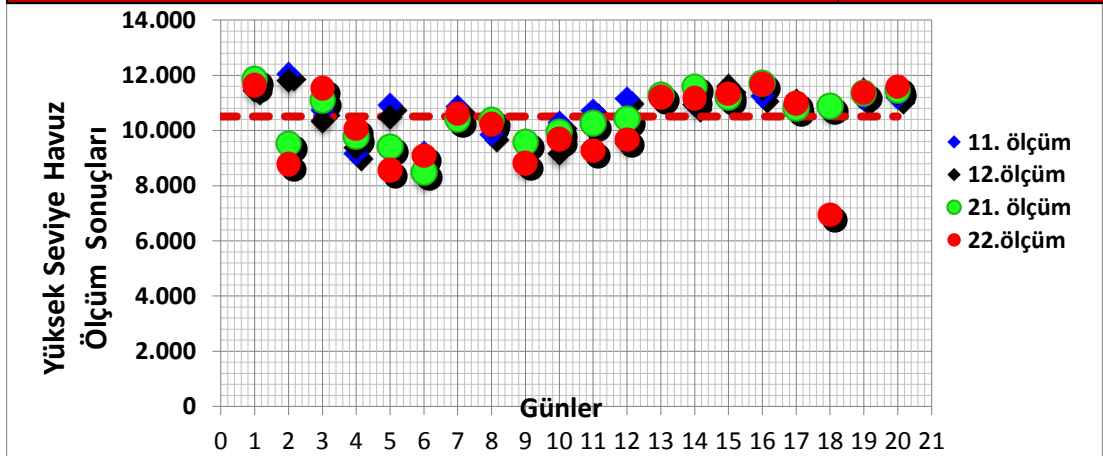
Şekil 21. Hyal orta seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları

Tablo 26. HYAL yüksek seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları

	SABAH			AKŞAM			Total
Günler	1-1. ölçüm	1-2.ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2.ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	11551	11448	11499	11860	11641	11750	11625
2	12040	11808	11924	9529	8782	9156	10540
3	10740	10340	10540	11100	11538	11319	10929
4	9169	9387	9278	9787	10070	9928	9603
5	10920	10495	10707	9413	8550	8982	9845
6	9181	8293	8737	8499	9091	8795	8766
7	10855	10701	10778	10405	10611	10508	10643
8	9851	10199	10025	10379	10224	10302	10163
9	9632	8692	9162	9568	8821	9194	9178
10	10276	9156	9716	9954	9684	9819	9767
11	10727	9400	10063	10263	9272	9767	9915
12	11164	9555	10360	10430	9671	10051	10205
13	11332	11345	11338	11280	11203	11242	11290
14	10946	10933	10939	11589	11164	11377	11158
15	11564	11615	11589	11203	11332	11267	11428
16	11255	11512	11383	11718	11680	11699	11541
17	10946	11074	11010	10817	10997	10907	10958
18	10855	10740	10797	10881	6954	8917	9857
19	11164	11461	11313	11345	11370	11358	11335
20	11203	11332	11267	11448	11589	11519	11393
Ortalama	10768,5	10474,2	10621,4	10573,4	10212,2	10392,8	10507,1
SS	777,15	1056,61	881,29	906,76	1321,93	1028,19	847,85
%CV	7,22	10,09	8,30	8,58	12,94	9,89	8,07

Tablo 27. HYAL yüksek seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları

YÜKSEK SEVİYE HAVUZ	
Çalışma içi	5,63
Günler arası %CV	6,85
Çalışmalar arası %CV	4,54
Toplam %CV	9,96



Şekil 22. HYAL yüksek seviye havuz kesinlik çalışması ve sonuçları

Tablo 28. HYAL geri kazanım çalışması

Oran	Beklenen değer (mU/L)	Ölçülen değer (mU/L)	R (%)
Y		8679	
3Y/1D	6696	6735	100,57
2Y/1D	6035	5898	97,72
1Y/1D	4713	4752	100,82
1Y/2D	3391	3451	101,77
1Y/3D	2730	2563	93,86
D		747	
Ortalama			98,95

D: düşük, Y: yüksek

4.16.4. Geri Kazanım Çalışması

HYAL için tüm havuzların ortalamaları üzerinden % geri kazanım (recovery) 98.95 hesaplandı. Sonuçlar Tablo 28’de gösterilmiştir.

4.16.5. Kör, Tayin ve Tespit Sınırı (LOB, LOD, LOQ)

LOB, LOD ve LOQ hesaplanmasında 20 kez çalışılan kör numune sonuçlarından elde edilen ortalama ve standart sapmalar kullanıldı. Kör numunenin ortalama (x_{kör}) ve standart sapması (skör) sırasıyla 788 mU/L ve 34 bulundu (Tablo 29) ve diğer hesaplamalar aşağıdaki formüllere göre yapıldı.

$$LOB = x_{kör} + 1.645 \cdot skör$$

$$LOD = x_{kör} + 3.3 \cdot skör$$

$$LOQ = x_{kör} + 10 \cdot skör$$

LOB, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 844, 901, 1129 mU/L olarak hesaplandı.

Tablo 29. HYAL kör okuma sınırı (LOB) belirleme çalışması

	BLANK (mU/L)
1. ölçüm	759
2. ölçüm	824
3. ölçüm	772
4. ölçüm	772
5. ölçüm	785
6. ölçüm	849
7. ölçüm	811
8. ölçüm	786
9. ölçüm	746
10. ölçüm	811
11. ölçüm	862
12. ölçüm	824
13. ölçüm	798
14. ölçüm	734
15. ölçüm	759
16. ölçüm	786
17. ölçüm	811
18. ölçüm	746
19. ölçüm	772
20. ölçüm	759
X	788,72
S	34,04
%VK	4,32

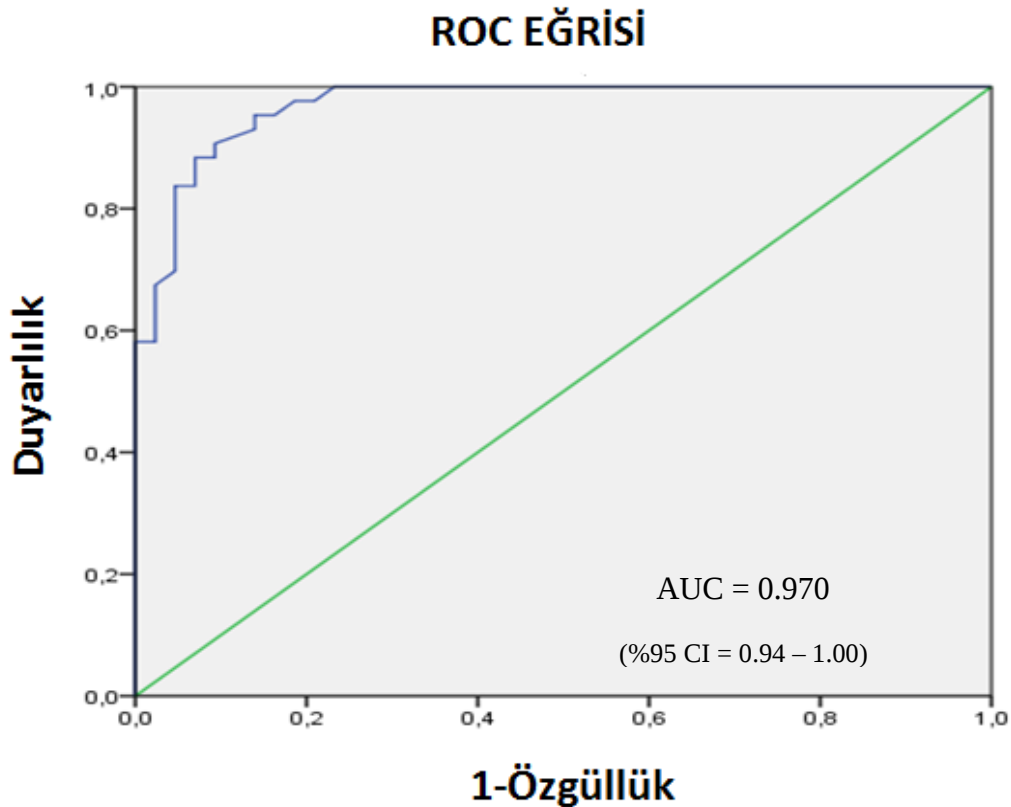
X: Ortalama, S: Standart sapma, VK: Varyasyon katsayısı

4.16.6. Serum HYAL Aktivitesinin Receiver Operating Characteristics (ROC) Grafiği, Kesim Değeri, Duyarlılığı, Özgüllüğü, Olabilirlik Oranları (Likelihood Ratio)

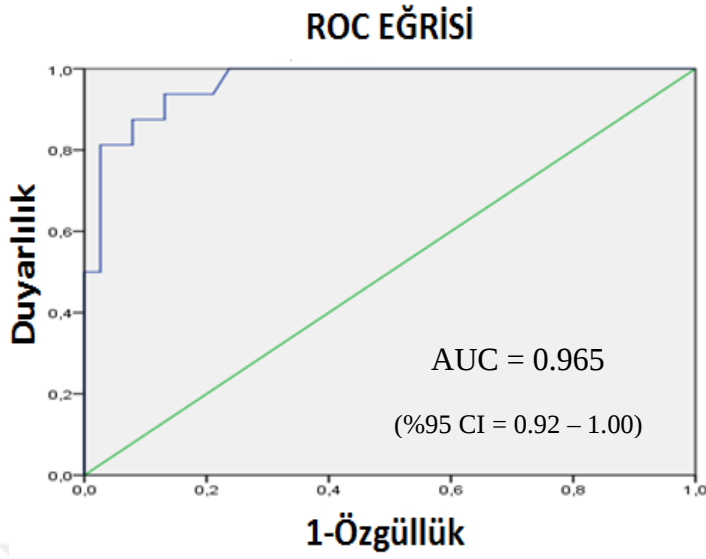
Biyopsi sonuçlarına göre serum HYAL aktivitesinin (mU/L) ROC eğrisi Şekil 23'te gösterildi. Eğri altında kalan alan (AUC) 0.97 bulundu. Tablo 30'da ise ROC eğrisinin koordinatları verildi. Bu tablodan optimum cut-off değeri Youden's indeksiyle ((spesifite+ sensitivite)-1) belirlendi ve 2235 mU/L olarak bulundu. Bu kesim değerine göre HYAL aktivitesinin hem duyarlılığı hem de özgüllüğü %90'dır.

$LR(+) = \text{Sensitivite} / (1 - \text{Spesipite})$; $LR(-) = (1 - \text{Sensitivite}) / \text{Spesifite}$ formülünden hesaplanır $LR(+)$ 9 ve $LR(-)$ 0,1 bulundu.

Ayrıca MK dışı tüm hastalıklar dışlandığında kalan MK (n = 16) hastaları ile yaşa göre eşleştirdiğimiz kontrol grubu (n = 38) hastasında da ROC analizini yaptık. Biyopsi sonuçlarına göre serum HYAL aktivitesinin (mU/L) ROC eğrisi Şekil 24'te gösterildi.



Şekil 23: Serum HYAL aktivitesinin (mU/L) ROC grafiği (n = 86; 43 MK, 43 kontrol hastası)



Şekil 24: Serum HYAL aktivitesinin (mU/L) ROC grafiği (n = 54; 16 MK, 38 kontrol hastası)

Tablo 30. Serum HYAL aktivitesinin (mU/L) ROC grafiğinin koordinatları (n = 86)

ROC eğrisinin koordinatları						
serumHYAL (mU/L)	Duyarlılık	1 - Özgüllük		serumHYAL (mU/L)	Duyarlılık	1 - Özgüllük
114	1,00	1,00		2072	0,93	0,14
125	1,00	0,98		2235	0,91	0,09
163	1,00	0,95		2283	0,88	0,09
201	1,00	0,93		2312	0,88	0,07
240	1,00	0,91		2331	0,86	0,07
307	1,00	0,88		2417	0,84	0,07
365	1,00	0,86		2532	0,84	0,05
412	1,00	0,84		2580	0,79	0,05
460	1,00	0,81		2600	0,77	0,05
518	1,00	0,79		2619	0,72	0,05
576	1,00	0,77		2638	0,70	0,05
624	1,00	0,74		2676	0,67	0,02
662	1,00	0,72		2715	0,65	0,02
691	1,00	0,70		2744	0,60	0,02
729	1,00	0,67		2772	0,58	0,02
796	1,00	0,65		2820	0,58	0,00
892	1,00	0,60		2878	0,56	0,00
959	1,00	0,58		2907	0,53	0,00
998	1,00	0,56		2926	0,49	0,00
1036	1,00	0,53		2945	0,47	0,00
1074	1,00	0,51		2993	0,44	0,00
1103	1,00	0,49		3051	0,40	0,00
1132	1,00	0,47		3079	0,35	0,00
1161	1,00	0,42		3098	0,33	0,00
1180	1,00	0,40		3118	0,30	0,00
1247	1,00	0,37		3146	0,26	0,00
1324	1,00	0,35		3194	0,21	0,00
1362	1,00	0,33		3233	0,19	0,00
1410	1,00	0,30		3252	0,16	0,00
1449	1,00	0,28		3319	0,14	0,00
1468	1,00	0,26		3396	0,12	0,00
1487	1,00	0,23		3511	0,09	0,00
1525	0,98	0,21		3799	0,07	0,00
1631	0,98	0,19		4000	0,05	0,00
1717	0,95	0,16		4106	0,02	0,00
1832	0,95	0,14		4203	0,00	0,00

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda MK hastalarında ve aynı semptomlara sahip ama MK tanısı almamış hastalarda serum HYAL aktivitesi ölçüldü. Bunun yanı sıra serum HYAL aktivitesi ölçüm yönteminin analitik ve klinik performansı değerlendirildi. Çalışmamızda MK'sı olan hastalarda serum HYAL aktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve kanserin klinik ve/veya patolojik evresiyle uyumlu olarak artış gösterdiği saptandı. Yöntemin klinik performansı MK hastalarının değerlendirilmesinde yararlı olabilir. Yöntem analitik performans açısından da yeterlidir.

MK, üriner sistemin en sık görülen kanseri olmakla birlikte dünya çapında kansere bağlı ölümler arasında dokuzuncu sırada yer almaktadır (2).

MK, sanayileşmenin artması ve insan ömrünün uzaması ile birlikte insidansı artan kanser türlerinden biridir.

MK'li hastaların tanı ve takibinde kullanılan rutin yöntemler sistoskopi ve USG eşliğinde şüpheli alan biopsileridir. Sistoskopi ve biyopsi sayısını azaltmak, hastanın hayat kalitesini bozmamak için MK tanısında invaziv olmayan tanı yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur.

Yüzeysel mesane tümörlerinde progresyon ve rekürens öngörmek için kullanılan birçok prognostik faktör test edilmiştir (9-11). MK'de günümüzde mevcut kullanılmakta olan belirteçlerin başında idrar sitolojisi, mesane tümör antijeni, nükleer matriks proteinleri, telomeraz, sitokeratinler (CK), fibrin ve fibrin yıkım ürünleri, survivin, urovisin ve HA ile HYAL gelmektedir (95). Bu belirteçlerin farklı avantaj ve dezavantajları vardır. Hepsinin de idrarda bakılması bir dezavantajdır. İdrar toplamadaki standardizasyon zorluğu ve her bireyde idrarda atılan total protein miktarı farklı olduğundan idrarda bakılan belirteçler yanıltıcı sonuç verebilir.

HA ile HYAL testi idrar, serum ve plazmada bakılabilmektedir (20). Birçok hastalık ve kanserde doku, serum ve idrarda farklı düzeylerde HYAL tespit edilmiştir (13-15). Serum ve plazmada ölçülen yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip MK biyobelirteçlerinin kullanılması MK'nin bilinen tanı ve takibine yeni bir bakış açısı kazandırabilir veya mevcut yöntemlerle birlikte kullanılabileceği gibi tek başına MK tanı ve takibinde daha etkili bir yöntem olarak da çalışılabilir. Güvenilir bir MK belirteci, taramada, uygun tedavi yönteminin seçiminde, tedaviye verilen yanıtın izlenmesinde, rekürrensin takibinde ve prognozun öngörülmesinde yarar sağlayacaktır.

HYAL'lar, HA metabolizmasında düzenleyici işlevlerinden dolayı dikkat ve önemi üzerine çekmiştir. HA'nın bir endoglikozidazı olan HYAL (EC 3.2.1.35) glikozaminoglikandaki β -1,4 glikozidik bağlarını yıkar, sonuçta oligosakkaritler (tetra ve hekza) oluşur. En büyük son ürün olarak da indirgeyici terminalde N-asetilglukozamin kalır.

En yaygın olarak kullanılan HYAL analizleri, N-asetil glukozamin oluşumunun veya HA yıkımına bağlı viskozite veya bulanıklık oluşumunun ölçümüne dayanmaktadır.

Serum ve plazma HYAL aktivitesi için biz bu çalışmada, Takahashi ve ark. kullandığı, indirgeyici terminalde oluşan N-asetilglukozamin'in kolorimetrik yolla saptanmasına dayanan yöntemi kullandık (93).

Literatürde, sağlıklı popülasyon için farklı serum HYAL aktivite değerleri verilmektedir. Örneğin, Wilkinson ve ark. serum HYAL düzeylerini ortalama ve standart sapma olarak 17.1 ± 3.6 U/L olarak bulmuşken, Natowicz ve ark. 4476 ± 1144 mU/L, Muckenschnabel ve ark. 1.4-1.8 U/L arasında, Laudat ve ark. 9.3 ± 1.7 U/L, Kucur ve ark. 2838 ± 417.67 mU/L bulmuşlardır (91, 96-99). Literatürdeki bu farklılıklar bizce kontrol grubunun özellikleri ve HYAL ölçümünde kullanılan yöntem farklılığından kaynaklanmaktadır. Aynı yöntemi kullanan (kolorimetrik) makalelerde bile çalışma prosedürleri arasında fark vardır. Bu farklılıkları inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığı, substrat konsantrasyonu, unite hesapındaki kullanılan keyfi birimler, ortamın pH'sı, santrifüj hız ve süreleri, numune miktarı olarak sayabiliriz.

Wilkinson ve ark. 37 °C'de inkübasyon süresini 24 saat tutmuşken, Natowicz ve ark., Laudat ve ark., Kucur ve ark. 37 °C'de 4 saat tutmuşlardır (96-99). Takahashi ve ark. ise 37 °C'de 15 dakika inkübasyon süresini kullanmışlardır (93). Çok uzun ön inkübasyon süresi enzimin inhibisyonuna yol açabilir ayrıca sonuç verme süresini uzatarak tanı ve tedaviyi geciktirebilir.

Makaleler arasındaki bir başka farklılık ortamdaki substrat konsantrasyonudur. HYAL enzimi substrat olarak HA'yı kullanmaktadır. Wilkinson ve ark. 4 mg/mL; Kucur ve ark., Natowicz ve ark., Laudat ve ark. 250 mg/L; Sharma ve ark. 50 mg/L ve Takahashi ve ark. ise 1,5 mg/mL HA konsantrasyonu kullanmışlardır.

Substrat konsantrasyonu enzim hızını etkiler. Enzimler için rutin çalışmalarda yeterli substrat miktarı 10 Km'dir. HYAL 1, insan plazmasından izole edilen ve

karakterize edilen ilk somatik HYAL'dır ve tümörlerde eksprese edilen ve sadece asidik pH'larda aktif olan ana HYAL'dır. HYAL enziminin pH= 3.9 daki Km'sinin 114 mg/L, Vmax'ının ise 5102 mU/L olduğu Natowicz ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (97). Buradan hareketle HYAL enzimi için yeterli substrat konsantrasyonunun en az 1140 mg/L olacağı düşünülebilir. Biz bu veriler doğrultusunda çalışmamızdaki HA miktarını 1.5 mg/mL (1500 mg/L) olacak şekilde substrat tamponunu hazırladık ve 50 µL serum örneği kullandık. Bu miktar reaksiyon ortamında 1250 mg/L substrat konsantrasyonuna karşılık gelir.

Farklı makalelerde farklı serum HYAL aktivite değerleri bulunması yazarların farklı üniteler (keyfi üniteleri, arbitrary units) kullanmasından da kaynaklanıyor olabilir. Bonner ve Cantey yaptığı bir çalışmada 0.1 mL hacimde 0.05 mg/mL bovine testiküler HYAL tarafından ortaya çıkan ürün N-asetil glukozamin miktarına 1 U/L diye tarif etmiştir (91). Diğer makaleler bir enzim ünitesini 37 °C'de 1 µmol substratı 1 dk'da ürüne dönüştüren enzim aktivitesi olarak klasik ünite tarifini kullanmıştır (89, 91, 97). Biz de çalışmamızda bu tanımlı kullandık ve ünite hesabını (HYAL aktivitesi U/L (µmol/dk/L))= $(\Delta A_{585}/dk \times 10^6 \times VT) / (\epsilon \times d \times VS)$ formülünden yaptık. Çalışmamızda ϵ (NAG'nin 585 nm'deki molar absorbtivite katsayısı) 20 850 L.mol⁻¹.cm⁻¹ bulundu. Bulduğumuz molar absorbtivite katsayısı Reissig ve ark. bulduğu ϵ katsayısı (21 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹) ile uyumludur (89). Wilkinson ve ark. 582 nm'de ϵ katsayısını 1570 ± 29.1 L.mol⁻¹.cm⁻¹ bulmuşlardır (96).

Enzim analizlerinde enzimin optimum aktivitesi için en uygun pH'da bir tampon kullanılır. HYAL'in optimum pH'sı için yapılan çalışmalarda kullanılan tampon pH'sı 2-5 arasında değişmektedir. Kucur ve ark.'ları, Natowicz ve ark.'ları, Laudat ve ark.'ları'da çalışmalarında pH: 3.9 kullanmışlardır (97-99). Serum HYAL'in optimum pH'sının, lizozomal enzimin pH'sı (pH: 3.5) ile benzer olduğu ve testiküler HYAL'in pH'sından (pH: 4.5-6) farklı olduğu bildirilmiştir (96). Biz yöntemimizde pH: 3.9'u kullandık. Serum HYAL aktivitesinin ağırlıklı olarak lizozomal kaynaklı olduğunu düşünerek bu pH'yı tercih ettik. Farklı çalışmalarda testiküler HYAL'in aktif olduğu pH aralığının kullanılması sonucu farklı değerlerin elde edilmesi olasıdır.

Yine farklı çalışmalarda 0.8 M tetraborat çözeltisinin pH değerleri 9.5 ile 11 arasında değişmektedir. Çalışmamızda pH: 10.5 kullanıldı. Kullandığımız kimyasal ve yapılan işlem Takahashi ve ark. ile benzerdir (93). Muckenschnabel ve ark. alkali borat

solüsyonunu borik asit (H_3BO_3), potasyum hidroksit (KOH) ve potasyum karbonat (K_2CO_3) kullanarak hazırlamışlar ve pH: 9.1'e ayarlamışlardır (72). Reissig ve ark. ise pH: 8.9'u tercih etmişlerdir (89). Biz çalışmamızda borat çözeltisinin pH'sını 9.1'e ayarladığımızda tetraborat çözünürlüğün daha az olduğunu gördük. Ayrıca pH 9.1'de saklama sırasında kristallenme pH 10.5'e göre daha fazla idi.

DMAB ayırıcının hazırlanışında da farklılıklar göze çarpmaktadır. İncelediğimiz tüm makalelerde DMAB stok çözeltisi, belli miktar DMAB'nin, konsantre HCl asit ve asetik asit içeren çözeltide çözünmesiyle hazırlanır. Çalışma sırasında stok ayıraç, asetik asitle seyreltilerek taze kullanılır. Makaleler arasındaki DMAB ayırıcının hazırlanışındaki fark DMAB miktarından ve stoktaki konsantre HCl asit ve asetik asit oranlarından veya çalışma ayırıcının seyretme oranından kaynaklanır. Sharma ve ark., 1 g DMAB'yi 1/9 oranında HCl/asetik asit karışımında çözerek stok hazırlamışlar ve çalışma sırasında bu stok'u 1/9 oranında asetik asitle seyretmişlerdir (100). Reissig ve ark. 10 g DMAB'yi 12.5/87.5 oranında HCl/asetik asit olacak şekilde stok hazırlayıp çalışma anında stoktan 1/9 oranında asetik asitle seyretmişlerken (89), Muckenschnabel ve ark. 20 g DMAB'yi 25/75 oranında HCl/asetik asit olacak şekilde stok hazırlayıp çalışma anında stoktan 1/4 oranında asetik asitle seyretmişlerdir (72). Biz çalışmamızda stok çözeltiyi 10 g DMAB'yi %12.5 10 N HCl ve %87.5 asetik asit çözeltisinde çözerek hazırladık, çalışma sırasında asetik asit ile 1/9 oranında seyrelterek kullandık.

Enzim reaksiyonunda türbiditeden kaynaklanan interferansı gidermek için daha önceki tüm makaleler santrifügasyon yapılmasını önermektedir. Ancak makaleler arasında santrifüj hızında farklılıklar göze çarpmaktadır. Muckenschnabel ve ark. reaksiyon ortamını 4° C'de 6000 g'de 10 dakika santrifüj etmişken, Wilkinson ve ark. 1500 g'de 10 dakika, Takahashi ve ark. 18000 g'de 10 dakika santrifüj etmişlerdir (91, 93, 96). Uzun süre yüksek devirde çalışmak hem zaman alıcıdır, hem de kullanılan tüplerin kırılma ihtimalini arttırabilir. Biz 6000 g'de 10 dakika ve 18000 g'de 10 dakika santrifüj işlemi sonrasında süpernatantların spektrofotometrik okumalarında fark olmadığını tespit ettik; bu yüzden santrifüj hızında Takahashi ve ark.'nın çalışmasına uymadık Wilkinson ve ark. gibi 10 dakika boyunca 4 ° C'de 1500 g'de santrifüj ettik.

Çalışmamızın hasta ve kontrol grubu, hematüri, irritatif mesane semptomları veya alt üriner sistem şikayetiyle Üroloji Kliniği'ne başvuran kişilerden seçildi. Hasta

grubu ileri incelemesinde MK tanısı konulan 43 kişiden oluşmaktaydı (40 E, 3K). Bu kişilerin demografik özelliklerini inceleyecek olursak 17'sinde hipertansiyon, 10'unda koroner arter hastalığı, 6'sında diabetes mellitus, 3'ünde astım, 3'ünde kronik obstrüktik akciğer hastalığı ve 2'sinde gut hastalığı mevcuttu. HYAL aktivitesi yüksek olabilecek başka tümör tanısı konulan, karaciğer hastalığı, romatolojik hastalıklar, transplant hastaları, dermatolojik rahatsızlığı ve kollajen doku hastalığı olanlar hasta ve kontrol grubuna dahil edilmedi.

Çalışmamızın kontrol grubu, 7'si kadın, 36'sı erkek olmak üzere 43 kişiden oluşmaktadır. Kontrol grubu da kliniğe aynı semptomlarla başvuran hastalardan oluşturulmuştur. İleri incelenmede, kontrol grubunda 13 üriner sistem enfeksiyonu, 12 üriner sistem taş hastalığı, 5 benign prostat hiperplazisi, 4 nörojenik mesane, 4 üretra darlığı, 3 aspirin kullanımına bağlı hematüri ve 2 egzersiz hematürisi saptandı.

MK riskini arttırdığı bilinen meslekler; oto sanayi işçileri, boyacılar, kamyon şoförleri, matkap operatörleri, deri işçileri, metal işçileri, tornacılar ve organik kimyasallar içeren mesleklerde çalışan kuru temizleme işçileri, kağıt sanayi çalışanları, halat ve sicim yapım işçileri, diş teknisyeni, berber ya da güzellik uzmanları, doktor, giyim sanayi çalışanları ve tesisatçılardır (101). Bizim hasta grubumuzun meslekleri sorgulandığında risk grubuna giren mesleklerde çalışan 10 kişi vardı ve meslekleri mobilyacı, marangoz, benzinlikte işçi, kaynakçı, sağlık teknisyeni, boyacı, kuru temizleme çalışanı idi. Ayrıca 11 kişi mesleğini serbest meslek olarak tanımlayıp farklı işlerle meşgul olduklarını ama genel olarak sanayide işçi olarak çalıştıklarını belirtmiştir. Az sayıdaki hasta grubundan elde edilen bu veriler bile, MK'nin meslekle ilişkisinin ne denli büyük boyutlarda olduğunu gözler önüne sermektedir.

Mesleği sanayide kantar işçisi olan bir MK hastasının yoğun egsoz dumanına maruz kalma öyküsü mevcuttu. Çevresel faktörlerden egsoz dumanına aşırı maruz kalmak da MK riskini arttırmaktadır. Ayrıca şehirde yaşamak da hava kirliliği yönünden MK riskini arttırmaktadır. Bizim hastalarımızın 33'ü anamnezinde Ankara'da ikametgah ettiğini belirtmiştir.

Radyasyon ve kemoterapiye bağlı tespit edilen MK'ların, çoğu zaman yüksek dereceli ve lokal invaziv olduğu görülmüştür (102). Hasta grubumuzdaki iki kişi emekli radyoloji teknisyeniydi. Buradan yola çıkarak maruz kalınan radyasyon ile MK arasında ilişki olduğu yorumu yapılabilir.

MK'lı hastaların birinci derece akrabalarında MK gelişme riski, aile öyküsü olmayan kişilere göre iki kat fazladır (103). Bizim hasta grubumuzdan 4 kişide birinci derece akrabalarında kanser tanısı konulmuştur. (İki hastanın babasında, bir hastanın ağabeyinde, bir hastanın annesinde).

Tüketilen toplam sıvı miktarı ile, MK gelişimi arasında çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bazı çalışmalarda pozitif ilişki saptanmışken, bazı çalışmalarda ilişki bulunmamasına rağmen yüksek miktarlarda sıvı tüketiminin, idrardaki metabolitleri sulandırdığı ve idrara çıkma sıklığını arttırdığı, dolayısı ile mesane epitelinin kanserojenlerle temasını azalttığından MK'ya karşı koruyucu olduğu yönünde yorumlar yer almaktadır (104, 105). Bizim hasta grubumuzda günlük tüketilen su miktarı ortalama ve standart sapması 1.82 ± 0.82 L'dir.

Yeni tanı almış MK vakaların %70-80'i non-invaziv veya erken invazivdir (27, 28, 32). Non-invaziv vakalar %50-70 oranında rekürrens ve %5 oranında kas invaziv hastalığa progresyon gösterir (32). Bizim çalışmamızda yüzeysel MK tanısı alan 32 hastanın 8'inde (%25) rekürrens mevcuttu. Çalışma grubumuzda yüzeysel MK tanısı alan hasta sayısı az olduğundan yüzdeler değeri literatürden düşük olabilir.

5.1. MK VE KONTROL GRUPLARINDAKİ SERUM VE PLAZMA HYAL AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

MK (n= 39) ve kontrol grubuna (n=38) ait serum HYAL aktivite ölçümünün ortalamaları ve standart sapmaları sırasıyla 2866 ± 497 mU/L, 1109 ± 683 mU/L bulundu. Hasta grubunda serum HYAL aktivite düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu görülmektedir ($p < 0.01$).

Numune içindeki çok düşük konsantrasyonlardaki analitin ölçümünden elde edilen sinyallerin kör numuneden ayrımının yapılması gerekir. LOD, kör numune veya sıfır kalibratör dışında tespit edilebilen en küçük konsantrasyondur. Bizim HYAL performans çalışmalarında LOD değerimizi 901 mU/L bulduk. Kontrol grubumuzdaki 16 hastanın serum HYAL değeri LOD değerinin altındadır. Bazı yazarlar sağlıklı bireylerde serum ve plazmada HYAL düzeylerinin çok düşük hatta saptanamayacağını belirtmiştir (96).

MK'lı hastaların 27'sinde diabetes mellitus, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı mevcuttu. Bu üç klinik durumda serum HYAL aktivitesinin arttığı

belirlenmektedir (99). Bu üç hastalığı çıkardığımızda 16 MK'lı hasta kaldı. Bu 16 hasta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum HYAL aktivitesinin hasta grubunda anlamlı yükseklik gösterdiği görüldü ($p < 0.01$). Bu bulgulardan serum HYAL aktivitesinin kontrol grubu ile MK hastaları arasında çok iyi bir ayırım yaptığı anlaşılmaktadır. Bu bulgu, aynı zamanda, MK dışı tüm hastalıklar dışlandığında ($n = 16$), herhangi bir dışlama yapılmadığı durumdaki ($n = 39$) bulguyla benzerdir. Bu da HYAL aktivitesinin MK tanısı ve takibi için değerini artırmaktadır.

MK ($n = 39$) ve kontrol grubuna ($n = 38$) ait plazma HYAL aktivite ölçümlerinin, ortalamaları, standart sapmaları sırasıyla 2862 ± 533 mU/L, 1088 ± 606 mU/L bulundu. Hasta grubunda plazma HYAL aktivite düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu görülmektedir ($p < 0.01$).

MK'lı ($n = 39$) hastaların hem serum hem de plazma HYAL aktivite ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları sırasıyla 2866 ± 497 mU/L, 2862 ± 533 mU/L bulundu. Kontrol grubun serum ve plazma HYAL aktivite ölçümlerinin ortalamaları, standart sapmaları sırasıyla 1109 ± 683 mU/L, 1088 ± 606 mU/L bulundu ve serum HYAL değerleri ile plazma HYAL değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0.05$). Birçok çalışmada serum ve plazma HYAL ölçüm prensiplerinin aynı olduğu görülmektedir. Kucur ve ark., Takahashi ve ark., Natowich ve ark. da yaptıkları çalışmada serum ve plazma HYAL değerleri arasında fark bulmamışlardır (93, 97, 99). Natowich ve ark yaptığı çalışmada serum HYAL düzeyleri 3027 ± 710 mU/L ve plazma HYAL düzeyleri 3280 ± 526 mU/L'dir (97). Buradan serum ve plazma HYAL aktivitesinin birbirinin yerine kullanılabileceği yorumuna varılabilir ve biz de çalışmamızda serum ve plazma HYAL aktivitesi arasında yüksek pozitif yönde korelasyon bulduk ($r = 0.975$, $p < 0.01$).

5.2. MK HASTA GRUBUNDA EVRELERE GÖRE SERUM HYAL AKTİVİTESİ

Kırk üç MK hastası klinik evresine göre Ta ($n = 17$), CIS ($n = 5$), T1 ($n = 10$), T2 ($n = 9$) ve T3 ($n = 2$) olmak üzere 5 gruba ayırdı. MK hastalarının klinik evreye göre ortalama serum HYAL düzeyleri Ta = 2565 ± 383 mU/L; CIS = 2624 ± 659 mU/L; T1 = 3100 ± 436 mU/L; T2 = 3140 ± 256 mU/L ve T3 = 4105 ± 135 mU/L bulundu. Grupların serum HYAL aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p

<0.05). Gruplar 2'li incelendiğinde grup 1 ile 2; grup 3 ile 4 arasında anlamlı fark yoktu. T3 (n = 2) evresinde olan MK hastalarının, serum HYAL düzeyleri, diğer tüm evrelerden anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu sonuçlara göre, HYAL aktivitesi hastalık evresiyle orantılı denilebilecek bir artış göstermektedir. Özellikle ileri evrelerde HYAL aktivitesi büyük artış göstermiştir. Dolayısıyla HYAL aktivitesi hastalık takibinde de yararlı olacak potansiyele sahiptir. Daha çok hastada yapılacak çalışmalar evre ile serum HYAL aktivitesi arasındaki ilişkiyi kuvvetlendirecektir.

Ayrıca 2004 WHO patolojik evre sınıflandırmasına göre hasta grubu, papillom (n = 10), DMP-PUN (n = 15), düşük dereceli (n = 12) ve yüksek dereceli (n = 6) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Serum HYAL düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları; papillom'da = 2357 ± 484 mU/L; DMP-PUN'da = 2795 ± 325 mU/L; düşük dereceli evrede = 3028 ± 246 mU/L; ve yüksek dereceli evrede = 3725 ± 406 mU/L bulundu. Grupların serum HYAL aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p <0.05). Yüksek dereceli evre (n = 6), diğer tüm evrelerden anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu bulgular da yukarıda vardığımız, klinik evrelendirme ile HYAL aktivitesi arasındaki ilişkiye yönelik sonuçları desteklemektedir. Nitekim, hastaların serum HYAL aktivitesi ile klinik evresi ve patolojik evresi arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı (sırasıyla $r = 0.639$, $p < 0.01$; $r = 0.749$, $p < 0.01$).

Mukoza veya submukozaya sınırlı MK mevcut hastaların yaklaşık %75'ini oluşturur ve bunlara yüzeysel MK denir. Bu evrede olmayan MK'ler kas invaziv mesane tümörleri olarak isimlendirilmiştir. Yüzeysel mesane tümörlerinin yüksek prevalans ve düşük progresyona sahip olması uzun süreli sağkalım oluşturmaktadır. Kas invaziv MK olan hastalar kansere özgü mortalite açısından daha yüksek risk oluşturmaktadır (6). Bizim hastalarımızın 32'si (%74.42) yüzeysel MK'ye sahipti (Ta (n = 17), CIS (n = 5), T1 (n = 10)) ve 11 hasta ise (%25.58) yüzeysel olmayan (kas invaziv) MK tanısına sahipti (T2 (n = 9) ve T3 (n = 2)). Bizim hasta grubumuzdaki bu dağılım literatür bilgisi ile uyumlu bulunmaktadır.

EORTC, yüzeysel MK'leri, progresyon ve rekürrensi değerlendirmek amaçlı düşük, orta ve yüksek riskli olmak üzere 3 gruba ayırmaktadır (106). Bizim çalışmamızda EORTC risk grubuna göre orta derece riskli gruba giren MK hastası yoktu. Yüzeysel MK hastalarımız (n = 32), düşük riskli (n = 11) ve yüksek riskli (n = 21) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Grupların serum HYAL aktivitesi düşük riskli olanlarda

2587 $\pm$ 437 mU/L iken yüksek riskli olanlarda 3036 $\pm$ 491 mU/L bulundu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p <0.05). EORTC risk skoru ile hastaların serum HYAL düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon saptandı (r = 0.435, p = 0.01). Bu bulgular da yüzeysel MK hastalarında HYAL aktivitesinin yüksek risk grubunda daha yüksek olduğunu göstermektedir.

MK hastalarına yapılan TUR-M sonuçlarından elde edilen verilere göre tümör tutulum sayısı çok odaklı (n = 22) ve tek odaklı (n = 21) olmak üzere iki alt gruba ayrıldı. Grupların serum HYAL aktivitesi çok odaklı tutulumu olanlarda 2856 $\pm$ 522 mU/L iken tek tutulumu olanlarda 2922 $\pm$ 578 mU/L bulundu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p >0.05). Ayrıca TUR-M sonuçlarından elde edilen verilerle hasta grubu tümör boyutu 3 cm'den büyük (n = 27) ve küçük (n = 16) olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı. Tümör boyutu 3 cm'den büyük olan grupta serum HYAL aktivitesi 2743 $\pm$ 425 mU/L iken, 3 cm'den küçük olan grupta ortalama ve standart sapması 2974 $\pm$ 595 mU/L bulundu. Tümörün boyutu ile serum HYAL düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p >0.05). Ancak, TUR-M'de bakılan tümörün tuttuğu odak sayısı ile tümörün boyutu arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon bulundu (r = 0.367, p = 0.02).

ELISA yöntemiyle idrarda HYAL (μ /mg) düzeylerine bakılan bir çalışmada evre arttıkça (özellikle G3) idrarda HYAL düzeylerinin arttığını bulmuşlardır. Aynı çalışmada yüzeysel MK için HYAL düzeylerini %89 duyarlılık ve %83 özgüllükte bulmuşlardır (106).

ELISA yöntemiyle dokuda yapılan bir çalışmada hem patolojik hem de klinik evre arttıkça doku HYAL düzeylerinin arttığını bulmuşlardır. Bu çalışmada doku HYAL düzeyleri için %78.3 duyarlılık ve %75.3 özgüllük saptamışlardır. Ayrıca tümörün rekkürensisi için HYAL-1'in bağımsız prognostik faktör olduğunu bulmuşlardır (107).

5.3. HASTA VE KONTROL GRUPLARINDA YAŞ VE CİNSİYET İLE HYAL AKTİVİTESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

MK çocukluk dönemi dahil her yaşta görülebilmektedir. Ancak genel olarak orta ve ileri yaşların hastalığıdır ve MK'nin tanı yaşı erkeklerde ortalama 69, kadınlarda ise 71'dir (30). Ayrıca MK insidansı yaşla birlikte artış gösterir. Hasta grubumuzun

cinsiyet farkı gözetmeden yaş ortalaması ve standart sapması 63 ± 13 yıl bulunmuştur. Hasta grubunda az sayıda kadın vardı ve MK sıklıkla erkeklerde görüldüğünden beklenen bir dağılımdı. Cinsiyete göre yaş ortalamasına da baktık. Erkekler için 62 ± 13 yıl; kadınlar için 73 ± 1 yıl bulduk. Kontrol grubunun cinsiyet farkı gözetmeden yaş ortalaması 52 ± 17 yıl, erkekler için 59 ± 15 yıl bulundu. Kontrol ve hasta grubunun yaş ortalamaları ve standart sapmaları cinsiyet ayrımı yapılmadan karşılaştırıldığında hasta grubunun yaş ortalaması kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$). Bu bulgu da göstermektedir ki, MK sıklığı yaş ilerledikçe artmaktadır. Kontrol ve hasta grubu cinsiyete göre karşılaştırıldığında erkeklerde anlamlı fark görülmedi ($p > 0.05$). Ayrıca kontrol ve hasta grubunda erkek ve kadın sayıları karşılaştırıldığında da anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Başlangıçta hasta ve kontrol grubunun yaş ortalamasında anlamlı fark olduğundan çalışmamızda uç değerleri çıkardık. Böylece yaş farkı kalktı ancak MK hasta sayımız 39, kontrol sayımız ise 38'e düştü. Çalışmamız literatürle kıyaslandığında erkeklerde yaş ortalaması daha düşük bulunmuşken, kadınlarda yaş ortalaması benzer bulunmuştur. Bu farklılık ülkelerin gelişmiş derecelikleri ile hastaların farklı coğrafi bölgelerde yaşamasından kaynaklanabilir.

Tüm gruplar birleştirildiğinde ($n = 86$) (hem MK hem de kontrol grubu) yaş ile HYAL aktivitesi arasında zayıf ama anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($r = 0.274$, $p = 0.01$). Ancak tüm denek grubu ($n = 86$) 10'ar yıllık dilimlere bölündüğünde, yaş ile birlikte HYAL aktivitesinde bir artış görülmesine rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Gruplar >55 yaş ($n = 54$) ve <55 yaş ($n = 32$) olacak şekilde 2 alt gruba ayrıldığında; 55 yaşından küçük olanlarda serum HYAL düzeylerinin ortalaması 1838 ± 958 mU/L iken 55 yaşından büyük olanlarda 2110 ± 1143 mU/L bulundu. 55 yaşın üzerinde serum HYAL aktivitesi daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$). Sonuç olarak, HYAL aktivitesi artan yaş ile birlikte yükselmemektedir.

Tüm gruplar birleştirildiğinde 10 kadın ve 76 erkek birey vardı. Kadın serum HYAL düzeyleri 1893 ± 999 mU/L iken, erkek serum HYAL düzeyleri 2024 ± 1095 mU/L bulundu. Erkek serum HYAL seviyeleri daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak cinsiyet ile serum HYAL aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0.05$). Bonner ve Cantey, 18 normal yetişkinde yaptığı çalışmada yaş ve cinsiyet ile serum HYAL düzeyleri arasında fark bulmamışlardır (91). Northup ve

ark. tarafından yapılan çalışmada erkeklerde serum HYAL düzeyleri kadınlardan daha yüksek bulunmuştur ancak yaşla serum HYAL düzeyleri arasında herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (108). Wilkinson ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 55 yaş altında serum HYAL değerlerini 17.8 ± 3.8 U/L bulmuşken 55 yaşın üstünü 16.4 ± 3.3 U/L bulmuşlar ve bağımsız t-testi ile karşılaştırdıklarında p değerini 0.05 ile 0.01 arasında bulmuşlardır (96). Bu çalışmalarda yaş ve cinsiyette serum HYAL düzeyleri arasında anlamlı fark olmaması serumdaki HYAL'ın kaynağının testiküler doku olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda kadın sayısı kontrol ve MK'li hasta grubunda sırasıyla $n = 7$ ve 3 kişi olmak üzere çok az sayıdaydı. MK sıklıkla erkeklerde görüldüğünden çalışmadan kadınları çıkarıp sadece erkekleri ele alacak olursak kontrol ve MK'li hasta grubunda erkek sayısı sırasıyla 36 ve 40 olur. İki grubun serum HYAL aktivitesi incelendiğinde MK'li erkek hastalarda 2872 ± 556 mU/L iken sağlıklı erkeklerde 1083 ± 705 mU/L'dir ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0.01$). Bu bulgu da MK'si olan ve olmayan hastaların ayrımında HYAL aktivitesinin değerli olabileceğini göstermektedir.

5.4. MK VE KONTROL GRUBUNUN SİGARA İÇİMİ YÖNÜNDEN SERUM HYAL AKTİVİTESİ

Sigaradaki karsinogenik maddelerin yanı sıra, sigaranın kendisi de mesane epitelinin proliferatif hızını arttırıp diğer karsinogenlerin etkisini tetiklediğinden sigara, MK etiyojisinde en önemli faktör olarak tanımlanmıştır. Hastalarımızdan 33'ü sigara içerken, 10'u içmiyordu. Sigara içen ($n = 33$) bireylerin yılda tükettiği paket sayısı ortalama 30 ± 25 'tir. Kontrol grubumuzdaki deneklerin 28'i sigara içerken, 15'i içmiyordu. Sigara içen bireylerin ortalama paket /yıl değeri 25 ± 23 'tür. Kontrol ve hasta grubu sigara kullanımı yönünden karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Tüm gruplar birleştirildiğinde ($n = 86$) deneklerin 61'i sigara içiyordu, 25'i sigara içmiyordu. Sigara içenlerin serum HYAL aktivitesinin ortalama ve standart sapması 2154 ± 1146 mU/L iken içmeyenlerin serum HYAL aktivitesinin ortalama ve standart sapması 1655 ± 162 mU/L'dir. Sigara içenlerde serum HYAL aktivitesi içmeyenlere oranla anlamlı yüksek bulundu ($p < 0.05$). Serum HYAL düzeyleri ile, paket/yıl olarak

sigara kullanımı arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı ($r = 0.481$, $p < 0.01$). Paket/yıl olarak sigara kullanımı ile hastanın klinik ve patolojik evresine göre sıralanan HYAL aktivitesi arasında pozitif yönde bir korelasyon bulundu ve sırasıyla, $r = 0.210$, $p = 0.177$; $r = 0.495$, $p < 0.01$ bulundu. Buradan sigaranın klinik evreden ziyade daha çok patolojik evreyle ilişkili olduğunu söyleyebiliriz.

5.5. HYAL AKTİVİTESİ ÖLÇÜM YÖNTEMİNİN ANALİTİK VE KLİNİK PERFORMANSI

Serum HYAL aktivitesi ölçümüyle önemli noktaları şöyle sıralayabiliriz:

Serum HYAL aktivitesi ağırlıklı olarak lizozomal kaynaklıdır. Ama serumda testiküler kaynaklı HYAL aktivitesi de bulunur. Bu iki farklı enzimin optimum pH'ları farklıdır. MK açısından lizozomal kaynaklı enzim aktivitesindeki değişiklikler daha anlamlıdır. Bu bakımdan, reaksiyon ortamının lizozomal enzimin optimum pH'sına yakın olması önemlidir. Biz de çalışmamızda lizozomal enzim için pH 3.9'u tercih ettik.

Yöntemde oluşan son renkli ürün kararlı değildir. Ürün zamanla henüz tanımlanmamış başka bileşiklere dönüştüğünden, spektrofotometrik okumaların olabildiğince hızlı yapılması, (30 dakika içinde) gerekir. Çalışmamız manuel olduğundan bu süreye uymak için bir seferde en fazla 40 numune çalıştık.

Yöntemin analitik performansını değerlendirmek amacıyla kesinlik (gün içi, günler arası, laboratuvar içi), doğrusalılık, geri kazanım, tespit ve tayin sınırları (LOB, LOD, LOQ) belirleme çalışmaları yaptık. Doğrusallık çalışmasında yöntemin 142-5872 mU/L arasında lineer olduğu saptadık. Yöntemin LOB, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 844, 901, 1129 mU/L olarak belirlendi. Çalışmamızda LOD değerinin altında serum HYAL değeri bulunan 16 kontrol numunesi vardı. Normalde sağlıklı bireylerde serum HYAL aktivitesinin çok düşük olduğu hatta bazı yazarların sağlıklı bireylerde HYAL aktivitesinin saptanamayacağından bahsetmişlerdir (96). Yöntemimiz 142 mU/L'ye kadar lineer olduğundan bu kadar düşük aktiviteye sahip bireylerde ya da lizozomal defekti (mukolipidozis) olan düşük aktiviteye sahip bireylerin tespitinde önemli olabilir. Kesinlik çalışmasında çalışma içi, günler arası, çalışmalar arası ve toplam % varyasyon katsayılarını düşük seviye için sırasıyla %4.71, %8.09, %4.34 ve %10.32; orta seviye için %4.26, %5.76, %4.93 ve %8.69; yüksek seviye için sırasıyla %5.63, %6.85, %4.54 ve %9.96 bulduk. Yapılan bir çalışmada düşük havuz için gün içi varyasyon katsayısı

%4.6, yüksek havuz için %7.4 ve günler arasında %8.4 bulmuşlardır (97). Manuel ve enzimatik bir test için bulduğumuz bu veriler yöntemin kesinliğinin kabul edilebilir olduğunu göstermektedir. Sonuçlar, literatür bilgisiyle de uyumludur.

HYAL aktivitesi için henüz referans ölçüm yöntemi yoktur. Referans materyal de geliştirilmemiştir. Bu yüzden, yöntemin doğruluğunu test etmek için geri kazanım çalışmaları yaptık. Ortalama % geri kazanım 98.95 olarak hesaplandı. Mevcut imkanlarla yaptığımız çalışma sonuçlarına göre yöntemin doğruluğunun kabul edilebilir olduğunu söyleyebiliriz.

HYAL yöntemiminin klinik performansını değerlendirmek için, duyarlılık, özgüllük, ROC analizi, kesim değeri ve olabilirlik oranlarına baktık. ROC eğrisi altında kalan alan 0.97 (%95 CI: 0.94 – 1.00) bulundu ve 1'e yakın olması testin diyagnostik gücünün çok yüksek olduğunu göstermektedir. Spektrum bias'ı dışlamak için 16 MK hastası ile yaşa göre eşleştirdiğimiz 38 kontrol grubu hastasında da ROC analizini yaptık. ROC eğrisi altında kalan alanı 0.965 (%95 CI: 0.92 – 1.00) bulduk. MK dışında hastalıkları dışlayarak bulduğumuz AUC ile MK dışında hastalıkları dışlamadan bulduğumuz AUC'yi benzer bulduk. Bu durum serum HYAL aktivitesinin hastalıklardan bağımsız olarak MK için kullanılabileceğini göstermektedir.

ROC grafiğinin koordinatları üzerinden en uygun kesim (cutoff) değerini 2235 mU/L bulduk. Bu kesim değerine göre HYAL aktivitesinin hem duyarlılığını hem de özgüllüğünü %90 olarak hesapladık. LR(+) ve LR(-) oranlarını da sırasıyla 9 ve 0.1 bulduk. LR(+)'in 10'a yakın olması ve LR(-)'in de 0.1'e yakın olması testin klinik performansının iyi olduğunu göstermektedir.

HYAL aktivitesinin laboratuvar koşullarında ölçülebilmesi, hem analitik hem de klinik performans özelliklerinin iyi olması rutin çalışmalar için yöntemi uygun kılmaktadır. Ancak çok sayıda işlem basamağının olması ve inkübasyon süresinin ve sıcaklığının fazla olması nedeniyle kolorimetrik yöntemi otomatize etmek mümkün değildir.

Bir çalışmada yüksek glukoz konsantrasyonlarının yöntemi interfere edebileceği gösterilmiştir. Glukozun bağlandığı amino asitler (özellikle lizin) renk oluşumunu arttırabilir. Ancak, şekere bağlı amino asitlerin oluşturduğu kromojenlerin spektrumu farklıdır ve bizim ölçtüğümüz absorbans olan 585 nm'de neredeyse minimal olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (89).

Heparin, sitrat ve EDTA içeren 3 farklı antikoagülanlı tüp ve bu tüplerin farklı konsantrasyonlarının plazma HYAL aktivitesi arasındaki ilişkiye bakmışlardır. En düşük plazma HYAL aktivitesi heparin içeren tüpte, sonra sitrat içeren tüpte en yüksek aktiviteyi de EDTA içeren tüpte bulmuşlardır (100). Heparinin HYAL'ın HA'ya bağlandığı yerden başka yere bağlanarak (yarışmasız inhibisyon) HYAL aktivitesini düşürdüğü literatürde gösterilmiştir. Ayrıca, HYAL aktivitesi heparin ve sitrat ile doz bağımlı olarak inhibisyona uğrarken EDTA'nın böyle etkisinin olmadığı da gösterilmiştir (80).

N-asetil glukozaminin verdiği rengin 0.03 M magnezyum iyonu tarafından %2 oranında engellendiğini gösteren çalışmalar vardır (89). EDTA, +2 değerlikli iyonları bağlar. EDTA, Mg iyonunu bağlayacağından Mg^{+2} 'un oluşturduğu negatif interferans ortadan kalkar. Sonuçta EDTA içeren tüplerde plazma HYAL aktivitesi daha yüksek bulunabilir.

Buradan da anlaşılaacağı üzere, plazma HYAL aktivitesi değerlendiriliyorsa kullanılan antikoagülanın tipinin önemli olduğu sonucuna varabiliriz. Biz çalışmamızda plazma HYAL aktivitesi için EDTA içeren tüpleri kullandık.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda HYAL aktivitesinin MK hastalarında yüksek olduğu saptandı. Ayrıca MK etiyojisinde yer alan risk faktörlerinden paket/yıl sigara kullanımının HYAL aktivitesiyle pozitif yönde korelasyon gösterdiği bulundu.

Çalışmamızda en göze çarpan bulgu ise, MK'nin hem patolojik hem klinik evresinin artmasıyla serum HYAL aktivite düzeylerinin de artmasıdır. Ayrıca irritatif mesane semptomları ile kliniğe gelen hastalarda yapılacak serum HYAL ölçümlerinin, hastanın MK olma riski konusunda klinisyene yardımcı olacağına inanıyoruz.

Çalışma aşamasındaki önemli bir zorluk, HA'nın yapısının çok visköz olmasıdır. Tez ön çalışmalarında 1 ile 5 mg/mL aralığında değişen farklı konsantrasyonlarda HA denediğimizde Wilkinson ve ark.'nın da belirttiği gibi HA konsantrasyonu arttıkça (özellikle >4 mg/mL konsantrasyonlarda) pipetlemede güçlük yaşanmaktadır (96). Bu durumda ters pipetleme işleminin yapılması gerekmektedir. Yüksek HA konsantrasyonlarında yanlış pipetlemeye bağlı analitik hata oluşabilir. Bu yüzden biz substrat tampon çözeltisinin hazırlanışında HA konsantrasyonunu optimum konsantrasyonda (1.5 mg/mL) tuttuk.

Ayrıca dikkat edilmesi gereken farklı bir nokta da renkli son ürünün stabil olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu yüzden numunelerin santrifüj işleminden hemen sonra spektrofotometrede okunması gerekir. Literatürde absorbansın 30 dakikaya kadar değişmediği belirtilmektedir (96-99).

MK hasta sayımız 43'tü. Hastalarımızı evrelere ayırdığımızda bu sayıların azalması ve yine HYAL aktivitesinin artabileceği çoğu hastalığı (karaciğer hastalığı, romatolojik hastalıklar, transplant hastaları, dermatolojik hastalıklar) dışlamış olsak bile toplumda sık görülen diabetes mellitus, koroner arter hastalığı ve hipertansiyonu hasta grubumuzda dışlayamamış olmak çalışmamızın önemli bir kısıtlamasıdır. Buna karşılık, çalışmamızda kontrol grubunun, hasta grubunda belirtilenlerle aynı semptomlara sahip olması avantajdır.

HYAL aktivitesinin daha büyük hasta gruplarında, hastalardan periyodik aralıklarla numune alınması yoluyla hastalığın rekürrensi ve progresyonuna yönelik yeni verilerin elde edilmesi mümkündür.

7. KAYNAKLAR

1. Robbins SL, Kumar V, Abbas AK, Cotran RS, Fausto N. The lower urinary tract and male genital system. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company 2010, p. 971-1004.
2. Ploeg M, Aben KK, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* 2009;27:289-293.
3. Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, Steineg G, Norming U, et al. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis* 2004;25:729-734.
4. Ferlay J, Shin R, Bray F, Forman D, Mather C, Parkin D. Cancer incidence and mortality worldwide. *Globocan 2008: IARC. IJC* 2010;127:2893-2917.
5. Unal B, Sözmen K, Arık H, Gerçeklioğlu G, Altun DU, Şimşek H, et al. Explaining the decline in coronary heart disease mortality in Turkey between 1995 and 2008. *BMC Public Health* 2013;13:1135.
6. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European Urology* 2013;63:234-241.
7. Van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *European Urology* 2009;56:430-442.
8. Quek ML, Sanderson K, Daneshmand S, Stein JP. New molecular markers for bladder cancer detection. *Current Opinion in Urology* 2004;14:259-264.
9. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: international consensus panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005;66:35-63.
10. Ehdaie B, Theodorescu D. Predicting tumor outcomes in urothelial bladder carcinoma: turning pathways into clinical biomarkers of prognosis. *Expert review of anticancer therapy* 2008; 8: 1103-1110.
11. Shariat SF, Karakiewicz PI, Godoy G, Karam JA, Ashfaq R, Fradet Y, et al. Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study. *Clin Cancer Res* 2009;15:7012-7019.
12. Knudson W. Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am J Pathol* 1996;148:1721-1726.
13. Lokeshwar VB, Young MJ, Goudarzi G, Lida N, Ashley I, et al. Identification of bladder tumor-derived hyaluronidase: Its similarity to HYAL1. *Cancer Research* 1999; 59:4464-4470.
14. Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, Forgacs E, Minna JD, Block NL, et al. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem* 2001;276:11922-11932.

15. Gomez CS, Gomez P, Knapp J, Jorda M, Soloway MS, Lokeshwar VB. Hyaluronic acid and HYAL-1 in prostate biopsy specimens: predictors of biochemical recurrence. *J Urol* 2009;182:1350-1356.
16. Ikegami KM, Okuda R, Nemoto T, Inada N, Takahashi T. Enhanced activity of serum and urinary hyaluronidases in streptozotocin-induced diabetic Wistar and GK rats. *Glycobiology* 2004;14:65-72.
17. Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, Wei D, Young MJ, Duncan RJ, et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol* 2000;163:348-356.
18. Lokeshwar VB, Schroeder GL, Selzer MG, Hautmann SH, Posey JT, Duncan RJ, et al. Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid–hyaluronidase and BTA-Stat tests. *Cancer* 2002;95:61-72.
19. Eissa S, Kassim SK, Labib RA, El-Khouly IM, Ghaffer TM, Sadek M, et al. Detection of bladder carcinoma by combined testing of urine for hyaluronidase and cytokeratin 20 RNAs. *Cancer* 2005;103:1356-1362.
20. Csoka TB, Frost GI, Wong T, Stern R. Purification and microsequencing of hyaluronidase isozymes from human urine. *FEBS Letters* 1997;417:307-310.
21. Posey JT, Soloway MS, Ekici S, Sofer M, Civantos F, Duncan RC. Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer. *Cancer Res* 2003;63:2638-2644.
22. Lokeshwar VB, Cerwinka WH, and Lokeshwar BL. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res* 2005;65:2243-2250.
23. Aboughalia A.H. Elevation of hyaluronidase-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 helps select bladder cancer patients at risk of invasion. *Arch Med Res* 2006;37:109-116.
24. Chao K.L, Muthukumar L, and Herzberg O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry* 2007;46:6911-6920.
25. Sadler T.W. Langman's medical embryology. 12th Edition (www.irananatomy.ir) (internet) 2011: Aug.
26. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The world health organization/international society of urological pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1435-1448.
27. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65:5-29.
28. Marshall VF. Current clinical problems regarding bladder tumors. *Cancer* 1956; 9:543-550.
29. Eser S, Zorlu F, Divtik RT, Cal C, Ozkan M, Kirkali Z. Incidence and epidemiological features of cancers of the genitourinary tract in Izmir between 1993-2002. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009;10:491-6.
30. Jemal A, Siegel RL, Ward E, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics: 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.

31. Clegg LX, Li FP, Hankey BF, Chu K, Edwards BK. Cancer survival among US whites and minorities: a SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) Program population-based study. *Arch Intern Med* 2002;162:1985-1993.
32. James AC, Gore JL. The costs of non-muscle invasive bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2013;40:261-269.
33. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer. *Cancer Pract* 2002;10:311-322.
34. Mazzucchelli R, Montironi R, Beltran AL, et al. The 2004 WHO classification of non-invasive papillary neoplasms of the urinary bladder (also referred to as WHO (2004)/ISUP). *Urologia Journal* 2005;72:224-228.
35. Cheng L, Darson M, Cheville JC, Reumann RM, Zincke H, Nehra A, et al. Urothelial papilloma of the bladder. *Cancer* 1999;86: 2098-2101.
36. Van Rhijn BW, Van der Poel HG, Van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 2005;47:736-748.
37. Viriesema ve ark KİTAP
38. Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 2003;61:109-118.
39. Gutterrez BJL, Rebollo RMH, Antolin JGM, Garcia BM. Usefulness of the bta stat test for diagnosis of bladder cancer. *Urology* 2001;57: 685-9.
40. Shanti KS, Travis MM, James RD. Nuclear matrix proteins in well and poorly differentiated human breast cancer cell lines. *J. Cell. Biochem.* 1997;66: 9–15.
41. Cem G, Emre T, Murat Ş, Murat D. Novel Diagnostic Markers and Prognosticators in Superficial Bladder Cancer. *The Medical Journal of Kocatepe* 2006; 6:1-9.
42. Halling KC, King W, Sokolova IA. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol* 2000; 164: 1768-1775.
43. Chao D, Freedland SJ, Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun AS. Bladder cancer 2000: molecular markers for the diagnosis of transitional cell carcinoma. *Rev Urol* 2001; 3:85-93.
44. Lopez-Beltran A, Cheng L. Stage pT1 bladder carcinoma: diagnostic criteria, pitfalls and prognostic significance. *Pathology* 2003; 35: 484-491.
45. Busch C, Algaba F. The WHO/ISUP 1998 and WHO 1999 systems for malignancy grading of bladder cancer. Scientific foundation and translation to one another and previous systems. *Virchows Arch* 2002;441:105-108.
46. Rastogi V, Sharma R, Misra SR, Yadav L, Sharma V. Emperipolesis—a review. *J Clin Diag Res* 2014;8:1-27.
47. Cheng L, MacLennan GT, Lopez-Beltran A. Histologic grading of urothelial carcinoma: a reappraisal. *Hum Pathol* 2012;43:2097-2108.
48. Fenlon HM, Bell TV, Ahari HK, Hussain S. Virtual cystoscopy: early clinical experience. *Radiology* 1997;205:272-275.

49. Rosai J, Rosai and Ackerman's Surgical Pathology E-Book. Elsevier Health Sciences. (internet). 2011.Aug.
50. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The iaslc lung cancer staging project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:706-714.
51. Kennedy CI, Diegelmann RF, Haynes JH, Yager DR. Proinflammatory cytokines differentially regulate hyaluronan synthase isoforms in fetal and adult fibroblasts. *J Pediatr Surg* 2000;35:874-879.
52. Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* 1934;107:629-634.
53. Balazs EA, Laurent TC, Jeanloz RW. Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochem J* 1986;235:903.
54. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* 2008;53:397-411.
55. Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, et al. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res A* 2003;66:880-884.
56. Fraser J, Laurent T, Laurent U. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997;242:27-33.
57. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Passi A, et al. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:2452-2459.
58. Cansu GE, Nurgül K. Evaluation of the efficiency of hyaluronic acid and/or bone graft on healing of bone defects SDÜ Tıp Fakültesi 2015; /tez.sdu.edu.tr
59. Onur Ç, Hakkı OK, Gülsüm AK. Hyaluronic acid in dentistry. *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi* 2011;45: 25-35.
60. Laurent TC, Fraser J. Hyaluronan. *FASEB J* 1992;6:2397-2404.
61. Jiang DJ, Liang DJ, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev* 2011;91:221-264.
62. Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater* 2014;10:1558-1570.
63. Aslan M, Şimşek G, Dayi E, et al. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *J Biomater Appl* 2006;20:209-220.
64. Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2004;5:12.
65. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *EJCB* 2004;83:317-325.
66. Murat D, Cansu B, Nazım EK. Filler reactions: case report and review of the literature *Turk J Dermatol* 2017;11:131-8.

67. Yung S, Chan TM. Pathophysiology of the peritoneal membrane during peritoneal dialysis: the role of hyaluronan. *BioMed Research International* 2011;2011:Article ID 180594, 11 pages
68. Meyer K, Hobby G, Chaffee E. Relationship between “Spreading Factor” and Hyaluronidase. *Exp Biol Med* 1940;44:294-296.
69. Kreil G. Hyaluronidases a group of neglected enzymes. *Protein Science* 1995;4:1666-1669.
70. Csoka T, Frost G, Stern R. Hyaluronidases in tissue invasion. *Invasion & Metastasis* 1997;17:297-311.
71. Girish K, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sciences* 2007;80:1921-1943.
72. Muckenschnabel I, Bernhardt G, Spruss T, Dietl B, Buschauer A. Quantitation of hyaluronidases by the Morgan–Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. *Cancer Lett* 1998;131:13-20.
73. Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* 2001;20:499-508.
74. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 1985;228:1324-1326.
75. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004;4:528-539.
76. Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR. Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann Med* 1996;28:241-253.
77. Knudson W, Chow G, Knudson CB. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol* 2002;21:15-23.
78. Tammi M.I, Day A.J, Turley E.A.. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 2002;277:4581-4584.
79. Deguine V, Menasche M, Ferrari P, Fraisse L, Pouliquen Y, Robert L. Free radical depolymerization of hyaluronan by Maillard reaction products: role in liquefaction of aging vitreous. *Int J Biol Macromol* 1998;22: 17-22.
80. Yamazaki K, Fukuda K, Matsukawa M, Hara F, Yoshida K, Akagi M, et al. Reactive oxygen species depolymerize hyaluronan: involvement of the hydroxyl radical. *Pathophysiology* 2003;9: 215-220.
81. Meyer, K. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* 1947; 27: 335-359.
82. Chain, E.; Duthie, E. S. Identity of hyaluronidase and spreading Factor. *Br. J. Exp. Pathol.* 1940, 21,324-338.
83. Warren, G. H.; Durso, J. G. A synovial fluid clot prevention test for the determination of hyaluronidase activity. *Endocrinology* 1951, 48, 408-412.
84. Hoechstetter, J. Characterisation of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae*: investigations on the effect of pH on hyaluronan degradation

- and preclinical studies on the adjuvant administration of the enzymes in cancer chemotherapy. PhD thesis, University of Regensburg, Regensburg, 2005.
85. Kass, E. H.; Seastone, C. V. The role of the mucoid polysaccharide (hyaluronic acid) in the virulence of group a hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 1944, 79, 319-330.
 86. Rapport, M. M.; Meyer, K.; Linker, A. Correlation of reductimetric and turbidimetric methods for hyaluronidase assay. *J. Biol. Chem.* 1950, 186, 615-623.
 87. Elson, L. A.; Morgan, W. T. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.* 1933, 27, 1824-1828.
 88. Morgan, W. T.; Elson, L. A. A colorimetric method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. *Biochem. J.* 1934, 28, 988-995.
 89. Reissig, J. L.; Storminger, J. L.; Leloir, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.* 1955, 217, 959-966.
 90. Bonner MW, Cantey YE. Colorimetric method for determination of serum hyaluronidase activity. *Clin Chim Acta* 1966;13: 746-752.
 91. Gacesa, P.; Savitsky, M. J.; Dodgson, K. S.; Olavesen, A. H. A recommended procedure for the estimation of bovine testicular hyaluronidase in the presence of human serum. *Anal. Biochem.* 1981;118: 76-84.
 92. Asteriou, T.; Deschrevel, B.; Delpech, B.; Bertrand, P.; Bultelle, F.; Merai, C.; Vincent, J. C. An improved assay for the N-acetyl-D-glucosamine reducing ends of polysaccharides in the presence of proteins. *Anal. Biochem.* 2001, 293, 53-59.
 93. Takahashi, T.; Ikegami-Kawai, M.; Okuda, R.; Suzuki, K. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity. *Anal. Biochem.* 2003, 322, 257-263.
 94. Stern, M.; Stern, R. An ELISA-like assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors. *Matrix* 1992,12, 397-403.
 95. Chao D, Freedland SJ, Pantuck AJ. Bladder cancer 2000: molecular markers for the diagnosis of transitional cell carcinoma. *Rev Urol* 2001;3: 85-93.
 96. Wilkinson R.C, Bower M.L, Warren C. Measurement of hyaluronidase activity in normal human serum. *J Pharm Biomed Anal* 1996;14: 707-712.
 97. Natowicz RM, Wang Y. Human serum hyaluronidase: characterization of a clinical assay. *Clin Chimica Acta* 1996;24: 1-6.
 98. Laudat A, Guehot J, Lecourbe K, Damade R, Palluel AM. Hyaluronidase activity in serum of patients with monoclonal gammopathy. *Clin Chim Acta* 2000;301:159-167.
 99. Kucur M, Karadağ B, Isman KF, Ataev Y, Duman D, Karadağ N, et al. Plasma hyaluronidase activity as an indicator of atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Bratisl Lek Listy* 2009;110: 21-26.
 100. Sharma R, Mahadeswaraswamy YH, Kumar HK. Effect of anticoagulants on the plasma hyaluronidase activities. *J Clin Anal* 2009;23: 29-33.

101. Silverman DT, Levin LI, Hoover RN, Hartge P. Occupational risks of bladder cancer in the United States: I. White men. *J Nat Cancer Inst* 1989;81:1472-1480.
102. Quilty PM, Kerr GR. Bladder cancer following low or high dose pelvic irradiation. *Clin Radiol* 1987;38:583-585.
103. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: the epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2006;3:327-340.
104. Murta-Nascimento C, Schmitz-Drager BJ, Zeegers MP, Steineck G, Koegevins M, Real FX, et al. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J Urol* 2007;25:285-295.
105. Zhou J, Smith S, Giovannucci E, Michaud D. Reexamination of total fluid intake and bladder cancer in the Health Professionals Follow-up Study Cohort. *Am J Epidemiol* 2012;175:696-705.
106. Jamshidian H, Hashemi M, Nowroozi MR, Ayati M, Bonyadi M, Najjara Tousei V. Sensitivity and specificity of urinary Hyaluronic acid and hyaluronidase in detection of bladder transitional cell carcinoma. *Urol J* 2014;11:1232-1237
107. Kramer MW, Golshani R, Merseburger AS, Knapp J, Garcia A, Hennenlotter J et al. HYAL-1 Hyaluronidase: a potential prognostic indicator for pregression to muscle invasion and recurrence in bladder cancer. *European Urology* 2010;57:86-94.
108. Northup SN, Stasiw RO, Brown HD. Development of the hyaluronidase activity assay as a cancer screening test *Clin. Biochem* 1973;6:220-228

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı- Soyadı: Tuba Özgün

Doğum yeri ve tarihi: Muğla, 25/12/1986

Uyruğu: TC vatandaşı

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: tuba.ozgun86@hotmail.com, 544 449 3220

Yabancı dil: İngilizce

Eğitimi

2012-2018: Ankara Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tıbbi Biyokimya İhtisası

2004-2011: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

2001-2004: Dalaman Lisesi

1997-2001: Çiftlik İlköğretim Okulu

Ünvanları

2012: Doktor

2018: Biyokimya uzmanı

Mesleki Deneyimi

2011-2012: Yüksekova Anne Çocuk Sağlığı Ve Aile Planlama Merkezi (AÇSAP)

2012-2018: Ankara Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi

Üye olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Biyokimya Derneği

Bilimsel İlgi Alanları

Posterleri:

Nasıl bir biyokimya uzmanlık eğitimi olmalı? Biyokimya Lab. Eğitimine Çok Disiplini Yaklaşım Çalıştayı, 2012

Hastane tipi glikometrenin performans değerlendirmesi. 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2012

Plazma ve serum glukozu: aralarında fark var mı? 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2012

OGTT istemleri: WHO ve ADA kriterlerinin karşılaştırılması. 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2012

İmmünifikasyon elektroforezi mi, serbest hafif zincir testi mi? 26. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2013

Hiperprolaktinemi taramasında serum makroprolaktin ölçümü değerli midir? 26. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2013

Hematolojik bir parametre olarak çekirdekli kırmızı kan hücre sayısının 3 farklı anami türünde karşılaştırılması, 30. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2017

Hesaplanan iyonize kalsiyum ile ölçülen iyonize kalsiyum sonuçların karşılaştırılması, 30. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2017

Farklı antikoagülanların D-Dimer testine etkisi, 30. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2017

Bilimsel Etkinlikleri

25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2012

26. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2013

IFCC World Lab Kongresi, 2015

Biyokimya Lab. Eğitimine Çok Disiplini Yaklaşım, 2012

Laboratuvar Yönetimi: Kalite – Standardizasyon – Akreditasyon, 2014

Yeni Keşfedilen Yönleriyle Vitamin D, ODTÜ Vişnelik Sempozyum, 2013

5. Ankara Tıp Biyokimya Günü, 2013

Tarama Testleri Ve Risk Faktörleri, ODTÜ Vişnelik Sempozyum, 2014

Kardiyovasküler Hastalıklarda Laboratuvar, ODTÜ Vişnelik Sempozyum, 2014

Obeziteye Multidisipliner Yaklaşım, Gazi Tıp Biyokimya Günleri, 2018

Alkol Dışı Steatohepatit, ODTÜ Vişnelik Sempozyum, 2018

Monoklonal Gamopatiler: Klinik ve laboratuvar yönleriyle Multipl myelom, ODTÜ Vişnelik Sempozyum, 2018

Flow Sitometre Ve Kullanım Alanları, GATA, 2018

Diğer Bilgiler

Kalite Kılavuzları Temelinde Laboratuvar Hesaplamaları Kursu, 2013

MS (Kütle Spektrometre) Kursu, 2013

EKLER:

EK 1: Ankara Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıpta Uzmanlık Eğitimi Kurulu Onayı

EK 2: Hasta ve Kontrol Grubu İçin Aydınlatılmış Onam Formu ve Mesane Kanseri için Risk Faktörleri Sorgulama Anketi

EK 3: Kontrol Hastalarında Değişkenlerin Birbirleri ile Korelasyonları

EK 4: MK Hastalarında Değişkenlerin Birbirleri ile Korelasyonları

EK 5: MK Hastalarının Klinik Parametre Değişkenlerinin Birbirleri ile Korelasyonları

EK 6: Tüm Hastalarda Değişkenlerin Birbirleri ile Korelasyonları

EK 1: Ankara Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıpta Uzmanlık Eğitimi Kurulu Onayı



**T.C.
Sağlık Bakanlığı
Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu
Ankara İli Kamu Hastaneleri Birliği 1.Bölge Sekreterliği
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi
"Eğitim, Planlama Kurulu Karar Defteri"**

Toplantı No: 0626

27.01.2016

BAŞKAN
Doç.Dr.Recep Pekcici
Başhekim

EPKK ASIL ÜYELERİ	EPKK YEDEK ÜYELERİ
Doç.Dr.Yalçın Aral Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kliniği	Doç.Dr.Nadir Turgut Çavuşoğlu Genel Cerrahi Kliniği
Op.Dr.Firdevs Örnek Göz Hastalıkları Kliniği	Doç.Dr.Ali Pekcan Demiröz Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği
Doç.Dr.Hülya Başar Anestezi ve Reanimasyon Kliniği	Doç.Dr.Necmi Arslan KBB Hastalıkları Kliniği
Doç.Dr.Gürcan Aslan Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği	Doç.Dr.Meliha Korkmaz Nükleer Tıp Kliniği

KARAR:

5243.Tıbbi Biyokimya Kliniği doktorlarından **Dr.Tuba Özgün**'ün 26.01.2016 tarihli dilekçesi incelendi. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi EPKK Kurulu'nun 24.12.2014-0575 tarih ve toplantı numaralı 4744 nolu karar ile onay almış olan "**Mesane kanserli hastalarda serum hyaluronidaz aktivitesi**" başlıklı **Prospektif** çalışması için talep ettikleri **materyaller** (Ek-2 de sunulmuştur) için sundukları dosya ve proforma faturalar incelendi. Yaklaşık **1563,5 TL** olduğu beyan edilen talebin Hastanemiz Satınalma Birimince karşılanması hususunda Yöneticilik Makam Onayına Sunulması "**OYBİRLİĞİ**" / "**OYÇOKLUĞU**" ile "**UYGUN**" "**BULUNMUŞTUR**" / "**BULUNMAMIŞTIR**".

Doç.Dr.Yalçın Aral

Op.Dr.Firdevs Örnek

Doç.Dr.Hülya Başar

Doç.Dr.Gürcan Aslan

Doç.Dr.Recep Pekcici
Başhekim

EK 2:

TEZ AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

(Hasta ve Kontrol Grubu İçin)

Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Eğitim, Planlama ve Koordinasyon Kurulu'nun 24.12.2014 tarih ve 575 sayılı kararı ile onaylanmış Tıbbi Biyokimya Bölümü tarafından yürütülecek olan tez çalışmasına davet edilmektesiniz.

(Hekimin Açıklaması)

Mesane kanserli hastalarda TNM evreleme sistemi ile ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası serum hyalüronidaz aktivitesini iki farklı yöntemle (spektrofotometrik, florometrik) ölçülerek karşılaştırılmasını içeren tez çalışmasına katılmanızı öneriyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya dahil olmak isterseniz formu imzalayınız. Bu araştırmaya sizi davet etmemizin nedeni, üriner sistem hastalığınız nedeniyle hastanemize basurmanız ve klinik doktorunuzun mesane kanseri ön tanısı ile tedavi sürecinizi başlatmasındandır.

Bu araştırma Ankara Eğitim ve Araştırma hastanesi Biyokimya Bölümün'de gerçekleştirilecektir. Katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir. Bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 1 tüp (5 mililitre) ameliyat öncesi ve 1 tüp (5 mililitre) ameliyat sonrası (hasta grubu için geçerlidir) kan alınması gerekmektedir. Klinik doktorunuz ilk muayenizden sonra mesane kanseri şüphesinden uzaklaşırsa (kontrol grubu) ameliyat yapılmayacaktır dolayısıyla ameliyat sonrası kan alım işlemi uygulanmayacaktır. Kan örneği yetkin sağlık personeli tarafından alınacaktır. Bu işlem rutin biyokimyasal analizler için verilecek örnek toplanmasından farklı değildir. Bu aşamalarda başarısız olunması durumunda bir kez daha kan verilmesi istenebilir. Kan örneklerinde hyalüronidaz testi ve rutin biyokimya ile ilgili parametreler ölçülecektir. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Gönüllü istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilir. Araştırmaya katılan gönüllülerin herhangi bir sorumluluğu yoktur. Gönüllü ve hastalar için herhangi bir risk /rahatsızlık bulunmamaktadır. Araştırmadan beklenen yararlar ilgili olarak herhangi bir klinik yarar bulunmadığında gönüllü bu durum hakkında bilgilendirilecektir. Gönüllülerin tıbbi kayıtlarına çalışmayı yapacak kişiler, etik kurul, kurum ve sağlık otoritelerinin erişimi bilgilerin gizli tutulması şartı ve yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla izin verilmiş olacaktır. Gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllü veya yasal temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir. Gönüllünün araştırma, kendi hakları veya araştırmayla ilgili herhangi bir olumsuz olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmek için Dr. Tuba Özgün'e 0544 449 3220 nolu telefondan günün 24 saatinde erişebilirsiniz. Araştırma devam eden- sürekli bir çalışma değildir. Kan verme işlemi sonrası gönüllünün araştırmaya katılımı sonlanmış olacaktır.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:

İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilir. Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak

tamamen isteğe bağlıdır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahiptir.

(Gönüllünün Beyanı)

Sayın Asist.Dr.Tuba Özgün'ün Ankara Eğitim ve Araştırma hastanesi Biyokimya bölümü tarafından bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgileri bana aktardı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile benim aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimizi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmadım. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkimize herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Katılımcı =

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

imza:

Görüşme tanığı =

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim =

Adı soyadı,

Ünvanı:

Adres:

Tel:

imza:

Mesane Kanseri Risk Faktörleri Sorgulama Anketi

-BARKOD=

-AD=

-SOYAD=

-TEL=

-YAŞ=

-BOY=

-KİLO=

-MESLEK=

-SİGARA=

- EK HASTALIK (HT, DM)=

-GEÇİRİLMİŞ ÜRİNER ENFEKSİYON ÖYKÜSÜ=

-İLAÇ KULLANIMI=

-RADRASYON MARUZİYETİ=

-AİLE ÖYKÜSÜ=

EK 3. Kontrol Hastalarında Değişkenlerin Birbirleri ile Korelasyonları

KORELASYON																
		Serum	Plazma	Yaş	Glukoz	Üre	Kreatinin	T.protein	Albumin	ALT	AST	Na	K	Ca	Hb	PSA
Serum	Pearson Correlation	1														
	Sig. (2-tailed)															
	N	43														
Plazma	Pearson Correlation		1													
	Sig. (2-tailed)		0													
	N	43	43													
Yaş	Pearson Correlation	-0,114	-0,193	1												
	Sig. (2-tailed)	0,466	0,214													
	N	43	43	43												
Glukoz	Pearson Correlation	0,108	0,166	-0,364*	1											
	Sig. (2-tailed)	0,492	0,288	0,016												
	N	43	43	43	43											
Üre	Pearson Correlation	-0,156	-0,131	0,084	-0,113	1										
	Sig. (2-tailed)	0,318	0,402	0,594	0,472											
	N	43	43	43	43	43										
Kreatinin	Pearson Correlation	-0,194	-0,157	0,126	-0,113	0,892**	1									
	Sig. (2-tailed)	0,212	0,316	0,423	0,469	0										
	N	43	43	43	43	43	43									
T.protein	Pearson Correlation	0,087	0,203	0,007	-0,067	0,022	-0,023	1								
	Sig. (2-tailed)	0,578	0,193	0,963	0,67	0,888	0,884									
	N	43	43	43	43	43	43	43								
Albumin	Pearson Correlation	0,09	0,063	-0,046	0,045	-0,229	-0,203	0,442**	1							
	Sig. (2-tailed)	0,565	0,69	0,77	0,773	0,139	0,192	0,003								
	N	43	43	43	43	43	43	43	43							
ALT	Pearson Correlation	0,073	0,146	-0,374*	0,012	-0,082	-0,194	-0,085	0,001	1						
	Sig. (2-tailed)	0,644	0,35	0,014	0,937	0,599	0,213	0,59	0,995							
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43						
AST	Pearson Correlation	-0,033	0,026	-0,217	0,038	-0,013	-0,154	-0,204	-0,261	0,769**	1					
	Sig. (2-tailed)	0,832	0,869	0,161	0,806	0,935	0,324	0,19	0,091	0						
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43					
Na	Pearson Correlation	0,105	0,097	0,21	-0,355*	0,153	0,224	0,054	-0,012	-0,12	-0,175	1				
	Sig. (2-tailed)	0,504	0,535	0,176	0,02	0,326	0,149	0,73	0,94	0,444	0,262					
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43				
K	Pearson Correlation	-0,225	-0,23	0,073	0,03	-0,004	0,104	-0,003	0,104	-0,051	-0,108	-0,198	1			
	Sig. (2-tailed)	0,147	0,138	0,642	0,849	0,982	0,508	0,983	0,506	0,744	0,489	0,204				
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43			
Ca	Pearson Correlation	0	-0,04	0,051	-0,04	0,028	-0,049	0,011	0,073	-0,089	-0,062	0,043	-0,156	1		
	Sig. (2-tailed)	0,998	0,799	0,745	0,799	0,856	0,753	0,942	0,641	0,569	0,694	0,785	0,317			
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43		
Hb	Pearson Correlation	0,045	0,092	-0,184	0,192	-0,256	-0,224	0,07	0,154	-0,28	-0,350*	0,101	0,165	-0,319*	1	
	Sig. (2-tailed)	0,775	0,559	0,239	0,217	0,098	0,149	0,655	0,325	0,069	0,021	0,518	0,291	0,037		
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	
T.PSA	Pearson Correlation	-0,025	-0,072	0,018	-0,146	-0,14	-0,176	-0,275	-0,25	-0,024	-0,009	0,039	-0,188	0,734**	-0,329*	1
	Sig. (2-tailed)	0,879	0,661	0,913	0,375	0,397	0,283	0,09	0,125	0,882	0,955	0,813	0,251	0	0,041	
	N	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39
** p<0.01 (2-tailed).																
* p<0.05 (2-tailed).																

EK 4. MK Hastalarında Değişkenlerin Birbirleri ile Korelasyonları

KORELASYON																
		Serum	Plazma	Yaş	Glukoz	Üre	Kreatinin	T.protein	Albumin	ALT	AST	Na	K	Ca	Hb	T.PSA
Serum	Pearson Corre	1														
	Sig. (2-tailed)															
	N	43														
Plazma	Pearson Corre	,962**	1													
	Sig. (2-tailed)	0														
	N	43	43													
Yaş	Pearson Corre	0,171	0,12	1												
	Sig. (2-tailed)	0,274	0,442													
	N	43	43	43												
Glukoz	Pearson Corre	0,04	-0,02	0,194	1											
	Sig. (2-tailed)	0,797	0,9	0,213												
	N	43	43	43	43											
Üre	Pearson Corre	-0,112	-0,121	0,181	,381*	1										
	Sig. (2-tailed)	0,473	0,44	0,244	0,012											
	N	43	43	43	43	43										
Kreatinin	Pearson Corre	-0,017	-0,037	0,114	,448**	,672**	1									
	Sig. (2-tailed)	0,912	0,812	0,465	0,003	0										
	N	43	43	43	43	43	43									
T.protein	Pearson Corre	-0,097	-0,095	0,045	-,358*	-0,041	-0,168	1								
	Sig. (2-tailed)	0,536	0,545	0,774	0,018	0,794	0,281									
	N	43	43	43	43	43	43	43								
Albumin	Pearson Corre	-0,226	-0,169	-0,059	-,349*	-0,197	-0,255	,631**	1							
	Sig. (2-tailed)	0,146	0,28	0,709	0,022	0,205	0,099	0								
	N	43	43	43	43	43	43	43	43							
ALT	Pearson Corre	0,052	0,013	-0,022	-0,098	-0,21	-0,202	-0,091	-0,037	1						
	Sig. (2-tailed)	0,74	0,936	0,89	0,531	0,177	0,194	0,563	0,815							
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43						
AST	Pearson Corre	0,015	-0,051	0,048	-0,148	-0,259	-0,199	-0,106	-0,068	,943**	1					
	Sig. (2-tailed)	0,924	0,745	0,761	0,345	0,094	0,2	0,499	0,664	0						
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43					
Na	Pearson Corre	-0,036	0,028	0,179	-0,056	,427**	0,165	0,263	0,072	0,014	-0,028	1				
	Sig. (2-tailed)	0,82	0,86	0,251	0,721	0,004	0,291	0,089	0,645	0,928	0,858					
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43				
K	Pearson Corre	-,309*	-0,272	0,212	0,193	,315*	0,108	0,131	0,054	0,167	0,079	0,285	1			
	Sig. (2-tailed)	0,043	0,078	0,172	0,216	0,04	0,492	0,403	0,729	0,283	0,615	0,064				
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43			
Ca	Pearson Corre	-0,112	-0,048	-0,031	-,550**	-,626**	-,723**	,363*	,443**	0,182	0,195	-0,131	-0,021	1		
	Sig. (2-tailed)	0,474	0,758	0,846	0	0	0	0,017	0,003	0,243	0,211	0,404	0,894			
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43		
Hb	Pearson Corre	-0,081	-0,064	0,073	-0,039	-0,05	-0,106	0,291	0,251	0,063	0,095	-0,175	-0,078	0,17	1	
	Sig. (2-tailed)	0,604	0,683	0,642	0,806	0,751	0,5	0,058	0,105	0,686	0,543	0,262	0,62	0,277		
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	
T.PSA	Pearson Corre	0,257	0,248	0,101	-0,203	-0,065	-0,177	-0,023	-0,083	-0,302	-0,218	-0,104	-,317*	0,042	,389*	1
	Sig. (2-tailed)	0,109	0,123	0,534	0,209	0,689	0,275	0,889	0,612	0,058	0,177	0,521	0,046	0,795	0,013	
	N	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
** p<0.01 (2-tailed).																
* p<0.05 (2-tailed).																

EK 5. MK Hastalarının Klinik Parametre Değişkenlerinin Birbirleri ile Korelasyonları

KORELASYON														
		Serum	Plazma	Klinik	Patolojik	Odak	Boyut	EORTC riski	Sigara	Paket/Yıl	Günlük su tüketimi	Kilo	Boy	VKİ
Serum	Pearson Corr	1												
	Sig. (2-tailed)													
	N	43												
Plazma	Pearson Corr	,962**	1											
	Sig. (2-tailed)	0												
	N	43	43											
Klinik	Pearson Corr	,639**	,563**	1										
	Sig. (2-tailed)	0	0											
	N	43	43	43										
Patolojik	Pearson Corr	,749**	,728**	,675**	1									
	Sig. (2-tailed)	0	0	0										
	N	43	43	43	43									
Odak	Pearson Corr	0,054	0,083	0,011	0,134	1								
	Sig. (2-tailed)	0,73	0,596	0,946	0,39									
	N	43	43	43	43	43								
Boyut	Pearson Corr	0,06	0,113	0,061	0,137	,367*	1							
	Sig. (2-tailed)	0,702	0,471	0,696	0,382	0,015								
	N	43	43	43	43	43	43							
EORTC riski	Pearson Corr	-0,013	0,022	-0,179	-0,119	0,152	-0,197	1						
	Sig. (2-tailed)	0,943	0,906	0,326	0,517	0,405	0,279							
	N	32	32	32	32	32	32	32						
Sigara	Pearson Corr	,599**	,591**	0,207	,463**	-0,097	-0,032	0,114	1					
	Sig. (2-tailed)	0	0	0,182	0,002	0,535	0,84	0,535						
	N	43	43	43	43	43	43	32	43					
Paket Yıl	Pearson Corr	,481**	,504**	0,21	,495**	0,141	0,148	0,05	,648**	1				
	Sig. (2-tailed)	0,001	0,001	0,177	0,001	0,367	0,343	0,786	0					
	N	43	43	43	43	43	43	32	43	43				
Günlük su tüketimi	Pearson Corr	0,003	-0,04	0,019	-0,054	-0,062	0,077	0,099	-0,038	-0,173	1			
	Sig. (2-tailed)	0,985	0,801	0,905	0,733	0,692	0,622	0,59	0,808	0,268				
	N	43	43	43	43	43	43	32	43	43	43			
Kilo	Pearson Corr	-0,017	0,023	-0,129	-0,046	-0,051	-0,17	0,259	0,054	0,284	0,153	1		
	Sig. (2-tailed)	0,912	0,882	0,41	0,772	0,747	0,276	0,152	0,733	0,065	0,327			
	N	43	43	43	43	43	43	32	43	43	43	43		
Boy	Pearson Corr	-0,25	-0,199	-0,272	-0,244	-0,139	-0,105	0,076	0,009	0,149	0,071	,629**	1	
	Sig. (2-tailed)	0,106	0,2	0,078	0,114	0,373	0,504	0,679	0,955	0,339	0,65	0		
	N	43	43	43	43	43	43	32	43	43	43	43	43	
VKİ	Pearson Corr	0,091	0,111	-0,033	0,057	-0,006	-0,179	0,308	0,048	0,258	0,136	,919**	0,28	1
	Sig. (2-tailed)	0,56	0,479	0,836	0,715	0,971	0,25	0,086	0,762	0,095	0,383	0	0,069	
	N	43	43	43	43	43	43	32	43	43	43	43	43	43
**p<0.01 (2-tailed).														
* p<0.05 (2-tailed).														

EK 6. Tüm Hastalarda Değişkenlerin Birbirleri ile Korelasyonları

KORELASYON																		
		Serum	Plazma	Yaş	Glukoz	Üre	Kreatinin	T.protein	Albumin	ALT	AST	Na	K	Ca	Hb	T.PSA	Sigara	Cinsiyet
Serum	Pearson Correlation	1																
	Sig. (2-tailed)																	
	N	77																
Plazma	Pearson Correlation	0,976**	1															
	Sig. (2-tailed)	0																
	N	77	77															
Yaş	Pearson Correlation	0,165	0,115	1														
	Sig. (2-tailed)	0,151	0,321															
	N	77	77	77														
Glukoz	Pearson Correlation	-0,079	-0,072	-,239*	1													
	Sig. (2-tailed)	0,496	0,535	0,037														
	N	77	77	77	77													
Üre	Pearson Correlation	-,247*	-,245*	0,022	0,087	1												
	Sig. (2-tailed)	0,03	0,032	0,847	0,452													
	N	77	77	77	77	77												
Kreatinin	Pearson Correlation	-0,089	-0,075	0,063	0,035	,736**	1											
	Sig. (2-tailed)	0,444	0,52	0,584	0,762	0												
	N	77	77	77	77	77	77											
T.protein	Pearson Correlation	0,049	0,069	0,041	0,074	0,001	-0,046	1										
	Sig. (2-tailed)	0,673	0,552	0,72	0,522	0,996	0,693											
	N	77	77	77	77	77	77	77										
Albumin	Pearson Correlation	0,054	0,057	0,024	0,155	-0,215	-0,181	,518**	1									
	Sig. (2-tailed)	0,641	0,621	0,835	0,179	0,061	0,114	0										
	N	77	77	77	77	77	77	77	77									
ALT	Pearson Correlation	0,143	0,142	-0,064	-0,032	-0,182	-0,179	-0,103	-0,047	1								
	Sig. (2-tailed)	0,215	0,217	0,578	0,784	0,114	0,12	0,37	0,685									
	N	77	77	77	77	77	77	77	77	77								
AST	Pearson Correlation	0,013	0,023	-0,075	0,019	-0,119	-0,158	-0,187	-0,221	,773**	1							
	Sig. (2-tailed)	0,912	0,843	0,518	0,867	0,301	0,17	0,104	0,053	0								
	N	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77							
Na	Pearson Correlation	-0,092	-0,079	0,179	-0,153	,333**	0,223	0,118	-0,005	-0,075	-0,137	1						
	Sig. (2-tailed)	0,427	0,494	0,119	0,183	0,003	0,051	0,308	0,962	0,515	0,236							
	N	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77						
K	Pearson Correlation	-,253*	-,254*	0,07	0,078	0,099	0,06	0,06	0,114	0,087	-0,008	0,064	1					
	Sig. (2-tailed)	0,026	0,026	0,548	0,498	0,394	0,603	0,604	0,323	0,452	0,946	0,582						
	N	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77					
Ca	Pearson Correlation	-0,097	-0,117	-0,001	-0,012	0,026	-0,05	-0,002	0,06	-0,042	-0,045	0,032	-0,106	1				
	Sig. (2-tailed)	0,401	0,312	0,99	0,917	0,823	0,667	0,99	0,603	0,719	0,7	0,784	0,36					
	N	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77				
Hb	Pearson Correlation	0,078	0,087	0,078	0,01	-0,056	-0,085	0,203	0,168	0,07	0,038	-0,145	-0,034	-0,04	1			
	Sig. (2-tailed)	0,5	0,453	0,502	0,931	0,629	0,464	0,077	0,145	0,545	0,741	0,21	0,772	0,729				
	N	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77			
T.PSA	Pearson Correlation	-0,157	-0,168	0,038	-0,119	-0,014	-0,107	-0,196	-0,226	-0,132	-0,074	0,04	-0,126	,729**	0,043	1		
	Sig. (2-tailed)	0,187	0,158	0,75	0,32	0,909	0,369	0,099	0,056	0,268	0,536	0,74	0,293	0	0,721			
	N	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72		
Sigara	Pearson Correlation	0,211	0,223	0,107	-0,111	-0,021	0,03	0,151	0,068	0,066	0,007	0,034	-0,126	0,086	-0,181	0,058	1	
	Sig. (2-tailed)	0,065	0,051	0,354	0,335	0,858	0,793	0,189	0,557	0,567	0,951	0,767	0,276	0,457	0,114	0,627		
	N	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	72	77	
Cinsiyet	Pearson Correlation	0,063	0,096	-0,065	-0,04	-0,034	-0,068	0,203	0,002	-0,041	-0,048	0,121	0,011	-0,025	-0,004	0,05	1	
	Sig. (2-tailed)	0,585	0,404	0,577	0,73	0,767	0,556	0,077	0,989	0,725	0,678	0,295	0,922	0,826	0,971	0	0,666	
	N	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	72	77	77
** p<0.01 (2-tailed).																		
* p<0.05 (2-tailed).																		