

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

PROSTAT KANSERİ TANISINDA YENİ BELİRTEÇLER:

İDRAR SARKOZİN VE SERUM PRO-PSA DÜZEYLERİ

Dr. MEDENİ ARPA

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2013



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

PROSTAT KANSERİ TANISINDA YENİ BELİRTEÇLER:

İDRAR SARKOZİN VE SERUM PRO-PSA DÜZEYLERİ

Dr. MEDENİ ARPA

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. ÖNDER ŞİRİKÇİ

İSTANBUL 2013

İçindekiler

ÖNSÖZ: v

ÖZET: vi

ABSTRACT viii

KISALTMALAR: x

1 GİRİŞ ve AMAÇ: 1

2 GENEL BİLGİLER: 3

2.1 Prostat Anatomisi 3

2.1.1 Zonal Anatomi 4

2.1.2 Vasküler Dolaşım 6

2.1.3 İnnervasyon 7

2.2 Prostat Histolojisi 7

2.3 Prostat Fizyolojisi 7

2.4 Prostat Hastalıkları 9

2.4.1 Benign Prostat Hiperplazisi 9

2.4.2 Prostat kanseri 10

2.4.3 Prostat Kanseri Tanısında Kullanılan Biyobelirteçler 12

3 GEREÇ ve YÖNTEM: 30

3.1 Biyopsi 31

3.2 PSA 32

3.3 fPSA 32

3.4 proPSA 33

3.5 B12 Vitamini 34

3.6 Folat 34

3.7 Kreatinin 34

3.8 Sarkozin 35
3.9 İstatistiksel Analiz 37
4 BULGULAR: 38
4.1 ROC Eğrileri.....43
5 TARTIŞMA: 51
6 SONUÇLAR: 56
7 KAYNAKLAR:.....57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Prostatın yerleşimi ve zonal anatomisinin kesitsel şematik görünümü 4
Şekil 2. Prostatın zonal anatomisi 5
Şekil 3. Prostat kanseri progresyonunun güncel modeli. 11
Şekil 4. İnsan kallikrein gen haritası 16
Şekil 5. ProPSA'nın aktivasyonu 17
Şekil 6. Prostat spesifik antijen moleküler modeli 18
Şekil 7. Prostat spesifik antijen'in moleküler formları 18
Şekil 8. Prostat spesifik antijene bağlı proteazlar. 19
Şekil 9. Prostat bezinin yapısal hasarı sonucu PSA'nın dolaşıma geçmesi. 21
Şekil 10. Aktif PSA ve serbest PSA'nın inaktif formları. 24
Şekil 11. ProPSA 25
Şekil 12. Farklı PSA izoformlarının oluşumu ve dağılımı. 26
Şekil 13. Metiyonin-sarkozin metabolizması 27
Şekil 14. Alfa-alanin, beta-alanin ve sarkozin moleküler yapıları 28
Şekil 15. Satürasyon biyopsisi 31
Şekil 16. Sarkozin kalibrasyon grafiği 36
Şekil 17. Alanin kalibrasyon grafiği 37
Şekil 18. Biyopsi pozitif ve negatif hastalardaki idrar sarkozin dağılımları 40
Şekil 19. Gleason skorlarına göre idrar sarkozini 42
Şekil 20. PSA, %fPSA, phi, sarkozin, proPSA ve prostat volümü ROC eğrisi 44
Şekil 21. 50-59 yaş arası PSA, %fPSA, phi, sarkozin, sarkozin-betaalanin ve prostat volümü ROC eğrisi 46
Şekil 22. 60-69 yaş arası PSA, p2PSA, phi, sarkozin, %fPSA ve prostat volümü ROC eğrisi 48
Şekil 23. Phi, phi yoğunluğu ve prostat volümü ROC eğrisi 49

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Prostat spesifik antijen'in moleküler formları 22
Tablo 2. Hastalarda ölçülen ve normal dağılım gösteren parametreler 38
Tablo 3. Hastalarda ölçülen ve normal dağılım göstermeyen parametreler.....41
Tablo 4. PSA, %fPSA, phi, sarkozin, proPSA ve prostat volümü duyarlılık ve özgüllükleri.....44
Tablo 5. PSA, %fPSA, p2PSA, phi, sarkozin ve prostat volümü %90 duyarlılıktaki kesim değerleri ve özgüllükleri 45
Tablo 6. Hastaların yaşlara göre dağılımı ve PSA kesim değerleri 45
Tablo 7. 50-59 yaş sarkozin, sarkozin-betaalanin, PSA, %fPSA, p2PSA, phi ve prostat volümü duyarlılık, özgüllük ve eğri altında kalan alanlar 47
Tablo 8. 60-69 yaş PSA, p2PSA, phi, sarkozin, %fPSA ve prostat volümü duyarlılık, özgüllük ve eğri altında kalan alanlar 48
Tablo 9. Phi, phi yoğunluğu ve prostat volümü duyarlılık, özgüllük ve eğri altındaki alanlar.....50

ÖNSÖZ:

Öncelikle asistanlık eğitimime katkısı olan ve tezi yapmamda desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Önder ŞİRİKÇİ ve Prof. Dr. Goncagül HAKLAR'a,

Eğitimime katkısı olan Prof. Dr. A. Kaya EMERK, Prof. Dr. Yavuz TAGA, Prof. Dr. A. Süha YALÇIN, Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER, Prof. Dr. Serpil BİRSEL, Doç. Dr. Betül KARADEMİR ve Yrd. Doç. Dr. Saime BATIREL'e,

Tezimi yapmamda yardımlarını eksik etmeyen, bilgilerinden faydalandığım Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi hocam Prof. Dr. Levent TÜRKERİ ve Uzm. Dr. İlker TINAY ile tez çalışmamda önemli yardımları dokunan Dr. Murat AKGÜL'e,

Beraber çalışma fırsatı bulduğum için kendimi şanslı hissettiğim ve tecrübelerinden faydalandığım arkadaşlarım Dr. Özgür BAYKAN, Dr. Rodi KARDAŞ, Dr. Tuncay SEYREKEL ve örnek toplama sürecinde yardımcı olan Dr. Ali YAMAN'a,

Bu zor zamanlarımda bana destek olan eşime,

Teşekkür ederim…

19.12.2013 Medeni ARPA

ÖZET:

Prostat kanseri, kansere bağlı ölümler arasında ilk üç sırada yer almaktadır. Prostat kanseri, genellikle uzun bir süre herhangi bir belirti vermeden ilerleyebilmektedir. Bu nedenle erken dönemde tespiti için tarama yapmak gerekmektedir. Günümüzde prostat kanserini erken dönemde tespit edebilmek için rektal muayene, serum prostat spesifik antijen (PSA) düzeyi, transrektal ultrasonografi (TRUS) ve biyopsi kullanılan temel araçlardır. PSA'nın en önemli avantajı duyarlılığının yüksek olmasıdır. Ancak bununla beraber özgüllüğünün yüksek olmaması nedeniyle yalancı pozitifliklere neden olmakta ve tanının doğrulanması için biyopsi gibi girişimsel ve pahalı olan ileri tetkikleri gerektirmektedir. Bu nedenle özgüllüğü yüksek olan biyobelirteçlere ihtiyaç vardır.

Prostat kanseri tanısındaki özgüllüğü artırmak için serbest PSA, proPSA ve phi (prostate health index) yeni kullanılmaya başlanan biyobelirteçlerdir. Buna rağmen halen özgüllüğün daha yüksek olduğu biyobelirteçler gerekmektedir. Son zamanlarda bir metiyonin metaboliti olan sarkozinin prostat kanseri tanısındaki rolü ile ilişkili çalışmalar yayınlanmaktadır. Ancak elde edilen sonuçlar kesin değildir.

Serum kreatinin değerini yükselten hastalıklar geçirmiş veya daha önceden hormon ablasyon tedavisi almış olan, ya da prostata yönelik herhangi bir cerrahi müdahale geçirmiş veya pelvik bölgeye herhangi bir endikasyonla radyasyon tedavisi almış olan hastaların yanısıra idrar yapamadığı için kateter takılması gereken hastalar ile B12 vitamini ve folat eksikliği gibi kriterlerden herhangi birini taşıyan hastalar bu araştırma kapsamı dışında bırakıldı. Söz konusu dışlanma kriterleri olmayan toplam 105 hasta biyopsi pozitif (n= 29) ve biyopsi negatif (n=76) olarak iki gruba ayrıldı. Bu hasta grupları BMI, serum folat, B12 vitamini, PSA, fPSA, %fPSA, proPSA (p2PSA) ve phi ile beraber idrar sarkozin, metiyonin, sistein, homosistein, alanin ve beta-alanin düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Sarkozin analiz edilirken, alanin izomerlerinden ayrıştırılarak gerçek sarkozin düzeyleri tespit edildi.

Prostat biyopsisi altın standart olarak kabul edilerek, PSA, %fPSA, p2PSA, phi ve sarkozin için duyarlılık ve özgüllük hesaplandı ve ROC eğrileri çizildi. Eğri

altında kalan alanlar hesaplanarak prostat kanseri tanısındaki performansları incelendi. Yaşa özgü referans PSA değerlerine göre hastalar kategorize edilerek parametrelerin o yaş aralığındaki performansları saptandı.

Yapılan değerlendirmede gruplar arasında sarkozin açısından bir fark tespit edilmezken, %fPSA ve prostat volümü biyopsi negatif grupta anlamlı olarak daha düşük, phi ise biyopsi pozitif grupta daha yüksekti. 50-59 yaş grubunda Sarkozin + betaalanin en yüksek eğri altında kalan alana sahipti. Gleason skorlarına göre biyopsi pozitif hastalar < 7 ve ≥ 7 olarak iki gruba ayrılarak yapılan analizde, sarkozin ve PSA düzeyleri Gleason skoru ≥ 7 olan grupta anlamlı olarak daha yüksekti. Tüm belirteçlerin duyarlılıklarının %90 olduğu kesim değerindeki özgüllükleri değerlendirildiğinde sırasıyla %fPSA, prostat volümü ve phi'nin PSA'dan daha yüksek özgüllüklere sahip oldukları görüldü.

Sonuç olarak idrar sarkozin'in prostat kanseri tanısında yararlı olmadığı, ancak Gleason skorunun ≥ 7 olduğu riskli prostat kanserinde kullanılabileceği görüldü. Phi, %fPSA, ve prostat volümünün prostat kanseri tanısında PSA'dan daha iyi oldukları ortaya kondu. Bunun yanı sıra phi hesaplamasında kullanılan parametrelere prostat volümünün eklenmesinin özgüllüğü iyileştireceği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Prostat, Kanser, PSA, Sarkozin, ProPSA, Phi

ABSTRACT:

Prostate cancer is among the top three causes of death due to all cancers. Prostate cancer can usually progress silently for a long time before giving any symptoms, therefore screening is necessary to detect the disease at an early stage. Currently, digital rectal examination, serum prostate specific antigen level (PSA), transrectal ultrasonography (TRUS) and biopsy are the fundamental tools used to detect prostate cancer. The greatest advantage of PSA is its high sensitivity. Nevertheless, its low specificity results in false positive results and invasive and costly tests like biopsy becomes necessary to confirm the diagnosis. For this reason new biomarkers with high specificity are needed.

Free PSA (fPSA), proPSA and phi (prostate health index) are biomarkers which are used to increase the specificity of the prostate cancer diagnosis. Still, the search for new biomarkers with higher specificity continues. Recently, articles regarding the role of sarcosine -which is a metabolite of methionine- in the diagnosis of prostate cancer have been published, but the results of these articles are inconclusive.

The patients were selected amongst men who applied to Marmara University Education and Research Hospital Urology Department and were decided to undergo prostate biopsy. Serum folate, vitamine B12, PSA, fPSA, %fPSA, proPSA (p2PSA), phi and urinary sarcosine, methionine, cysteine, homocysteine, alanine, and betaalanine parameters were analysed and the patients were divided into two groups as biopsy positive (n=29) and biopsy negative (n=76) according to their prostate biopsy results. The analysed parameters were evaluated whether there is any difference or not between biopsy positive and biopsy negative groups.

Diagnostic sensitivity and specificity of PSA, %fPSA, p2PSA, phi and urinary sarcosine were calculated using prostate biopsy results as the gold standard and ROC curve analyses were done. Their diagnostic performances were compared by calculating the AUC for these biomarkers. The patients were also categorized

according to their age groups and the biomarkers diagnostic performances were evaluated according to the reference range of PSA in that age group.

There was no difference regarding the urinary sarcosine levels between the groups, but %fPSA and prostate volume were significantly lower in the biopsy positive group whereas phi was significantly higher. Sarcosine + betaalanine had the biggest AUC in the 50-59 age group. When the patients were grouped according to their Gleason score as < 7 and ≥ 7; urinary sarcosine levels were found to be significantly higher in the ≥ 7 group. When the specificities of the biomarkers were evaluated at the cut-off value where their sensitivity was 90%, the %fPSA, prostate volume and phi were found to have specificities higher than PSA, respectively.

We conclude that, urinary sarcosine levels were not useful in the diagnosis of prostate cancer in our cohort, but that it can be used in risky prostate cancer cases with a Gleason score ≥ 7. Phi, %fPSA and prostate volume were found more specific than PSA in the diagnosis of prostate cancer. It was also found to improve the specificity when prostate volume was used together with phi.

Key Words: Prostate, Cancer, PSA, Sarcosine, ProPSA, Phi

KISALTMALAR:

BPH: Benign prostat hiperplazisi

fPSA: Serbest PSA

PSA: Prostat spesifik antijen

PSMA: Prostat spesifik membran antijen

[-2]pPSA(p2PSA): proPSA

CV: Değişkenlik katsayısı

TRUS: Transrektal ultrasonografi

DRM: Dijital rektal muayene

BMI: Vücut kitle indeksi

Phi: Prostat sağlık indeksi

PAP: Prostatik asit fosfataz

DHT: Dihidrotestosteron

ACT: alfa 1-antikimotripsin

A2M: alfa 2-makroglobulin

GC-MS: gaz kromatografi-kütle spektrometri

LC-MS: sıvı kromatografi-kütle spektrometri

1 GİRİŞ ve AMAÇ:

Prostat, sadece erkeklerde bulunan ve pelviste yerleşmiş küçük bir bezdir. Prostatın temel işlevi semen üretimine yardımcı olmaktır. Fonksiyonları androjenler tarafından düzenlenmektedir.

Normal bir dokuda hücrelerin bölünme hızı ile ölüm hızları arasında bir denge mevcuttur. Herhangi bir nedenle bölünme hızı ölüm hızını aştığında kanser dediğimiz kontrolsüz çoğalma gerçekleşir. Prostatta da aynı şekilde prostat hücrelerinin bölünme hızları ölüm hızlarının üstüne çıktığında prostat kanseri ortaya çıkmaktadır.

Prostat kanseri, kansere bağlı ölümler arasında ilk üç sırada yer almaktadır. ABD'de her yıl yaklaşık 200,000 erkek prostat kanseri tanısı almaktadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiye'deki prostat kanseri insidansı yüzbinde 37.6 olup erkeklerde ikinci en sık görülen kanser olarak belirtilmiştir. ProstaTÜRK çalışmasında Türkiye'de insidansı yüzbinde 35 olarak saptanmıştır (1).

Prostat kanserinin görülme sıklığı yaşla beraber artmaktadır. Prostat kanseri, genellikle uzun bir süre herhangi bir belirti vermeden ilerleyebilmektedir. Bu nedenle erken dönemde tespiti önem taşımaktadır. Ancak bu durumda da klinik olarak önemsiz hastalığın saptanması ve potansiyel olarak gereksiz tedavi yapılması olasılığı ortaya çıkmaktadır. Günümüzde prostat kanserini erken dönemde tespit edebilmek için dijital rektal muayene (DRM), serum prostat spesifik antijen (PSA) düzeyi ve transrektal ultrasonografi (TRUS) ve biyopsi kullanılan temel araçlardır. Ancak özgüllükleri düşük olduğu için prostat kanseri tanısını koymada özgüllüğü daha yüksek belirteç arayışları devam etmektedir.

Prostat kanserini erken dönemde saptamak için kullanılan en önemli biyobelirteç olan PSA 1971 yılında bulunmuş, 1986'da hastalığın takibi için, 1994'de de prostat kanseri tanısında kullanılmak üzere onay almış ve günümüzde de halen prostat kanserinin tanısında, tedavi ve takibinde kullanılmaktadır. PSA'nın en önemli avantajı duyarlılığının yüksek olmasıdır. Ancak özgüllüğünün düşük olması

nedeniyle özellikle benign prostat hiperplazisi (BPH) ve prostatit gibi durumlarda yalancı pozitifliklere neden olmaktadır. Bu yanlış pozitiflikler de tanının doğrulanması için biyopsi gibi girişimsel ve pahalı olan ileri tetkikleri gerektirmekte, hastalara gereksiz yere biyopsi yapılmakta bu da ülke ekonomisine ciddi bir yük getirmektedir. Bu nedenle özgüllüğü daha yüksek belirteçler bulunmaya çalışılmıştır. Bunlardan bazıları: Alfa-metilaçil koenzim A rasemaz (AMACR), glutatyon S-transferaz PI (GSTPI), kromogranin A (CGA), prostat kök hücre antijeni (PSCA), erken prostat kanser antijeni (EPCA), B7-H3, kaveolin-1, PCA3/DD3, TMPRSS2-ERG, GOLPH2, vb. Bunların çoğu istenen sonucu vermemiş ve kullanıma girmemiştir.

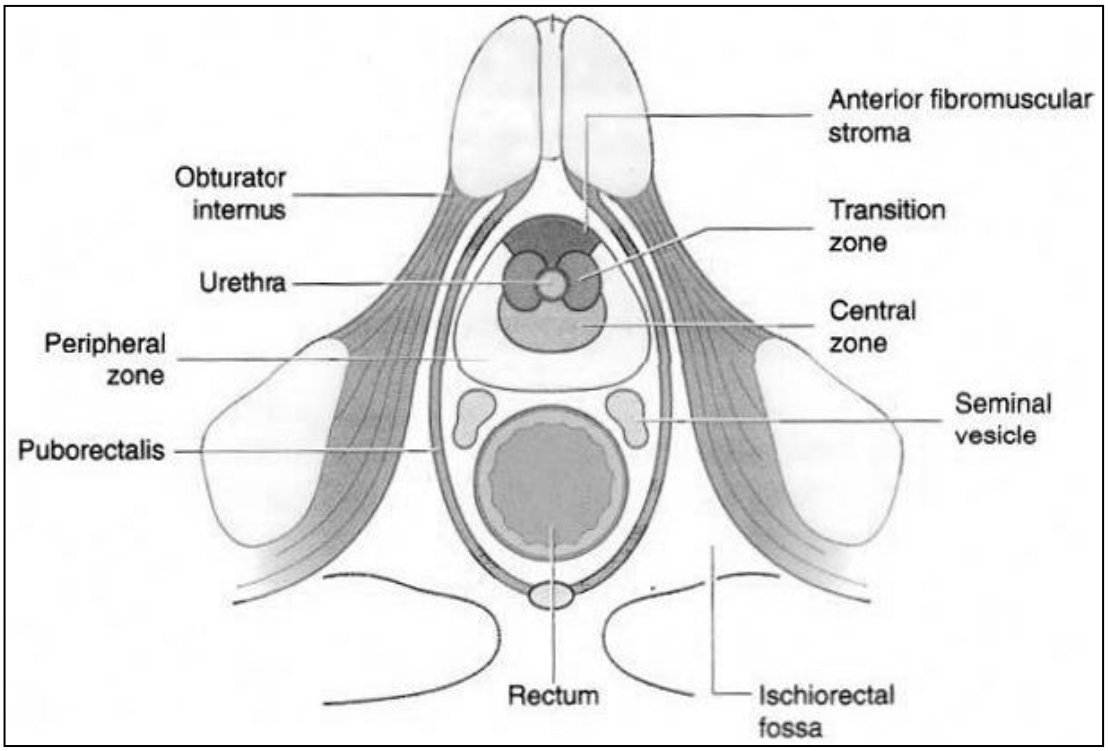
Bir metiyonin metaboliti olan sarkozinin biyobelirteç olarak kullanılabileceği yönünde Sreekumar ve arkadaşlarının (2) yaptığı çalışmadan sonra bu yönde farklı sonuçlar ortaya koyan başka çalışmalar yapılmıştır (3-7). Bu nedenle biz de son yapılan çalışmalarda prostat kanserinin tanısındaki yeri incelenen sarkozinin idrardaki düzeyinin ve bununla beraber proPSA ve phi'nin (prostate health index) mevcut biyobelirteçlerden daha üstün olup olmadığını kendi hasta grubumuzda incelemeyi amaçladık. Özgül olarak kullanılabilecek tanısal bir biyobelirteç, hastaların üzerindeki gereksiz biyopsi yükünü ve ülke ekonomisi üzerindeki finansal yükü ortadan kaldırabilecektir.

2 GENEL BİLGİLER:

2.1 Prostat Anatomisi

Kranio-kaudal boyutu yaklaşık 4 cm, antero-posterior boyutu yaklaşık 2.5 cm ve genişliği yaklaşık 3 cm olan prostat, mesanenin alt kısmında yerleşmiş olan ve erkek üretrasının proksimal kısmını çevreleyen fibromüsküler ve glandüler bir organdır (Şekil 1). Ovoid şekilli olmasına rağmen prostat anterior, posterior ve lateral yüzlere sahiptir ve altta daralmış bir apeks ile üstte mesane tabanı ile devam eden geniş bir tabana sahiptir. Prostat, kollajen, elastin ve yoğun düz kas yapısından oluşmuş bir kapsülle çevrilidir. Anatomik olarak gerçek pelvis içinde simfizis pubis ile rektumun ampullası arasında bulunur. Erişkinde normal ağırlığı 20 gram kadardır (8). Apeksi inferiorda, ürogenital diyaframın süperior fasyası üzerine uzanır. Prostatın posterior, anterior ve 2 adet infero-lateral yüzeyi vardır (9). Prostatın fibromüsküler stroması prostat içindeki kas elemanları ile bunlar da mesanenin kas dokusu ile devamlılık gösterir. Fibromüsküler stroma periferde yoğunlaşarak prostat kapsülünü oluşturur.

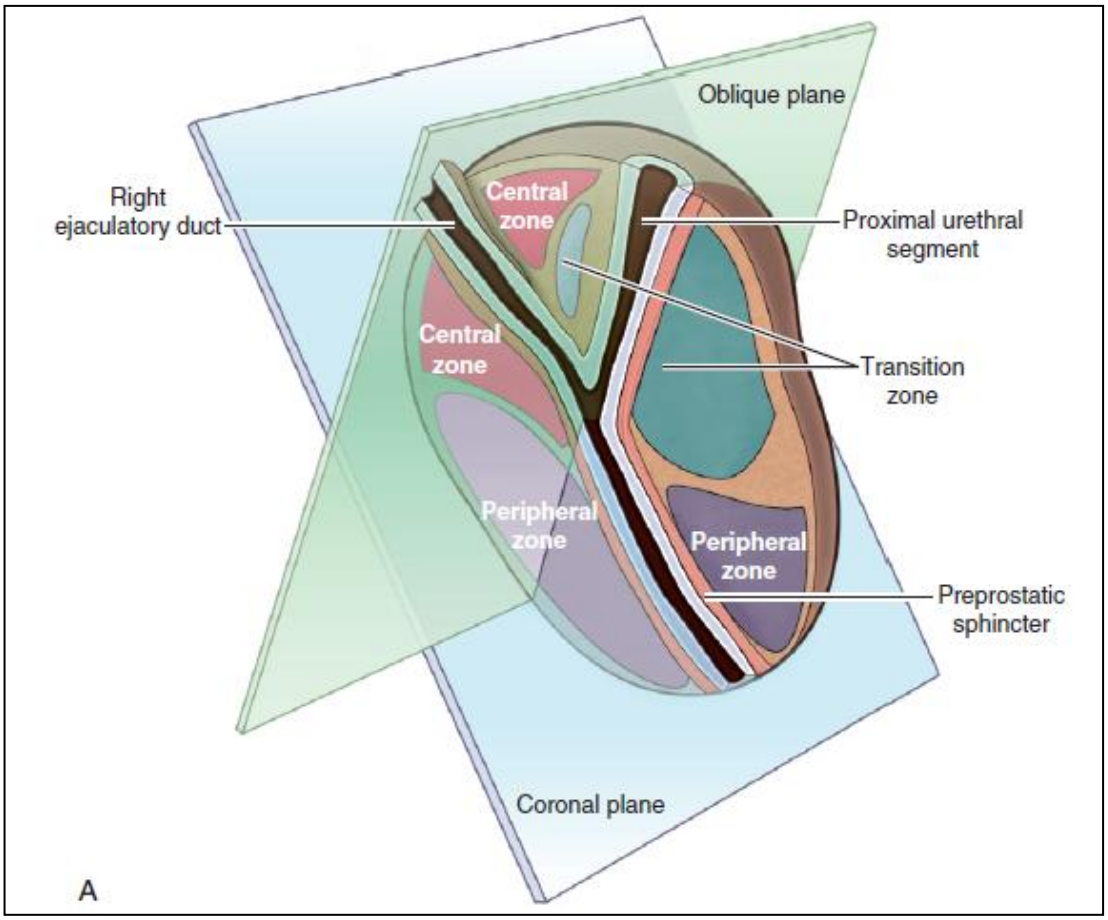
Denonvillier fasyası embriyolojik dönemde pelvik tabana doğru ilerleyen rektovezikal peritoneal boşluğun daha sonra oblitere olması sonucunda oluşur ve prostat ile rektum arasında önemli bir cerrahi ve anatomik bariyer işlevi görür. Posterior üretra prostat içinden geçer ve yaklaşık 2.5 cm uzunluğundadır. Üretranın bu bölümü prostat içinde apeks ve bazis arasındaki mesafenin hemen ortasında öne doğru 35 derecelik bir açı yapar. Seminal veziküller, prostatın süperoposterior komşuluğunda, mesane ve rektum arasında yer almış bir çift yapı olarak bulunur. Epididimlerin devamı olan vaz deferensler, bilateral seminal veziküllerin medial kısımlarına birleşerek beraber ejakülatuvar kanalları oluştururlar. Ejakülatuvar kanallar prostata arkadan girerler ve oblik bir seyirle öne ve aşağı doğru ilerleyerek eksternal sfinkterin hemen proksimalinde verumontanumun içinden prostatik üretraya açılırlar (8).



Şekil 1. Prostatın yerleşimi ve zonal anatomisinin kesitsel şematik görünümü

2.1.1 Zonal Anatomi

İlk olarak 1968'de McNeal'in, daha sonra 1977'de Blacklock ve Boushill'in anatomik diseksiyon çalışmalarını yayımlamaları ile prostatın iç yapısı ile ilgili zonal anatomi kavramı gelişmiştir. Bu sınıflama prostat dokusunun prostatik üretra ile olan ilişkisine dayanır ve günümüzde de halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sınıflamaya göre prostat periferal zon, santral zon, transisyonel zon, anterior fibromüsküler stroma ve preprostatik sfinkterik zondan oluşmaktadır (Şekil 2). Bunlardan ilk üçü prostatın glandüler kısmına karşılık gelirken, anterior veya ventral fibromüsküler stroma ile preprostatik sfinkterik bölge, prostat dokusunun non-glandüler kısmını oluşturur.



Şekil 2. Prostatın zonal anatomisi

Periferal zon, prostatın glandüler dokusunun büyük kısmını (yaklaşık %70) oluşturur ve bezin posterior ve lateral bölümlerini sarar. Apekse doğru ise anteriora uzanır ve apeks hizasında üretrayı tamamen çevreler. Periferal zonun glandüler kanalları, verumontanum ve distal prostatik üretraya açılır. Prostat apeksi bu bölgede prostatik kapsülün ince oluşu veya hiç olmayışı nedeni ile anatomik olarak zayıf bir bölgeyi oluşturur. Prostat kanserlerinin yaklaşık %70'i bu zondan kaynaklanır, ayrıca bu zon kronik prostatitten de en çok etkilenen bölgedir.

Santral zon glandüler prostat dokusunun yaklaşık %25'ini oluşturur ve prostat içerisinde seyreden ejakulatuvar kanalları çepeçevre sarar. Prostat kanserinin yaklaşık %10'u santral zondan kaynaklanır. Seminal vezikül ve vaz deferenslerin

santral zona girdiği bölge bu alanda belirgin bir prostat kapsülü bulunmaması nedeniyle anatomik olarak zayıf bir bölge oluşturmaktadır (10). Üstelik santral zon içinden geçen ejakulatuvar kanallar ile santral zon glandüler elemanları arasında yalnızca gevşek bir bağ dokusu vardır ve bu doku periprostatik dokunun prostat içine doğru bir girintisidir. Santral zonu periferal zondan yalnızca ince bir bağ dokusu bandı ayırmaktadır. Bu nedenle periferal zondaki bir karsinom odağı rahatlıkla burayı geçerek santral zona yayılım gösterebilir.

Transisyonel zon, küçük periüretral bezlerin hemen periferinde yer alan daha kompleks yapılı glandlardan oluşur. Benign prostat hiperplazisinin köken aldığı temel bölgedir, ayrıca prostat kanserinin %10'u da bu zondan kaynaklanır. Transisyonel zon, komşuluğundaki periferal ve santral zondan cerrahi kapsül adı verilen fibromüsküler bir doku ile ayrılır.

Anterior fibromüsküler stroma genellikle glandüler elemanlardan yoksun olan kalın bir bağ dokusu kılıfıdır. Prostatın ön yüzünü tamamen kaplar ve prostat kapsülünün anterior kısmını oluşturur. Preprostatik sfinkter, verumontanumun superiorunda üretral düz kas elemanlarının yoğunlaşması ile oluşur ve sfinkter mekanizmasına yardımcı olur. Bu bölüm retrograd ejakülasyonu önlemede de görev almaktadır.

2.1.2 Vasküler Dolaşım

Prostatın temel arteryel kan akımı, hipogastrik arterin anterior parçasının bir dalı olan inferior vezikal arterden sağlanır. Arteria pudentalis interna ve arteria rektalis media da prostatın arteryel beslenmesine yardımcı olan diğer arterlerdir (11).

Prostatın venöz drenajı, parankim içindeki venüllerin birleşerek prostatik venöz pleksusa (dorsal ven kompleksi) dökülmesi ile gerçekleşir. Bu pleksus kapakçık bulundurmaz ve puboprostatik ligamanlar arasında yerleşir. Penisin dorsal veni simfizis pubisin arka ve alt bölümünde bu pleksusa katılır. Prostatik venöz pleksusun bir kısmı vezikal venöz pleksusa ve bu yolla internal pudental vene dökülür. Büyük bir kısmı ise inferior vezikal venlere ve bu yolla internal iliak

venlere dökülür. Prostattan ayrılan lenf damarları obturator, eksternal iliak ve internal iliak lenf ganglionlarına drene olur. Bu bölgelerin drenajı ise ana iliak lenf nodları ve daha sonra preaortik lenf nodlarına olur. Prostattan çıkan bazı az sayıda lenfatikler ise sakral ve presiatik lenf nodlarına dökülürler (9).

2.1.3 İnnervasyon

Prostatın sinirleri inferior hipogastrik pleksustan gelmektedir. Prostat otonomik sinir sisteminin her ikisi açısından zengin bir sinir dağılımına sahiptir. Sempatikler tümüyle sekretuvardır. Fakat bazıları preprostatik sfinkteri de innerve ederler. Parasempatikler ise prostatın müsküler stromasına dağılırlar ve direkt olarak mesane kasları ile devam ederler; bu sayede preprostatik üretra için esas üriner sfinkterik fonksiyonu sağlarlar. Prostatın somatik sinirleri S2, S3 ve S4'den kaynaklanarak pudental sinir vasıtasıyla eksternal sfinkteri innerve ederler (9).

2.2 Prostat Histolojisi

Prostat, dairesel düz kas liflerinden ve üretrayı çevreleyen kollajen dokudan ibaret ince fibröz bir kapsülle sarılıdır. Bu tabakanın altında içinde epitelyal bezlerin yerleştiği bağ dokusu, elastik doku ve düz kas liflerinden ibaret prostatik stroma bulunur. Bu bezler, veru montanumla mesane boynu arasındaki üretra tabanına açılan yaklaşık 25 kadar ana ekskretuvar kanalla drene olurlar. Prostatik üretranın değişici epitelinin hemen altında periüretral bezler bulunur (8).

2.3 Prostat Fizyolojisi

Prostatın periferal zonu en geniş olan, en yüksek fonksiyonel aktiviteyi gösteren ve malignensilerin çoğunun (%85) gelişiği zondur. Periferal zon, içeriğinde sitrat, çinko,

kalsiyum, kolesterol, spermin, asit fosfataz ve başka bazı proteazlar içeren ince, sütsü, alkalen bir sıvı salgılar (12). Emisyon sırasında vaz deferensteki kasılmalarla birlikte prostat kapsülünde de kasılmalar olur ve bu sıvı semen sıvısına katılır. Prostat salgısının alkalen yapısı fertilizasyonda önemli bir rol oynar.

Prostat salgısındaki moleküllerin yapısı net olarak bilinmemekle beraber işlevleri konusunda çeşitli bilgiler mevcuttur. Çinkonun bakteriostatik işlevi olduğu düşünülmektedir (13). Prostatik asit fosfatazın (PAP) semendeki görevi net olarak bilinmemekle beraber metastatik prostat kanseri hücreleri bu enzimi kana salgıladıkları için klinik bir önemi vardır. Prostat salgısında bulunan moleküllerden biri olan sitrat prostatik sıvıda plazmadan 400-1500 kat daha fazladır (14). Normal hücrelerde sitrat, akonitaz enzimi ile geri dönüşümlü olarak izositrat'a dönüşmektedir. Ancak sıra dışı bir şekilde prostat hücrelerinin içinde yüksek çinko konsantrasyonu olması akonitazı inhibe ederek sitratın birikimine ve prostatik sıvıya yoğun bir şekilde salınmasına yol açmaktadır. Akonitaz inhibisyonu nedeniyle Krebs Döngüsü tamamlanamadığı için oksidatif yoldan ATP elde etmesi bozulur ve enerji elde etmek için glukoz ve aspartat ihtiyacı artar. Kanser gelişen prostat hücresinde ise çinko üretimi bozulduğundan akonitaz enzimi üzerinde olan baskı kalktığından oksidatif fosforilasyondan da enerji elde edilir ve bunun sonucunda da oksidatif stres artar (12). Prostatik sıvıda yüksek miktarda bulunduğu için prostat kanseriyle ilişkisi araştırılmış (15), ancak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.

PSA, prostatik epitelyumdan salgılanan ve seminal plazmada bulunan bir proteinazdır. PSA hem tripsin benzeri, hem de kimotripsin benzeri enzimatik etkiye sahiptir. PSA'nın biyolojik işlevi ejakulat pıhtısını eritmek ise de bu mekanizmanın fertilizasyondaki etkisi tam bilinmemektedir. Ancak günümüzde prostat kanseri tanısında ve tedavisinin etkinliğinin takibinde kullanılan çok önemli bir belirteçtir.

Prostat bezi androjen bağımlı bir organdır. Plazmadaki serbest testosteron prostatik hücrelere difüzyon yolu ile girdikten sonra prostatik enzimler aracılığı ile diğer steroidlere metabolize olur. Testosteronun önemli bir kısmı 5α-redüktaz enzimi aracılığı ile en önemli prostatik androjen olan dihidrotestosterona (DHT) geri dönüşümsüz olarak çevrilir. DHT, prostatın embriyolojik gelişiminde önemli bir

etkiye sahiptir ve erkek dış genital organlarının farklılaşmasını sağlar. Prostat fizyolojisinde 5α-redüktaz geninin ekspresyonu prostat ve karaciğerdeki androjenler tarafından kontrol edilmektedir. Bunun yanısıra 5α-redüktaz enzimi erkek tipi kellik, akne ve hirşutizm ve BPH ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır. 5α-redüktaz inhibitörlerinden finansterid ve duasterid klinik olarak BPH ve erkek tipi kelliğin tedavisinde yararlıdırlar (16).

2.4 Prostat Hastalıkları

Prostat, benign veya malign neoplazmlarıyla en çok hastalanan erkek organıdır (8).

2.4.1 Benign Prostat Hiperplazisi

Benign prostat hiperplazisi (BPH), erkeklerde en sık görülen benign tümör olup insidansı yaşla ilişkilidir. Otopsi çalışmalarındaki histolojik BPH prevelansı, 41-50 yaş erkeklerde yaklaşık %20'den, 51-60 yaş erkeklerde %50'ye ve 80'den yaşlı erkeklerde ise %90'ların üzerine çıkmaktadır. Ellibeş yaşındaki erkeklerin yaklaşık %25'i obstrüktif işeme semptomları bildirmektedir. Yetmiş beş yaşındaki erkeklerin %50'si idrar akımlarının gücünde ve çapında azalmadan yakınmaktadırlar (8).

BPH gelişimindeki risk faktörleri tam olarak anlaşılamamıştır. Çalışmalar genetik predispozisyonu ileri sürmekte veya ırksal farklılıkları bildirmektedir. Altmış yaşın altında BPH için cerrahiye giden erkeklerin yaklaşık %50'sinde hastalığın kalıtsal formu mevcut olabilmektedir. Bu form otozomal dominant özellikte olup bu hastaların birinci derecede erkek akrabaları yaklaşık 4 kat fazla göreceli risk taşırlar (8).

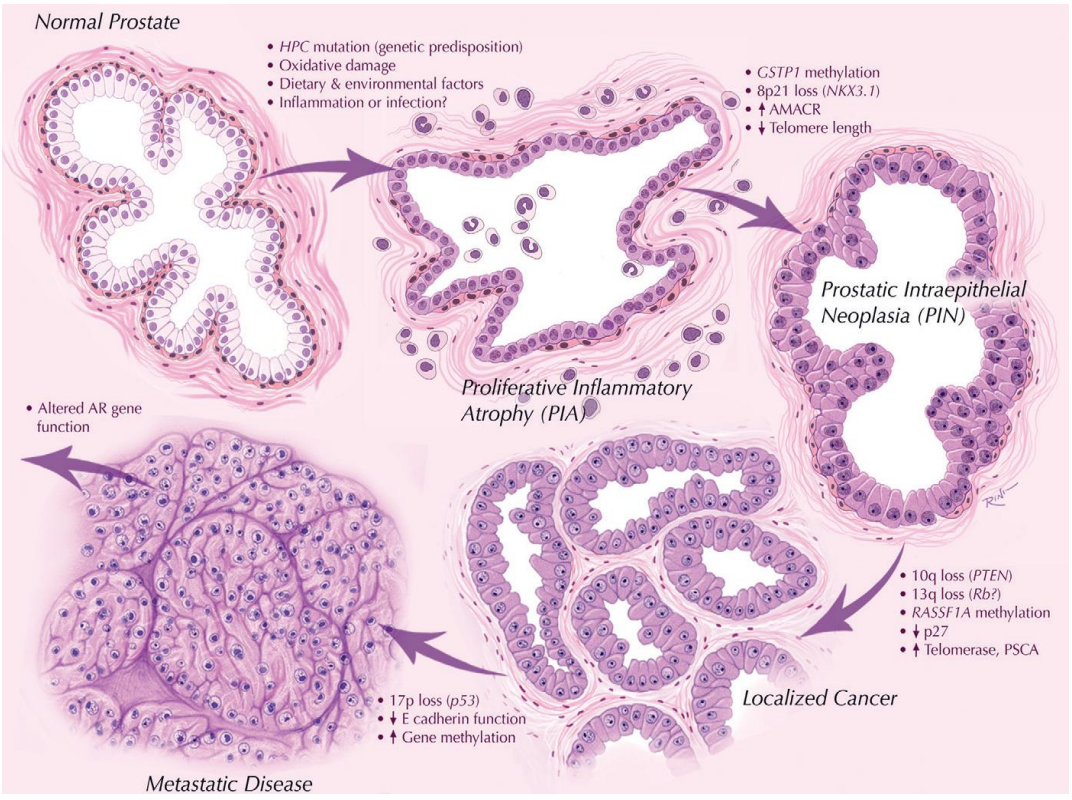
2.4.2 Prostat kanseri

Prostat kanseri, Amerikan erkeklerinde en sık tespit edilen kanser türüdür. Erkeklerde kanserden olan ölümlerin en sık görülen ikinci nedeni olmasına rağmen 1990'ların ortalarından beri ölüm oranları düşmektedir. Ancak kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümlerdeki azalmalar ve Amerikan erkeklerinin giderek yaşlanması nedeniyle yeni tedavi yöntemleri bulununcaya kadar prostat kanseri önemli bir sağlık sorunu olmayı sürdürecektir (17). Benzeri bir gelişmenin Türkiye dahil dünyanın pek çok ülkesinde beklenen yaşam süresinin giderek uzaması ile belli bir zaman sonra ortaya çıkacağı düşünülebilir. Bütün kanserler arasında prostat kanseri yaşla beraber en hızlı artış gösteren kanser türüdür. İnsidansları belli bir yaşta pik yapan birçok kanserin aksine yaşın ilerlemesiyle prostat kanseri insidansı da artmaya devam eder. Elli yaşında bir erkeğin ömründe latent prostat kanseri riski %40'tır. Mortalite oranları klinik belirgin prostat kanseri için %9.5 ve prostat kanseri için %2.9 düzeyindedir. Geç tespit edilip tedavi edilmeyen vakalar, ölümle sonuçlanabilirken bir bölüm prostat kanserleri ise hastaya zarar vermez ve önemsizdir. Biyolojik aktivitenin bu geniş yelpazesi bireysel olarak hastalar için karar vermeyi güçleştirebilir.

Prostat kanseri için bazı risk faktörleri tanımlanmıştır. Yukarıda belirtildiği gibi artan yaş prostat kanseri riskini yükseltir. Bundan yaşlanma sürecindeki hangi faktörlerin sorumlu olduğu bilinmemektedir. Bir erkekte prostat kanseri gelişme olasılığı 40 yaşın altında 1/10000 iken 40-59 yaş arası 1/103 ve 60-79 arası 1/8'dir. Afrika kökenli Amerikalılarda prostat kanseri gelişme riski beyazlardan daha yüksektir. Ek olarak Afrika kökenli Amerikalı erkekler tanı konduğunda beyazlardan daha ileri evre hastalık gösterme eğilimindedirler. Pozitif prostat kanseri aile öyküsü de prostat kanseri için göreceli riski arttırmaktadır. Göreceli risk başlangıç yaşı 70 ise 4 kat, 60 ise 5 kat ve 50 ise 7 kat artar.

Epidemiyolojik çalışmalar, insanların esasen yağdan fakir, bitkisel kökenli besinler tükettiği dünyanın bazı bölgelerinde klinik açıdan prostat kanseri insidansının çok daha düşük olduğunu göstermiştir (8). Ayrıca göçmenlerde yapılan

çalışmalar, düşük riskli ülkelerden Amerika'ya gelen gelen ve batı tarzı beslenenlerde prostat kanseri oranlarının birkaç kat artarak konaklanan ülkedekine yaklaştığını göstermiştir. Toplam alınan katı yağ, hayvansal yağ ve kırmızı et tüketimi yüksek prostat kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir. Buna karşın balık tüketimi riski azaltmaktadır. Obezitenin prostat kanseri üzerine etkisi konusunda hatırı sayılır sayıda çalışma mevcuttur. Bazı çalışmalar obezitenin daha ileri hastalık ve tedavi sonrası daha yüksek nüks riskiyle ilişkili olduğunu ileri sürmektedir. Ayrıca likopen, selenyum, omega-3 yağ asitleri ve E vitamini alımının koruyucu olduğu kalsiyumun ise riski arttırdığı gösterilmiştir ancak bu konuda fikir birliği bulunmamaktadır (8).



Şekil 3. Prostat kanseri progresyonunun güncel modeli.

Genetik yatkınlık, oksidatif hasar ve inflamatuvar değişiklikler prostat kanser gelişiminin erken basamaklarıyla ilişkilidir. *GSTP1* gibi koruyucu genlerin metilasyon ile "down" regülasyonu, neoplastik dönüşüm potansiyelini arttırabilir. Kromozomal kayıp ve telomer kısalması, genetik instabiliteye ve hastalığın ilerlemesine neden olabilir (18) (Şekil 3).

Prostat adenokarsinomunda tümörün biyolojik davranışının belirlenmesi, uygun tedavi yönteminin seçilmesinde oldukça önemlidir. Prostat kanserinin histolojik paterni, tümörün biyolojik potansiyeli ile yakın ilişkilidir (19-22). Prostatik adenokarsinomlarda en yaygın kullanılan derecelendirme sistem, glandüler yapıların diferansiyasyon derecesine dayanan Gleason derecelendirme sistemidir. Gleason skoru, prostat kanserinin histolojik değerlendirilmesinde en sık izlenen iki derecenin toplamının skor olarak değerlendirildiği ve yaygın olarak kullanılan bir sistemdir (19). Dereceler 1-5 aralığında olduğu için Gleason skorları 2-10 arasında değişmektedir. Gleason toplam skorları iyice farklılaşmış tümörlerin 2-4, orta derecede farklılaşanların toplamı 5-6 ve hiç farklılaşmamışlar ise 8-10 arasındadır. Gleason toplamı 7 olan hastalardan primer Gleason derecesi 4 (4+3) olanlar, primer Gleason derecesi 3 (3+4) olanlara göre daha kötü prognoza sahip olma eğilimindedir (23).

2.4.3 Prostat Kanseri Tanısında Kullanılan Biyobelirteçler

Tümör biyobelirteçlerinin keşfi ve kullanıma girmesi birçok kanserin erken saptanması ve evrelenmesini pozitif yönde etkilemiştir. Erken tanıyı sağlamaları nedeniyle tümör biyobelirteçleri tedavi başarı oranlarını arttırmıştır. Optimal bakım ve tedavi sadece erken tanı koymakla mümkün olmamaktadır, bununla beraber klinik nüksü tespit edebilecek kadar etkili bir takip te gereklidir (16).

Yeni biyobelirteçlerin ortaya çıkarılması ve bunların hassas yöntemlerle ölçülmesi tedavi oranlarının artmasına katkıda bulunacaktır. Prostat kanserine yaklaşım, kullanılan biyobelirteçlerdeki ilerlemelerden ötürü, bazı dramatik değişikliklere uğramıştır (24). Prostat kanserinde kullanılan ilk biyobelirteç prostatik

asit fosfataz (PAP)'dır. Gutman ve arkadaşları (25), 1930'larda kemiğe metastaz saptanan prostat kanserli hastalarda metastaz yerinde PAP aktivitesinin, serumda da PAP protein seviyesinin yükseldiğini ortaya koymuşlardır. Ardından PAP düzeylerinde varyasyonların gösterilmesi, bunun bir biyobelirteç olarak kullanılmasının sorgulanmasına yol açmıştır. 1970'lerde PSA saflaştırılmış ve 1994'te 4 ng/mL normal aralığın üst sınırı olarak belirlenerek tanı amacıyla kullanılmak üzere onay alıp kullanıma girmiştir (16).

Ürolojik kanserler arasında ilerleme ve uygulamalardan en çok faydalanan prostat kanseridir. 1979'da keşfedilen PSA, 1990'ların başlarında kullanıma girmiş ve halen de prostat kanseri taramasında kullanılan çok değerli bir araçtır. Prostat kanseri taramasında PSA kullanımının yayılmasıyla prostat kanserine yönelik farkındalık artmıştır. PSA kullanımı ile birlikte, prostatta sınırlı kanserlerin tespit edilmelerini ve tedavi oranlarını arttırmıştır. Dolayısıyla 1980'lerin sonu ve 1990'ların başında prostat kanserlerinin önemli bir kısmı anormal DRM ve/veya yükselmiş PSA değerleriyle tespit edilirken, günümüzde tespit edilen prostat kanserlerinin çoğunluğu klinik olarak ele gelmeyen, ancak 2.5 ile 10 ng/mL arasında PSA değerlerine sahip olanlardır (16).

PSA, prostat hastalıklarının tanısında kullanılmaktadır; ancak özgüllüğü düşük olduğu için yanlış pozitif sonuçlara neden olmaktadır. Geniş çapta prostat kanseri için bir biyobelirteç olarak kabul edilmesine rağmen, PSA hastalığa değil, organa özgüldür. Bu nedenle, prostatın doku yapısıyla ilgili kanser, enflamasyon ya da BPH gibi tüm durumlarda PSA serum seviyeleri yükselmektedir. Günümüzde serum PSA düzeyi 2.6 ng/mL'nin üstünde olanlarda TRUS eşliğinde biyopsi önerilmektedir. PSA değeri 4-10 ng/mL arasında olanların sadece %20-30'unda prostat kanseri saptanabilmekte, hastaların %70-80 kadarına gereksiz biyopsi yapılamaktadır (26). Bazı durumlarda ise yalancı negatif sonuca yol açacak şekilde biyopsi ile kanserli alandan örnek alınamayabilmekte ve bu yüzden de mevcut kanser biyopsi ile bile tespit edilemeyebilmektedir. Bu amaçla PSA yoğunluğu, PSA değişim hızı, yaşa göre PSA değerleri ve daha yeni olarak PSA türevleri gibi belirteçler tanı performansını arttırmak için kullanılmaktadır. Ancak halen prostatın

iyi huylu hastalıklarıyla kanseri ayırdetmek için, yeni biyobelirteçlere ihtiyaç vardır (16).

1991'de Lilja ve arkadaşları (27) ve Stenman ve arkadaşları (28) tarafından yapılan çalışmalarda serumda PSA'nın iki formu olduğu ortaya konmuştur: bir serum proteaz inhibitörü olup alfa-1 antikimotripsine (ACT) kovalan olarak bağlı olan kompleks PSA (cPSA) ve kompleks olmayan serbest PSA (fPSA). Bu bulguların ardından PSA'ya bağlı özgüllük sorununu çözmek için öncelikli olarak fPSA'nın toplam PSA'ya oranı (fPSA/PSA) kullanılmaya başlanmıştır. Yüzde fPSA'nın kullanımı 4-10 ng/mL arasındaki PSA değerlerine sahip erkeklerde anlamlı şekilde prostat kanserinin saptanma olasılığını arttırmıştır. Ancak PSA <4 ng/mL olduğu durumlarda ise fPSA oranının kanseri tanımlamada çok etkili olmadığı ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalarda, PSA değerinin 2.5-4 ng/mL arasında olduğu durumlarda %25 oranda prostat kanseri gelişme riski olduğundan, biyopsi yapılması önerilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda fPSA'nın da 3 alt birimden oluştuğu tespit edilmiştir: inaktif PSA, proPSA (pPSA) ve BPH ile ilişkili olan BPSA. ProPSA, 7 adet APLILSR aminoasitten oluşan bir öncül peptit içermektedir. Bu peptidin içerdiği aminoasit sayısına göre [-7]pPSA, [-4]pPSA ve [-2]pPSA (p2PSA) formlarında bulunmaktadırlar. Kanserli prostat dokusunda pPSA artarken, BPSA ve inaktif PSA'nın azaldığı ve BPH'lı hastalarda ise transizyonel zondan üretilen BPSA artarken, pPSA'nın azaldığı gösterilmiştir (29). Catalona ve arkadaşları (30) tarafından yapılan çalışmada ise serum PSA değeri 2-10 ng/mL arasında olan hastalarda pPSA'nın tanıda özgüllüğü arttırdığı ve özellikle de 2-4 ng/mL aralığındaki hastalarda daha yararlı olduğu saptanmıştır. Bu araştırmada PSA değerinin 2-10 ng/mL arasında olduğu durumlarda, pPSA'nın %fPSA ve PSA'dan daha özgül olduğu ortaya konmuştur. pPSA ile ilgili çalışmaların ardından PSA, fPSA ve p2PSA'nın beraber kullanıldığı "*prostate health index*" (*phi*) olarak tanımlanan, (p2PSA/fPSA)x√PSA şeklinde hesaplanan ve prostat kanserinin erken tanısındaki özgüllüğü daha fazla artıran bir indeks geliştirilmiştir (31). Bu indeksle birçok çalışma yapılmış olup sonuçlar, PSA değeri 2-10 ng/mL arasında olan hastalarda ve ayrıca %fPSA'nın da yetersiz kaldığı 2-4 ng/mL aralığında phi'nin

prostat kanserinin tanısında özgüllüğünün daha yüksek olduğu yönündedir (32). Yine Lughezzani ve arkadaşlarının (33) biyopsi kararı vermede %p2PSA ve Phi değerinin eşik değerlerini belirlemek için yaptıkları çalışmada duyarlılık ve özgüllüğü dengeleyecek eşik değerin phi için 42, %p2PSA için 1.78 olduğunu ortaya koymuşlardır. Tüm bu parametrelerin yanısıra prostat kanserinin tanısında kompleks PSA, yaşa özgü PSA, PSA yoğunluğu ve PSA değişim hızı gibi parametreler de kullanılmaktadır. Tüm bunlara rağmen halen sadece prostat kanserinde yükselip diğer iyi seyirli durumlarda yükselmeyen ve hastaları gereksiz yere biyopsi olmaktan kurtaracak yeni biyobelirteçlere ihtiyaç vardır.

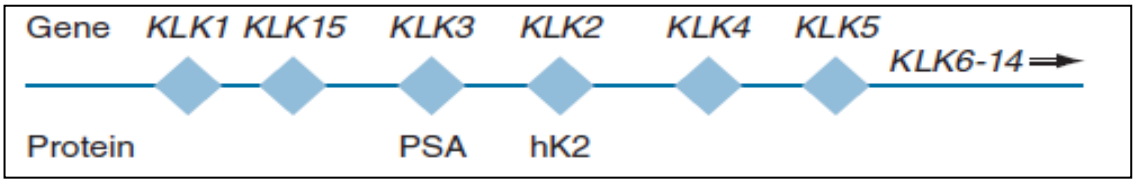
Prostat Spesifik Membran Antijeni

Glikoprotein yapıda olan prostat spesifik membran antijeni (PSMA), bir folat hidrolazdır ve tüm prostatik epitelyal hücrelerin membranlarında bulunmaktadır. Aminoasit rezidüleri içinde hidrofobik aminoasitlerin bulunması, bu proteinin hücre içinde küçük hücreler dışında yerleşmiş geniş bir alana sahip tip 2 integral membran proteini olduğunu ortaya koymaktadır. PSMA geninin, 11. kromozomun kısa kolu (11p11-p12) üzerinde olduğu tespit edilmiştir. PSMA, santral sinir sisteminde, barsakta ve prostatta tanımlanmıştır. Beyinde PSMA, *N-asetil-aspartil-glutamat* nörotransmiterinin metabolizmasına katılmaktadır. Barsakta, ince barsak proksimal bölümüne yerleşmiş olup karboksipeptidaz olarak görev yapmaktadır. Diğer dokularda da izole edilmiş olmasına rağmen PSMA, ağırlıklı olarak prostat bezinden salınmaktadır. Çalışmalar tanıdan ziyade daha çok PSMA'nın tedavi stratejilerinde kullanımı üzerine odaklanmıştır. PSMA proteininin hem hücre içi, hem de hücre dışı epitoplarını tanıyacak çoklu monoklonal antikorlar üretilmiştir. PSMA varyantlarından PSM´ olarak bilineni farklı olarak normal dokuda, BPH ve prostat kanserinde salınmaktadır**.** Su ve arkadaşları (34) 1995'te yaptıkları çalışmada PSMA/PSM´ oranının, BPH ve normal doku ile kıyaslandığında prostat kanserinde 3-6 kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Horoszewicz ve arkadaşları (35) 1987'de yaptıkları çalışmada artmış PSMA düzeylerinin kanser olmayan hastalarda %5 oranında bulunmasına karşın prostat kanseri hastalarında %47 oranında

bulmuşlar ve sağlıklı kontrollerde ise negatif sonuçlar tespit etmişlerdir. Tanı, tarama ve takipte PSMA bir biyobelirteç olarak birçok laboratuvarda araştırılmaya devam etmektedir.

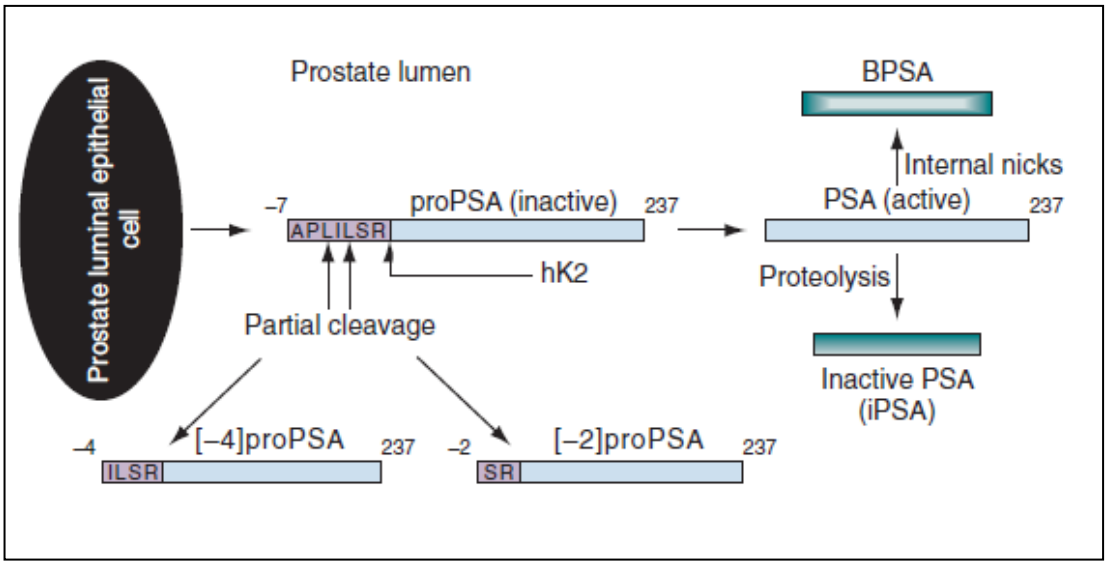
İnsan Kallikrein Gen Ailesi

On beş üyesi olan bu gen ailesinden sadece üç gen tanımlanmıştır: pankreatik/renal kallikrein *(hKLK1),* insan kallikrein 2 *(hKLK2)* ve PSA *(hKLK3)* genleri. Bu genler 19. kromozomun uzun kolu üzerinde q13.2-q13.4 bölgesinde yerleşmiş ve benzer yapısal özelliklere sahiptirler (Şekil 4). Serin proteazlar, hPRK (*KLK1* geni), hK2 veya hGK-1 (*KLK2* geni) ve hK3 ya da PSA (*KLK3* geni) olarak tanımlanan üç temel gen tarafından kodlanmaktadır. Bu genlerden hK1, PSA ile %60 homolojiye sahipken, hK2 %78 homolojiye sahiptir. Hem hK2, hem de hK3 prostatik epitelden zimojen formda salınmaktadır. Yapısal olarak aynı homolojiye sahip oldukları için ikisi de A2M ve ACT gibi endojen proteaz inhibitörleriyle kompleks oluşturabilmektedirler.



Şekil 4. İnsan kallikrein gen haritası

hK2'nin PSA'dan öncül bir aminoasit sekansını koparark (proPSA) PSA aktivitesini düzenlediği ve bu şekilde PSA'yı aktifleştirdiği gösterilmiştir (Şekil 5). Bununla beraber prostat kanserinde hK2 düzeyleri artmasına rağmen, PSA ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (36,37). Yüksek kan PSA düzeyleri ise prostat bezinin yapısal hasarı sonucu prostattan kana PSA geçişinin artmasıyla açıklanabilir.

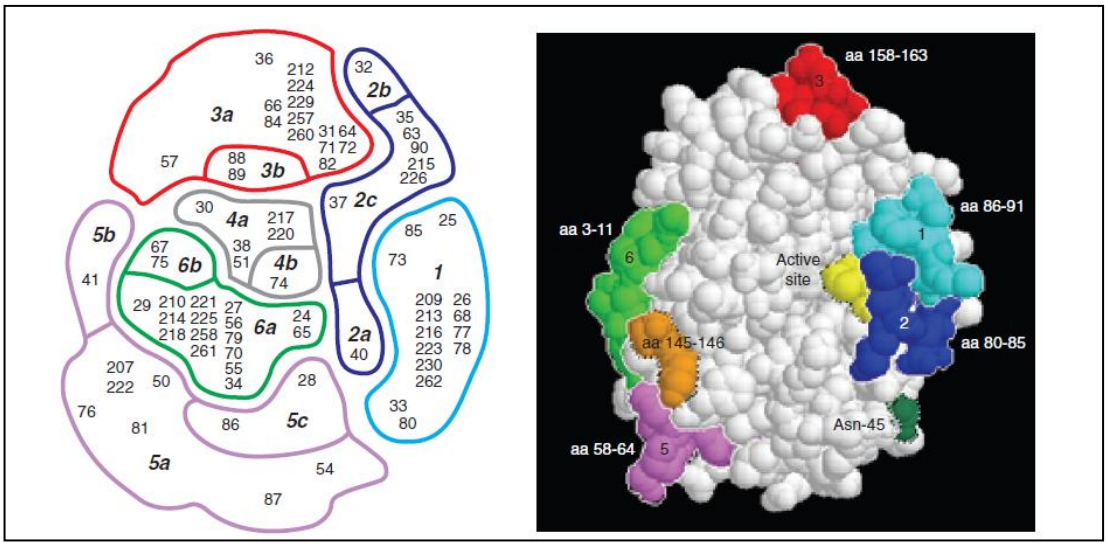


Şekil 5. ProPSA'nın aktivasyonu

PSA ile benzer olarak, hK2'nin de prostat kanserinin saptanmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir (38-40). Diğer kallikrein ailesi serin proteaz üyelerinin de yararlı tümör belirteci olabilmesi muhtemeldir. Hem hK6, hem de hK10 nonprostatik hastalıklarda özellikle de over kanserinde potansiyel serum biyobelirteçleri olarak tanımlanmıştır (41).

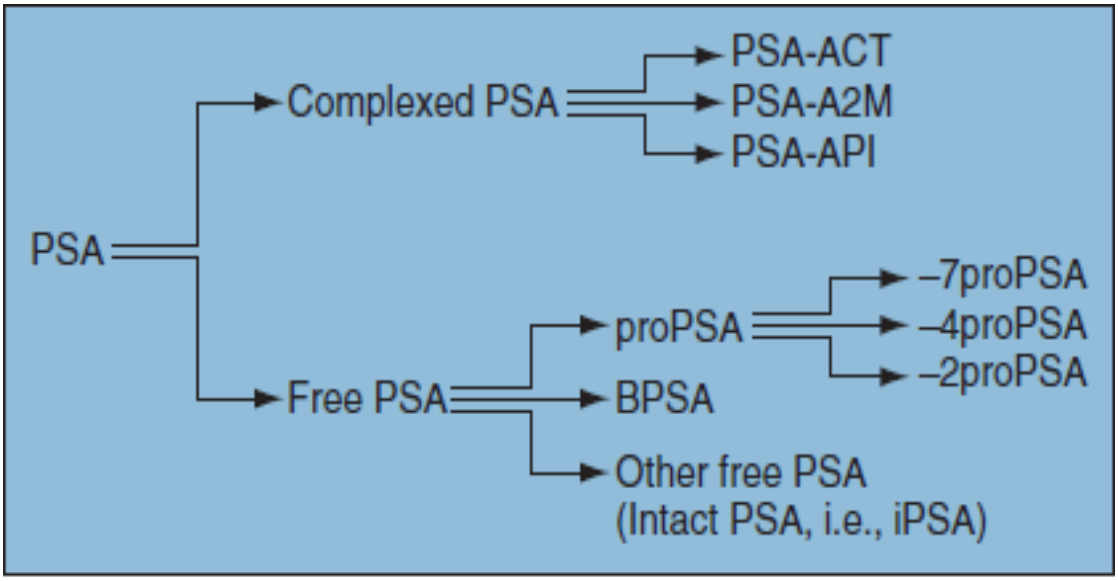
Prostat Spesifik Antijen (PSA)

PSA olarak ta bilinen hK3, kallikrein ailesinin en iyi bilinen üyesidir. İlk olarak 1970'lerin sonlarında tespit edilip saflaştırılmış, ancak klinik ürolojide kullanıma girmesi bir dekadı bulmuştur. PSA, 237 aminoasit residüsü ile 4 karbonhidrat yan zincirinden oluşan 30 kDa ağırlığında glikoprotein yapıda bir serin proteazdır (Şekil 6). Malign meme kanser dokularında, normal meme dokusunda, anne sütünde, kadın serumunda ve adrenal ile renal karsinomlarda düşük miktarlarda ektopik PSA ekspresyonu olduğu bildirilmiştir. Buna rağmen klinikte ve pratik kullanımda PSA organa özgüldür, primer olarak prostatik kanal epitelyum hücrelerinden sentezlenmektedir.



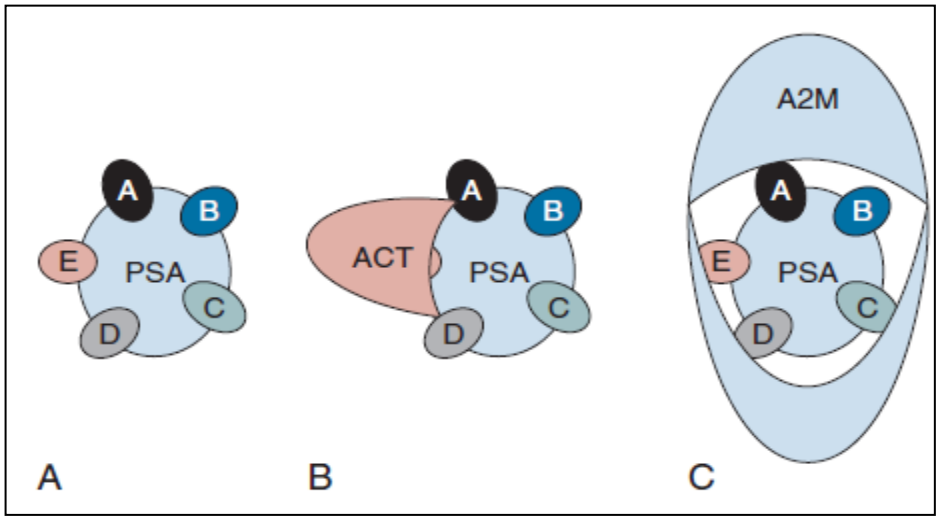
Şekil 6. Prostat spesifik antijen moleküler modeli

Organa özgül olmasına rağmen, PSA kansere özgül değildir. Bu proteazın görevi, semende bulunan semenojelin ve fibronektin proteinleri üzerine etki ederek, semeni sıvılaştırmaktır. PSA normalde serumda düşük konsantrasyonlarda (ng/mL) bulunmaktadır. Serumda PSA bağlı ve serbest formlarda dolaşmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. Prostat spesifik antijen'in moleküler formları

Proteolitik aktivitesi olmayan serbest PSA muhtemelen seruma salınmadan önce prostatik epitelyal hücre içinde inaktifleştirilmiştir. Bu inaktif serbest PSA, antiproteazlarla kompleks oluşturmamaktadır ve mevcut analizlerle tespit edilebilmektedir (27). Serumdaki PSA'nın çoğu ACT ve A2M ile kompleks oluşturmuş halde bulunmaktadır. Bu komplekslerin proteolitik aktivite yönünden aktif ya da inaktif olmalarının analitik olarak ölçülmelerine herhangi bir etkisi yoktur. PSA'nın ACT'ye bağlanması ile oluşan PSA-ACT kompleksi, inaktif olmasına rağmen mevcut analizlerle tespit edilebilmektedir. PSA'nın A2M'ye bağlanması sonucu oluşan PSA-A2M kompleksi proteolitik aktiviteye sahip olmasına rağmen mevcut analizlerle tespit edilememektedir (Şekil 8) (16).



Şekil 8. Prostat spesifik antijene bağlı proteazlar.

A. Serbest PSA ve A'dan E'ye immünreaktif epitoplar. B.ACT bağlanırken E epitopunu bloklamaktadır. C.A2M PSA üzerindeki tüm immünreaktif epitopları bloklamaktadır

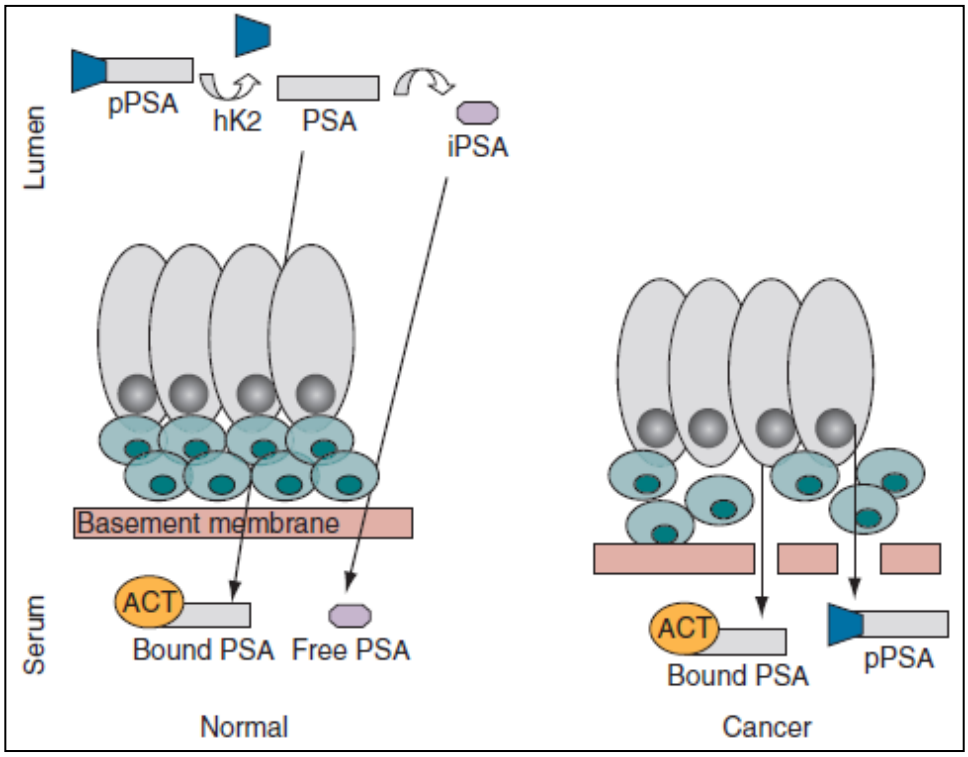
Prostat kanser hücreleri, normal prostat hücrelerinden daha fazla PSA yapmamaktadır. Artmış serum PSA seviyeleri ise muhtemelen kanser progresyonuna ve prostatın histolojik yapısının bozulmasına bağlıdır (42).

Yapılan çalışmalar, prostat kanser hücrelerinin daha fazla PSA üretmediği aksine normal prostatik dokudan daha az PSA üretimi yaptığını ortaya koymuştur. Prostat kanserli doku örnekleri incelendiğinde normal prostat dokusuna göre 1.5 kat daha az mRNA ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. PSA ekspresyonu güçlü bir şekilde androjenler tarafından etkilenmektedirler. Prostat dokusunda PSA'nın immünohistokimyasal olarak tespit edilmesi 0 ve 6 ay arası ile 10 yıldan sonra olmak üzere bimodal pikler şeklinde olması nedeniyle direkt olarak testosteron seviyeleriyle uyumludur. Serum PSA, pübertede lüteinizan hormonun ve testosteronun yükselmesiyle tespit edilebilir seviyeye ulaşmaktadır.

Prostat kanseri yokluğunda, serum PSA düzeyleri yaş, cinsiyet ve prostat volümüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir. BPH olmayan erkeklerde yıllık PSA değişim oranı 0.04 ng/mL iken, BPH olanlarda ise 60 ile 85 yaş arasında bu oran 0.07-0.27 ng/mL arasında değişmektedir (43). Kombine çalışmalardan elde edilen veriler, PSA'nın prostat volümünün her mililitresi için %4 oranında arttığını öne çıkarmıştır. Bu da prostat volümüne bağlı olarak %30 oranında, yaşa bağlı olarak %5 oranında PSA'nın değişiklik gösterebileceğini ortaya koymuştur (44). Prostat kanseri olmadan siyahlar daha yüksek PSA değerlerine sahiptirler (45). Yükselmiş serum PSA seviyeleri, muhtemelen prostat bezi içindeki hücresel yapının yıkım ürünüdür (16).

Normal bir prostat bezinde bulunan bazal tabaka ve bazal membran tarafından oluşturulmuş olan bariyerin kaybı PSA'nın dolaşıma geçişini sağlar (Şekil 9). Bu durum prostat hastalıklarında (BPH, prostatit, prostat kanseri) ve prostat müdahalelerinde (prostat masajı, prostat biyopsisi) ortaya çıkabilmektedir. Prostatik biyopsi gibi travmalar PSA'nın dolaşıma sızmasına neden olabilmekte ve tekrar normale dönebilmesi için 4 hafta gerekmektedir. Ayaktan muayene edilen bir hastaya uygulanan DRM de serum PSA seviyesinin artmasına yol açabilir, ancak PSA'daki bu değişikliğin klinik olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Ejekülasyonun serum PSA seviyelerine etkisi üzerine yapılan çalışmalarda 30-40 yaş ve daha gençlerde anlamlı olarak bir etki bulunamamıştır. Bunun yanında prostat kanserinin erken tanısı için tarama yapılan yaş grubunda (50 yaş ve üzeri) ise ejekülasyonun yanlış

pozitifliğe neden olacak şekilde PSA serum seviyelerinin yükselmesine yol açtığı tespit edilmiştir. Çoğu erkekte 48 saat içinde bu artış bazal düzeylere geri döner (16).



Şekil 9. Prostat bezinin yapısal hasarı sonucu PSA'nın dolaşıma geçmesi.

Prostatik hastalık varlığı (prostat kanseri, BPH, prostatit) PSA'nın serum seviyelerini etkileyen en önemli faktördür. PSA'daki yükseklikler prostat hastalığının işaret edebilir, ama her prostat hastalığı olanda PSA yüksekliği görülmeyebilir. Yani PSA yüksekliği her zaman prostat kanserine özgül değildir (16).

Prostat Spesifik Antijen'nin Moleküler Türevleri

PSA'nın kullanıma girmesinden bu yana en heyecan verici ve klinik olarak yararlı keşiflerden biri serumda PSA'nın farklı moleküler formlarının gösterilmesidir.

Ölçülebilen PSA'nın proteinlerele kompleks halde (bağlı, cPSA) ya da serbest (bağlanmamış) formda (fPSA) kanda dolaştığı bulunmuştur.

Kanda PSA'ya bağlandığı bilinen üç protein vardır: ACT, A2M ve alfa1-proteaz inhibitör (API). Seruma geçen PSA'nın %70 kadarı bağlı formdadır. A2M'ye bağlandığında, tüm PSA epitop bölgeleri maskelenmektedir ve bu da kompleksin ölçülmesini zorlaştırmaktadır. Serumda bulunan kompleks PSA türevleri arasında immünreaktif olan PSA-ACT, en yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (Tablo 1). Total PSA ile kıyaslandığında daha düşük oranda kanda bulunan serbest PSA da immünoreaktif olduğu için ölçülebilmektedir (16).

Tablo 1. Prostat spesifik antijen'in moleküler formları

PSA TÜRÜ	**SERUMDAKİ YÜZDESİ**
Kompleks PSA	***60-95***
PSA-ACT	60-90
PSA-API	1-5
PSA-A2M	10-20
Serbest PSA	***5-40***

PSA Analitik Metodoloji

PSA ölçümü için ticari immünometrik yöntemler kullanılmaktadır. Çoğu yöntemde enzim, floresans ya da kemilüminesans gibi non-izotopik işaretleyiciler kullanmaktadırlar. Bu yöntemlerin ağırlıklı bir kısmı otomatize sistemlerde yapılmaktadır. Farklı ölçüm yöntemleri, hatta aynı ölçüm yönteminin farklı üretim partileri ile yapılan ölçümler bile farklı sonuçlar üretilebilmektedir. Antikorlar farklı PSA epitoplarıyla reaksiyona girebilmekte ve dolayısıyla farklı moleküler formların analizine izin vermektedir.

Yöntemler, eşmolar ve noneşmolar olarak ikiye ayrılmıştır: Eğer fPSA ve cPSA'ya eşit oranda bağlanıyorsa eşmolar, bağlanmıyorsa noneşmolardır. Dünya

Sağlık Örgütü, Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu ve Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi, PSA yöntemlerinin standardizasyonu sağlamak için uluslararası iki preparat geliştirmişlerdir: %100 fPSA (code 96/686) ve %90 PSA-ACT kompleksi ve %10 fPSA (kod 96/700). Bu şekilde ölçülen PSA düzeylerinin birbirleriyle karşılaştırılabilir olması amaçlanmıştır.

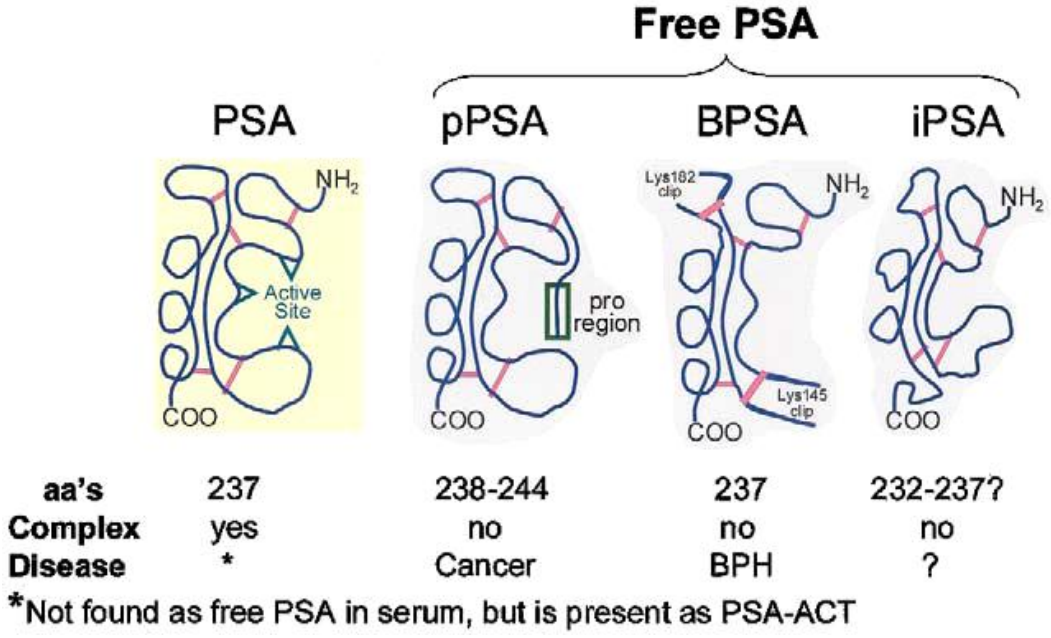
Serbest Prostat Spesifik Antijen (fPSA)

Serum PSA daha çok proteazlarla kompleks oluşturmuş halde bulunmaktadır ve PSA'nın %5-35 kadarı da fPSA olarak bulunmaktadır. Prostat kanser hücreleri benign prostat epitelinden daha fazla PSA üretmemesine rağmen, malign hücreler tarafından üretilen PSA'ların proteolitik aktiviteden kaçınabildiği gözlenmiştir. Bu nedenle prostat kanseri olmayan erkeklerle kıyaslandığında prostat kanserli erkeklerde serumda daha fazla PSA-ACT kompleksi ve daha düşük %fPSA bulunmaktadır. Yüzde serbest PSA'nın kullanıma girmesi prostat kanserinin saptanmasında özgüllüğün artmasına katkıda bulunmuştur. Yüzde serbest PSA oranı, prostat kanseri ile karşılaştırıldığında BPH'lı hastalarda daha yüksektir. Bu farklılık prostatın periferal bölgesi ile kıyaslandığında transizyonel bölgeden salınan PSA izoformlarının farklılığına bağlı olabileceği düşünülmektedir (46). Yüzde fPSA, 10 ng/mL altındaki PSA değerlerinde daha kullanışlıdır. Çünkü 10-20 ng/mL üzerindeki değerlerde PSA'nın özgüllüğü %80'nin üzerindedir. Günümüzde benign DRM ve 4-10 ng/mL arasında gri zon içindeki minimal PSA yüksekliği olduğu durumlarda PSA ile beraber %fPSA'nın kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. PSA düzeyleri 4 ng/mL'nin altında olduğu durumlarda en son veriler hastanın biyopsiye gidip gitmeyeceğine karar vermede %fPSA'nın faydalı olduğunu ortaya koymuştur. Christensson ve arkadaşlarının (47) 1993'te yapmış oldukları çalışmada prostat kanseri olan ve olmayan erkeklerde serbest ve total PSA ölçmüş ve 0.18 oranında bir serbest/total PSA (%18 fPSA/totalPSA) kesim değeri, total PSA ile kıyaslandığında, kanserli olan ve olmayan hastaları ayırt etmede anlamlı bir artış sağladığı tespit edilmiştir. Catalona ve arkadaşlarının (48) 1995'te yaptıkları çalışmada %fPSA'nın kanser varlığı ve yokluğuna dair yaş, total PSA, DRM ve prostat büyüklüğü gibi

klinik parametreler üzerinde bağımsız prediktif bilgi sağladığını bulmuşlardır. Total PSA 4-10 ng/mL arasında olduğu duyarlılığın %70-90 arasında iken, %fPSA kesme değeri %14-28 arasında tutulduğunda, %20-65 oranda gereksiz biyopsilerin önlenebileceği ortaya konmuştur (16).

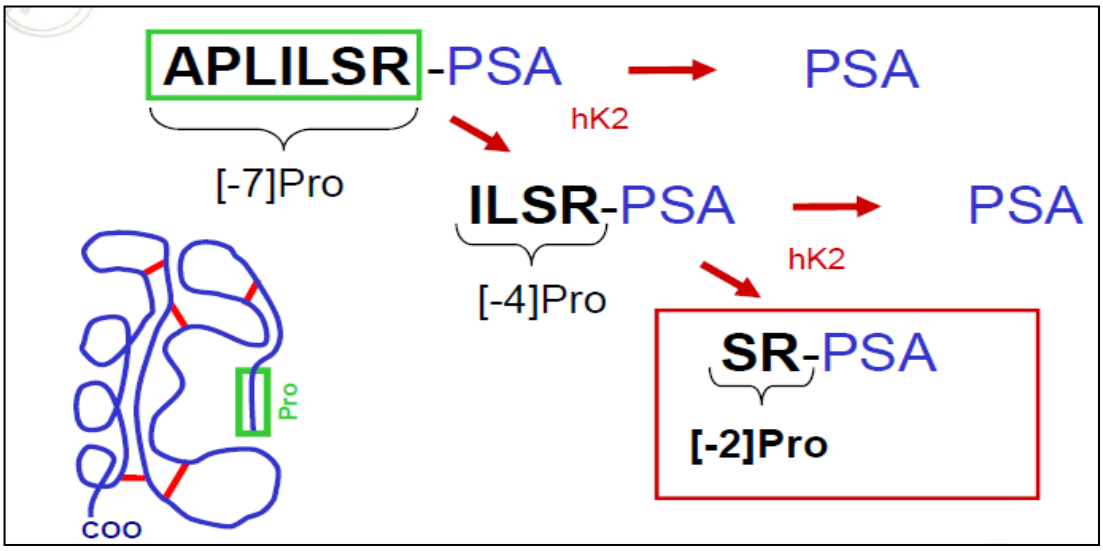
proPSA

Serbest PSA'nın şimdi en az üç ayrı inaktif formda bulunduğu bilinmektedir. Bu formlardan biri proenzim ya da PSA'nın öncül formlarından biri (proPSA) olarak tanımlanmış ve kanserle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (49,50). PSA'nın ikinci bir formu ise BPSA olarak tanımlanan ve BPH ile ilişkili olan PSA'nın kesik bir formudur (51). Üçüncü form ise intact PSA'yı oluşturarak aktif PSA'ya benzeyen ancak yapısal ve konformasyonel değişikliklerle enzimatik olarak inaktifleştirilen formdur (Şekil 10).



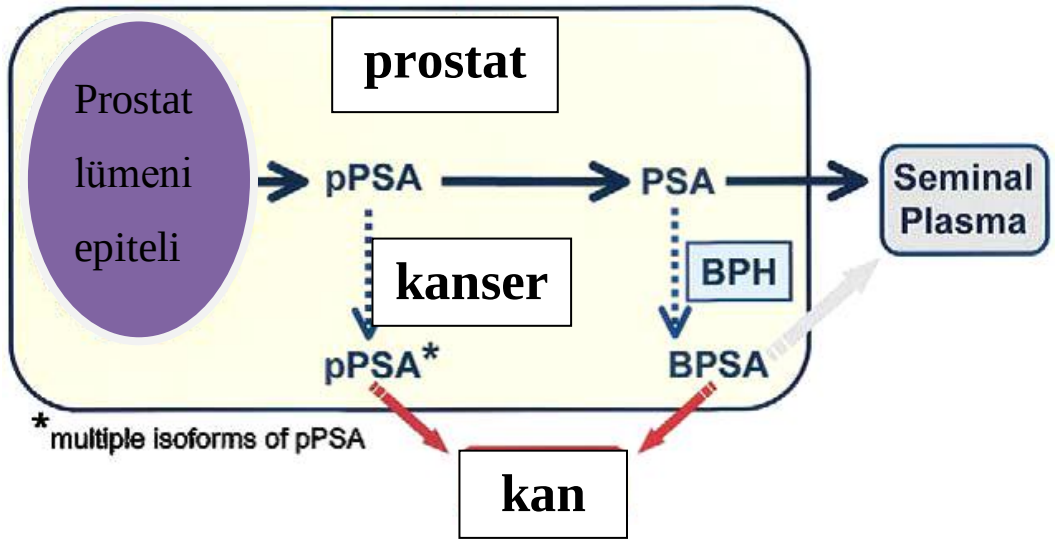
Şekil 10. Aktif PSA ve serbest PSA'nın inaktif formları.

Son yapılan çalışmalarda prostat kanserli hastaların kanlarında proPSA (pPSA) gibi PSA öncüllerinin varlığı tespit edilmiştir (49,50,52-54). Normalde prostat epitelinden lümene 7 aminoasitlik bir öncü peptit zinciri (APLILSR) içeren bir inaktif proenzim olan proPSA ([-7]pPSA) salınmaktadır (53,55). Aktif ve olgun PSA'yı oluşturmak için hücre dışında öncü lider peptit kesilerek uzaklaştırılmaktadır (Şekil 11). ProPSA'nın PSA'ya dönüşümü çok etkilidir. Öyle ki seminal plazmada hiç proPSA tespit edilememektedir. Normalde proPSA'nın öncü lider peptitleri içinde var olan 7 aminoasitten herhangi bir kısmı kopartıldığında "*kesik proPSA*" olarak tanımlanmaktadır. Öncü lider aminoasitlerden herhangi birini içeren tüm kesik pPSA formları, enzimatik olarak inaktif kalmaktadırlar. Kütle spektrometri ile yapılan analizde tespit edilen ana pPSA formları şunlardır: intakt olan ve tüm 7 aminoasit lider peptidini içeren [-7]pPSA ile kesik olan [-5]pPSA, [-4]pPSA ve [-2]pPSA (56). Bu formlar, oluştuktan sonra olgun PSA formuna dönüp aktifleşmeye dirençli hale gelirler (57).



Şekil 11. ProPSA

Normalde PSA lüminal epitelyal hücrelerden en uzun [-7]pPSA formunda salınmakta ve hücrenin dışında aktifleşmektedir. Sağlıklı genç erkeklerde, PSA neredeyse tamamıyla sadece seminal plazmada bulunmaktadır. Kanser durumunda, [-7]pPSA ve diğer kesik pPSA formları çoğalmaya başlar ve daha fazla kan dolaşımına geçer (Şekil 12). Seminal plazmada pPSA tespit edilemez. BPH varlığında ise PSA prostatın transizyonel bölge dokusunda internal olarak BPSA'ya kırpılır. Bu nedenle seminal plazmada belirli düzeyde BPSA bulunmasının yanında kan dolaşımına da geçtiği için serumda da tespit edilebilir (57).

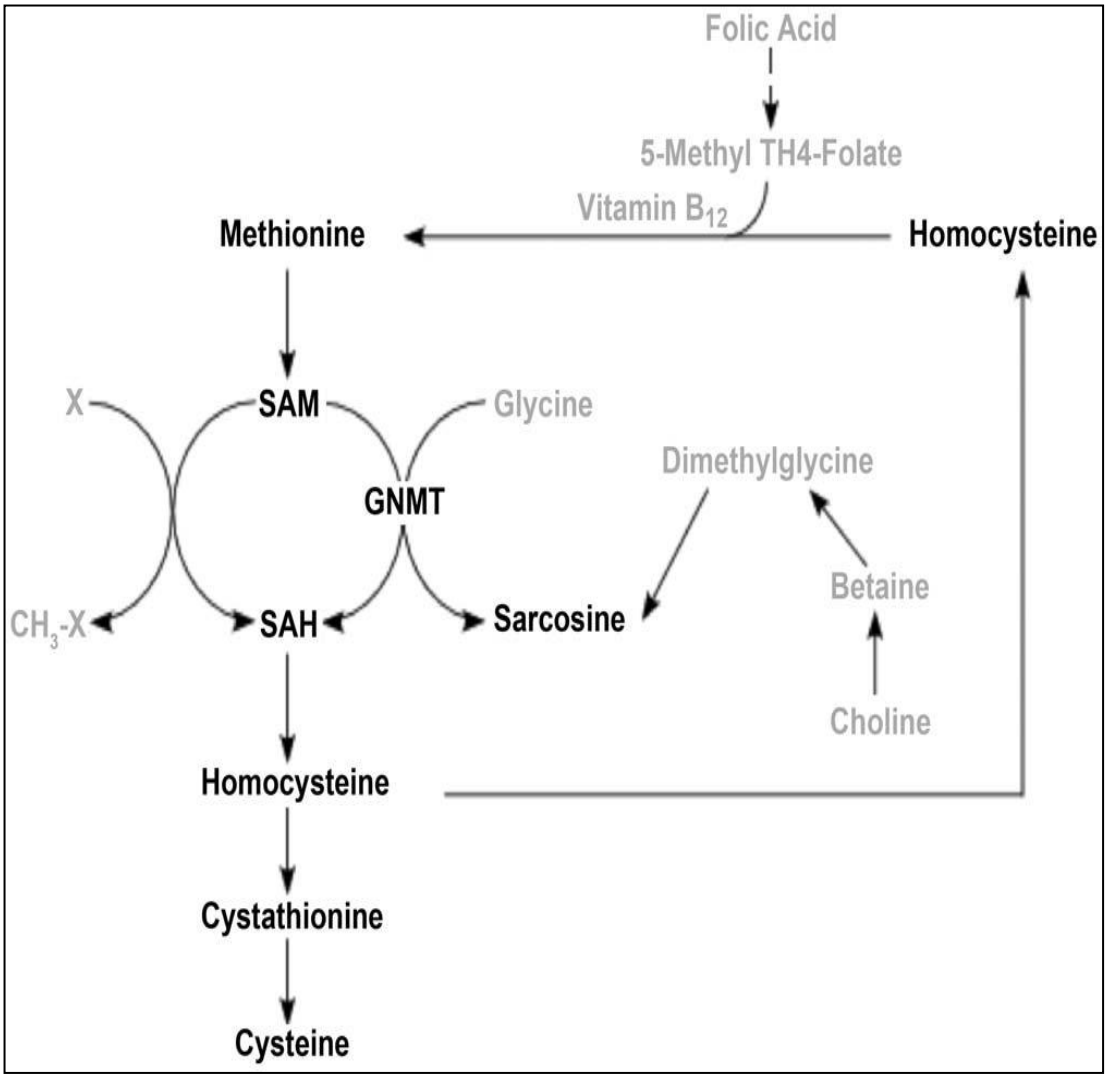


Şekil 12. Farklı PSA izoformlarının oluşumu ve dağılımı.

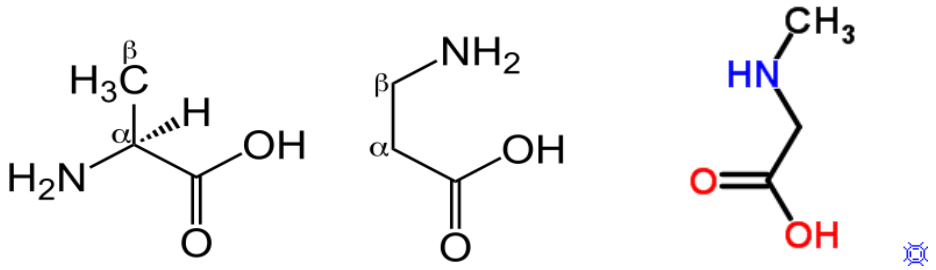
Sarkozin

Kütle spektrometri (MS) alanında ortaya çıkan son gelişmeler çok küçük miktardaki numune ile birçok metabolitin analizine imkân tanımıştır. Bu analizler, hastalıkların metabolik altyapısını inceleyen "metabolomics" olarak adlandırılan alanı ortaya çıkarmış ve birçok alanda olduğu gibi prostat kanserinin tanısında da kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda prostat kanserinin tanı ve tedavi takibinde kullanılabilecek biyobelirteç arayışı bu gelişmelere paralel olarak ivme kazanmıştır. Bunlar arasında bir metiyonin metaboliti olan sarkozin önemli bir yer tutmaktadır.

N-metilglisin olarak da bilinen sarkozin molekülü, kaslarda ve diğer dokularda da bulunabilen doğal bir aminoasittir. Sarkozinin karaciğerdeki primer kaynağı glisin N-metiltransferaz enzimidir (58) (Şekil 13). Bir metiyonin metaboliti olan sarkozinin molekül ağırlığı alanin ile aynı olduğu için kütle spektrometri ile analiz edilirken birbirinden ayırt edilmeleri gerekmektedir (Şekil 14).



Şekil 13. Metiyonin-sarkozin metabolizması



Şekil 14. Alfa-alanin, beta-alanin ve sarkozin moleküler yapıları

Sarkozinin bir biyobelirteç olarak prostat kanserinde kullanılabileceği tezinin ortaya atılması bilim dünyasında heyecana neden olmuştur (59). Ancak yapılan üç ana çalışmanın ikisinde idrar sarkozin düzeylerinin tayininde gaz kromatografisi-mass spektrometri (GC-MS) kullanılmıştır (2,4). Tekli kuadripol seçici iyon tarama (selected ion monitoring-SIM) kullanan GC-MS sistemleri, insan serum ve idrarları gibi kompleks biyolojik örneklerin analizinde sıklıkla düşük özgüllüğe sahiptir. Bu eksiklik genellikle örnek hazırlamada yoğun çaba harcanarak aşılmaya çalışılır (60). Örneğin Jentzmik ve arkadaşları (4) solid faz ekstraksiyonunu takiben türevlendirme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve çözücü değişimi gerektiren bir GC-MS yöntemi kullanmıştır. Bunun aksine üçlü kuadripol seçici reaksiyon tarama (selected reaction monitoring-SRM) kullanan LC-MS, kompleks biyolojik örneklerde aynı duyarlılıkta ancak daha yüksek özgüllükle hedef analitleri analiz edebilmekte ve bununla beraber daha kolay örnek hazırlamayı ve daha kısa sürede analizi tamamlamayı sağlamaktadır (61). Dolayısıyla sarkozin ve alaninin moleküler ağırlıkları birbirleriyle aynı olduğu için (89,0932 Da) kromatografik olarak birbirinden ayırmadan analiz yapmak çok zordur (62). Dolayısıyla bu ayrımı yapmadan elde edilen verilerle sarkozinle ilgili bir çıkarımda bulunmak mümkün değildir.

Teknolojik alandaki gelişmelere paralel olarak bu alandaki çalışmalarda da değişim ve prostat kanserinin tanısında ya da prognozunda kullanılabilecek bazı yeni belirteçler ortaya konmuştur. Alfa-metilaçil koenzim A rasemaz (AMACR), glutatyon S-transferaz PI (GSTPI), kromogranin A (CGA), prostat-özgül membran antijen (PSMA), prostat kök hücre antijeni (PSCA), erken prostat kanser antijeni

(EPCA), B7-H3, kaveolin-1, PCA3/DD3, TMPRSS2-ERG, GOLPH2, vb. bunların belli başlı örnekleridir. Tüm bunlar arasında mevcut biyobelirteçlerin yerini alabileceği ispatlanmış bir biyobelirteç henüz yoktur.

Biz de prostat kanseri tanısında biyobelirteç olarak kullanılan PSA ve %fPSA'nın yanında proPSA, phi ile beraber idrar sarkozin düzeylerinin prostat kanseri tanısındaki performanslarını karşılaştırmayı amaçladık.

3 GEREÇ ve YÖNTEM:

Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin (BAPKO) destek sağladığı bu çalışma 09.2012.0151 nolu etik kurul izniyle yapıldı. Buna göre Ekim 2012 ile Haziran 2013 tarihleri arasında T.C. Sağlık Bakanlığı Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran ve rutin muayene ve değerlendirmeden sonra prostat biyopsisi yapılmasına karar verilen 137 hasta çalışmaya alındı. Çalışmaya dahil edilen hastaların öyküsü, özgeçmişi, kullandığı ilaçlar, fizik muayene bulguları, vücut kitle indeksi (BMI), Gleason skorları, prostat volümleri ve DRM sonuçları belirlendi. Akut miyokard infarktüsü (AMI), kalp veya karaciğer yetmezliği öyküsü olan veya daha önce hormon ablasyon terapisi almış, prostata yönelik herhangi bir cerrahi müdahale geçirmiş ya da pelvik bölgeye herhangi bir nedenle radyasyon tedavisi almış olan hastalar ile idrar yapamadığı için kateter takılması gereken hastalar ve B12 vitamini <191pg/mL ve folat <2.2 ng/mL olan hastalar çalışma dışı bırakılarak 105 hasta ile çalışma gerçekleştirildi.

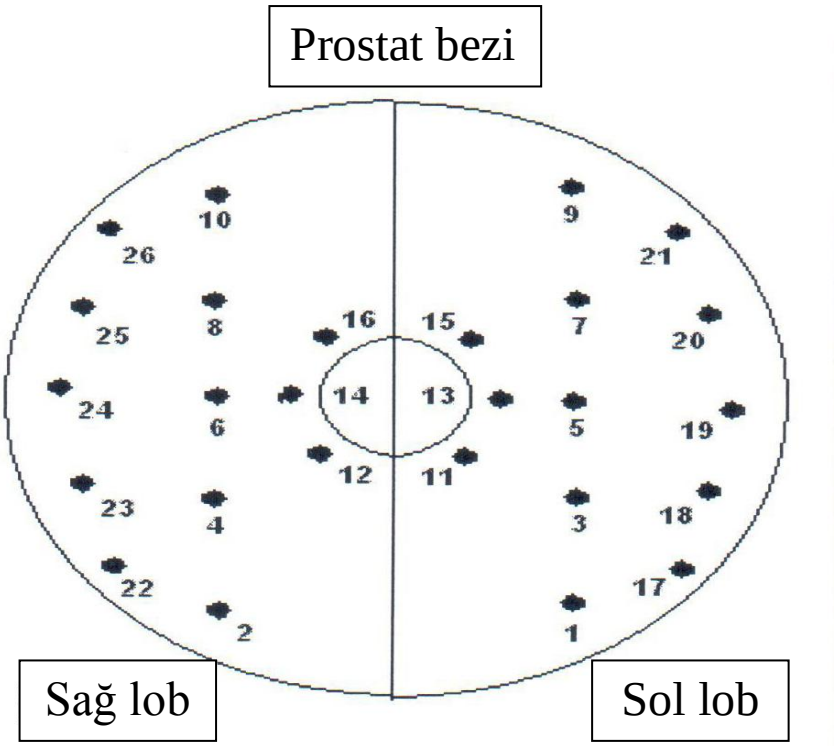
Aydınlatılmış onamları alınan hastalardan TRUS, DRM, prostat biyopsisi gibi yanlış pozitif sonuçlara neden olabilecek işlemlerden önce kan ve idrar örnekleri alındı (33). Hastalardan biyopsi ve DRM öncesi alınan kan örnekleri laboratuvara ulaştırıldıktan sonra en az 20 dakika pıhtılaşması için oda sıcaklığında dik bir şekilde bekletildi. Ardından 2000xg'de 10 dakika satrifüj edilerek elde edilerek elde edilen serumları ayrıldı ve alikotlanarak -80°C'de saklandı. İdrar örnekleri ise, alındıktan sonra 1500xg'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatan kısmı alınarak -80°C'de analiz yapılıncaya kadar saklandı.

Çalışmaya dâhil edilen kişilerde idrar sarkozin, metiyonin, sistein, alanin (alfaalanin), betaalanin, homosistein düzeyleri ile serum PSA, % fPSA, p2PSA, phi düzeyleri ve prostat volümü, vücut kitle indeksleri ölçüldü. Biyopsi sonucuna göre oluşturulan gruplardaki bu biyobelirteçlerin düzeylerinde anlamlı bir fark olup olmadığına bakıldı. Bu parametrelerin özgüllük ve duyarlılıkları hesaplanıp ROC eğrileri çizildi ve eğri altında kalan alanlar (AUC) kullanılarak BMI, yaş ve Gleason

skorlarına göre biyobelirteçlerin prostat kanseri tanısındaki performansları değerlendirildi.

3.1 Biyopsi

İşlem sırasında standart (sağ ve sol periferal zondan beşer adet, sağ ve sol transizyonel zondan üçer adet) odaklara ek olarak, sağ ve sol periferal zondan longitudinal prostat ölçümlerine göre her 10 mm'lik uzunluk için ek biyopsiler uzak-lateral bölgeden alındı (Şekil 15).



Şekil 15. Satürasyon biyopsisi

3.2 PSA

Örneklerde hemoliz varlığı kontrol edilerek hemolizli örnekler çalışmaya alınmadı. Serum PSA düzeyleri, Access Hybritech PSA analiz kiti kullanılarak paramanyetik partikül kemilüminesan immunoassay yöntemi ile Access Immunoassay Systems otoanalizöründe (Beckman Coulter, Ireland) çalışıldı: Access Hybritech PSA analizi iki taraflı immünenzimatik ("sandviç") bir analizdir. Reaksiyon kuyucuğuna örnek serumu, fare monoklonal anti-PSA alkalen fosfataz konjugatı ile fare monoklonal anti-PSA antikoruyla kaplı paramanyetik partiküller eklenir. Örnekteki PSA, immobilize monoklonal anti-PSA'ya bağlanır ve monoklonal anti-PSA alkalen fosfataz konjugatı örnek PSA'sının farklı bir bölgesiyle etkileşir. İnkübasyondan sonra bu kuyucuk manyetik bir alana maruz bırakılarak bağlı olmayan kısımlar uzaklaştırılır. Ardından bir kemilüminesan substrat olan Lumi-Phos 530 eklenerek oluşan ışık lüminometri ile ölçülür.

Kit üreticisi tarafından PSA için ölçüm aralığının 0.008–150 ng/mL olduğu belirtilmiş idi. Daha yüksek çıkan örnekler, önerilen şekilde Access Hybritech PSA Sample Diluent ile 1:10 oranında dilüe edildi. Çalışma içi değişkenlik katsayısı (%CV); ortalama PSA düzeyi 0.98 ng/mL, 5.04 ng/mL ve 37.67 ng/mL olduğunda sırasıyla 4.53 ile 4.10 ve 3.89 olarak belirtilmiştir. Access Hybritech PSA analiz kitinde 50,000 ng/mL düzeyine kadar herhangi bir "*hook*" etkisi gösterilmemiştir.

3.3 fPSA

Serum fPSA düzeyleri, Access Hybritech fPSA analiz kiti kullanılarak paramanyetik partikül kemilüminesan immunoassay yöntemi ile Access Immunoassay Systems otoanalizöründe (Beckman Coulter, Ireland) çalışıldı: Access Hybritech fPSA analizi iki taraflı immünenzimatik ("sandviç") bir analizdir. Reaksiyon kuyucuğuna örnek serumu, fare monoklonal anti-fPSA alkalen fosfataz kojugatı ile fare monoklonal anti-fPSA antikoruyla kaplı paramanyetik partiküller eklenir. Örnekteki fPSA, immobilize monoklonal anti-fPSA'ya bağlanır ve monoklonal anti-fPSA alkalen

fosfataz konjugatı örnek fPSA'sının farklı bir bölgesiyle etkileşir. İnkübasyondan sonra bu kuyucuk manyetik bir alana maruz bırakılarak bağlı olmayan kısımlar uzaklaştırılır. Ardından bir kemilüminesan substrat olan Lumi-Phos 530 eklenerek oluşan ışık lüminometri ile ölçülür.

Yanlış pozitif sonuçlara neden olmaması için örnekler TRUS, DRM ve prostat biyopsisinden önce alındı. Ölçüm aralığı 0.005–20 ng/mL arasında idi. Ortalama fPSA düzeyi 0.29 ile 7.72 ng/mL arasında olduğu değerlerde çalışma içi %CV ortalama 1.81 ve çalışmalar arası %CV ortalama 2.04 olarak belirtilmiştir. Access Hybritech fPSA analiz kitinde 20,000 ng/mL düzeyine kadar herhangi bir "*hook*" etkisi olmadığı belirtilmiştir.

3.4 proPSA

ProPSA analizleri paramanyetik partikül kemilüminesan immunoassay yöntemi kullanan Access Hybritech p2PSA kiti ile Access Immunoassay Systems otoanalizöründe (Beckman Coulter, Ireland) yapıldı. Access Hybritech p2PSA analizi iki taraflı immünenzimatik "sandviç" bir analizdir. Reaksiyon kuyucuğuna örnek serumu, fare monoklonal anti-PSA alkalen fosfataz kojugatı, fare monoklonal anti-[-2]proPSA antikoruyla kaplı paramanyetik partiküller ile bloklayıcı solüsyon eklenir. Örnekteki [-2]proPSA, immobilize monoklonal anti [-2]proPSA'ya bağlanır ve monoklonal anti-PSA alkalen fosfataz konjugatı örnek [-2]proPSA'sının farklı bir bölgesiyle etkileşir. İnkübasyondan sonra bu kuyucuk manyetik bir alana maruz bırakılarak bağlı olmayan kısımlar uzaklaştırılır. Ardından bir kemilüminesan substrat olan Lumi-Phos 530 eklenerek oluşan ışık lüminometri ile ölçülür. Ölçüm aralığı 0.50 ile 5000 pg/mL aralığında idi. Kit üreticisi tarafından yapılan tekrarlanabilirlik çalışmasında çalışma içi değişkenlik katsayısı; ortalama serum proPSA düzeyi 8.63 pg/mL olduğunda %4.90 olarak 22.75 pg/mL olduğunda %3.08 olarak, 38.46 pg/mL olduğunda %3.65 olarak, 106.64 pg/mL olduğunda %3.83 olarak, 108.21 pg/mL olduğunda %2.84 olarak, 1179.71 pg/mL olduğunda %3.1 ve 2899.48 pg/mL olduğunda %2.21 olarak belirtilmiştir. Access Hybritech p2PSA

analiz kitinde 15,000 pg/mL düzeyine kadar herhangi bir "*hook*" etkisi gösterilmediği belirtilmiştir. ProPSA sonuçları, PSA ve fPSA sonuçları kullanılarak (p2PSA/fPSA)x√PSA formülü ile *phi* indeksi hesaplandı.

3.5 B12 Vitamini

Serum vitamin B12 düzeyleri, elektrokemilüminesan immünassay (ECLIA) yöntemi ile Modular Analytics E170 otoanalizöründe (Roche Diagnostics GmbH, Germany) çalışıldı. Kit üreticisi tarafından yapılan tekrarlanabilirlik çalışmasında çalışma içi değişkenlik katsayısı; ortalama vitamin B12 düzeyi 267 pg/mL olduğunda 1.2 olarak, ortalama vitamin B12 düzeyi 308 pg/mL olduğunda 1.7 olarak bildirilmiştir. Kitin ölçüm aralığı 30 ile 2000 pg/mL aralığında olduğu kit üreticisi tarafından belirtilmiştir.

3.6 Folat

Serum folat düzeyleri, Folate III analiz kiti ile elektrokemilüminesan immünassay (ECLIA) yöntemi ile Modular Analytics E170 otoanalizöründe (Roche Diagnostics GmbH, Germany) çalışıldı. Kit üreticisi tarafından yapılan tekrarlanabilirlik çalışmasında çalışma içi değişkenlik katsayısı; ortalama serum folat düzeyi 8.43 ng/mL olduğunda %3 olarak, ortalama serum folat düzeyi 8.66 ng/mL olduğunda %4 olarak belirtilmiştir. Ölçüm aralığı 0.640-20 ng/mL olarak belirtilmiştir.

3.7 Kreatinin

İdrar kreatinin ölçümleri enzimatik olarak Cobas CREP2 analiz kiti ile Cobas 8000 Systems otoanalizöründe (Roche Diagnostics GmbH, Germany) yapıldı. Bu

enzimatik yöntem kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz yardımıyla kreatininin glisin, formaldehit ve hidrojen perokside dönüşümüne dayanmaktadır. Peroksidaz ile katalize edilen serbest hidrojen peroksit, 4-aminofenazon ve HTIB* ile reaksiyona girerek bir kinon imin kromojen oluşturur. Oluşan kinon imin kromojenin renk yoğunluğu, reaksiyon karışımında kreatinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır:

$$\text{kreatinin} + H_2O \rightarrow \text{kreatin}$$

$$\text{kreatin} + H_2O \rightarrow \text{sarkozin} + \text{üre}$$

$$\text{sarkozin} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{glisin} + HCHO + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-aminofenazon} + \text{HTIB}^* \rightarrow \text{kinon imin kromojen} + H_2O + HI$$

*: 2,4,6-triiyodo-3-hidroksibenzoik asit

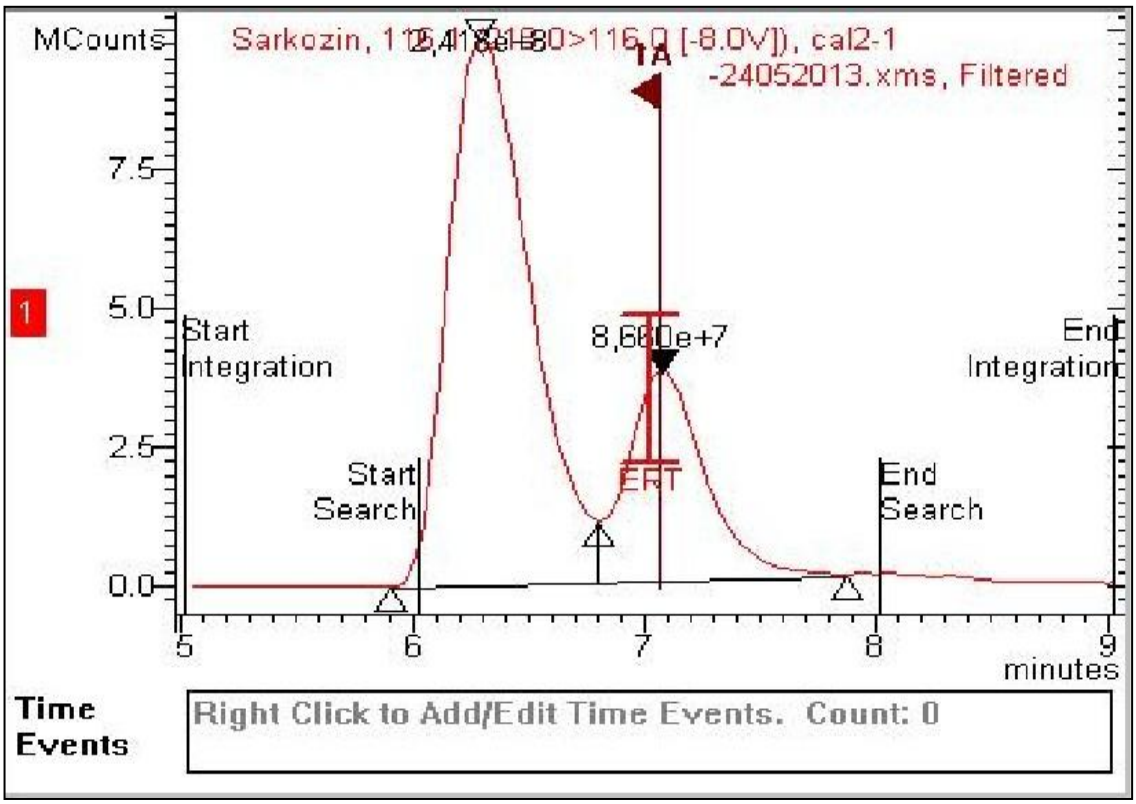
Testin idrar için ölçüm aralığı 100-54000 µmol/L arasında idi. Alt ölçüm sınırı 100 µmol/L idi. Üst sınırın üzerindeki sonuçlar 1:2.5 oranında dilüsyonla çalışılarak sonuç üretildi. Kit üreticisi tarafından tekrarlanabilirlik çalışmalarında çalışma içi %CV'ler; ortalama idrar kreatinin değerleri 7280 µmol/L, 14031 µmol/L, 17289 µmol/L için %1.4'ten küçük olarak tespit edilmiştir.

3.8 Sarkozin

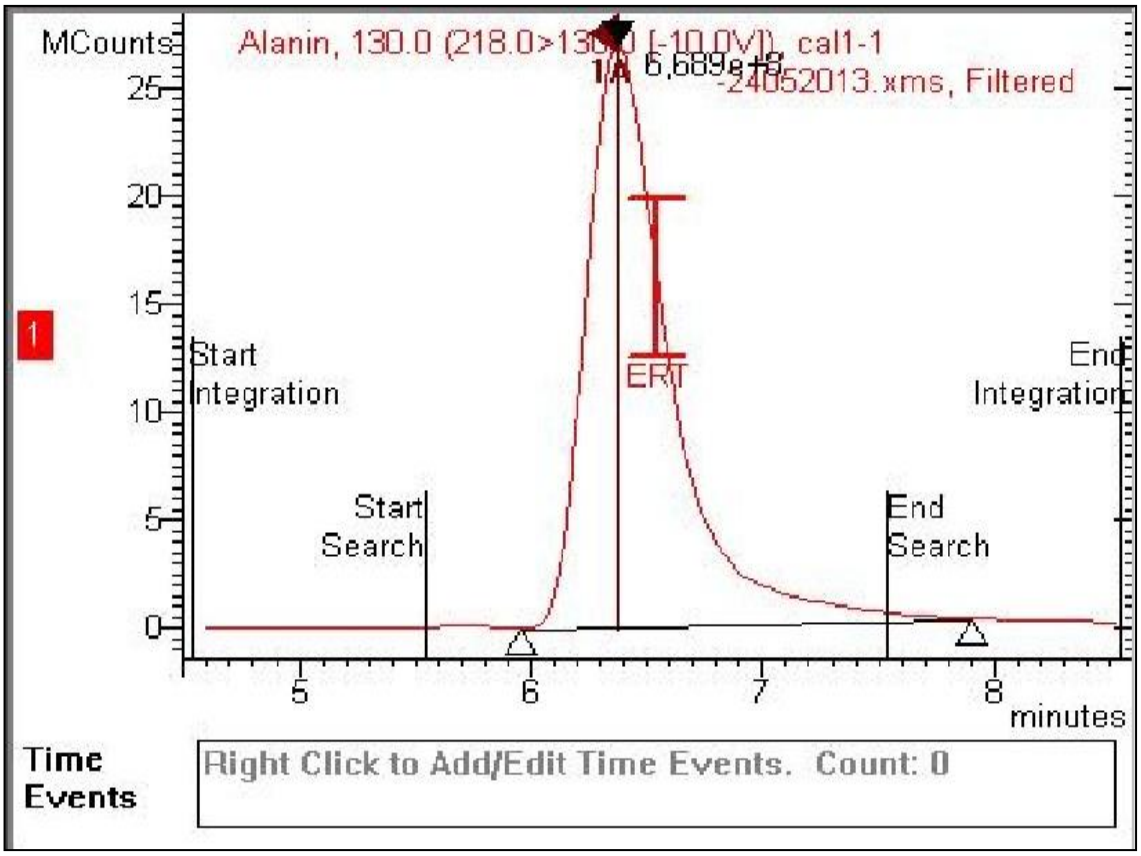
MS sistemleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analiz etme esasına dayanır (63,64). Moleküller normalde yüklü değillerdir. Kütle spektrometri, molekülleri iyonize ederek yüklü moleküller haline getirir. Yüklü moleküller stabil olmadıkları için de diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman

parçalanır ve yüklerini kaybederler. Ortaya çıkan her bir iyon özgün bir moleküler kütle / yük oranına sahiptir. Her bir iyonun yoğunluğu dedektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanır (63-65).

Propil kloroformat ile türevlendirilmesi yapılan örnekler, ESI (elektrosprey iyonizasyon) ile iyonizasyon yapan *LC-MS/MS* yöntemiyle çalışan Tandem Gold otoanalizöründe (Zivak Teknolojileri, Türkiye) uygun ticari kit kullanılarak analiz edildi. Tüm hasta, kalibrasyon ve kontrol sonuç grafikleri incelenip gerekli düzeltmeler yapıldıktan sonra sonuçlar kaydedildi (Şekil 16). Bu analizde sarkozinle benzer molekül ağırlığına sahip olan alanin izomerleri ayrıştırıldı (Şekil 17). Bu ayrıştırma sayesinde gerçek sarkozin düzeyleri elde edilerek daha doğru bir değerlendirme yapılmasına olanak sağlandı. İdrar sarkozin düzeyleri idrar kreatinini ile oranlanıp standardize edilerek karşılaştırılabilir hale getirildi.



Şekil 16. Sarkozin kalibrasyon grafiği



Şekil 17. Alanin kalibrasyon grafiği

3.9 İstatistiksel Analiz

Bağımsız gruplarda sürekli değişkenlerin ikili karşılaştırılmalarında, dağılımların normalliği halinde ortalamalar Student's t-test ile normallik varsayımının sağlanamadığı durumlarda ise ortancalar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Değişkenlerin kategorik olduğu hallerde çapraz tablolar yapılarak oranlar Ki-kare ile karşılaştırıldı. Tanısal yöntemin doğruluk derecesinin belirlenmesinde duyarlılık, özgüllük değerleri hesaplandı. Tanısal testler altın standart yöntem ile karşılaştırılarak ROC eğrileri çizildi ve uygun kesme değerleri belirlenmeye çalışıldı. Çalışmamızda istatistiksel anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ düzeyi kabul edildi. Verilerin istatistiksel analizinde SPSS ve MedCalc programları kullanıldı.

4 BULGULAR:

Çalışmaya dahil ettiğimiz 105 hastanın 29'u biyopsi pozitif (prostat kanseri) ve 76'sı biyopsi negatif grubu oluşturuyordu. Biyopsi negatif hastaların yaş ortalaması 61.5 ± 5.8 yaş ve biyopsi pozitif hastaların yaş ortalaması 64.2 ± 8.1 yaş olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p= 0.064).

Sigara ve alkol kullanımı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (sırasıyla, p= 0.757 ve 0.642).

Tablo 2. Hastalarda ölçülen ve normal dağılım gösteren parametreler

	Biyopsi negatif		**Biyopsi pozitif**		**p değeri**
	Ortalama	**Standart sapma**	**Ortalama**	**Standart sapma**	
Yaş	61.5	5.8	64.2	8.2	0.064
BMI	26.8	3.2	26.7	3.4	0.907
B12Vitamini	347	220	343	159	0.922
Folat	9.5	3.5	8.4	2.5	0.114
Metiyonin	0.97	0.36	1.07	0.4	0.220
Alanin	29.01	14.45	30.61	11.27	0.590
%fPSA	20.53	8.64	14.43	7.75	*0.001*
ProstatVolümü	52.3	26.9	39.5	23	*0.037*

Serum PSA değerleri [ortanca (%25-75)], biyopsi negatif hastalarda 5.21 (3.09-8.72) ng/mL ve biyopsi pozitif hastalarda 6.83 (4.40-11.82) ng/mL olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p= 0.053).

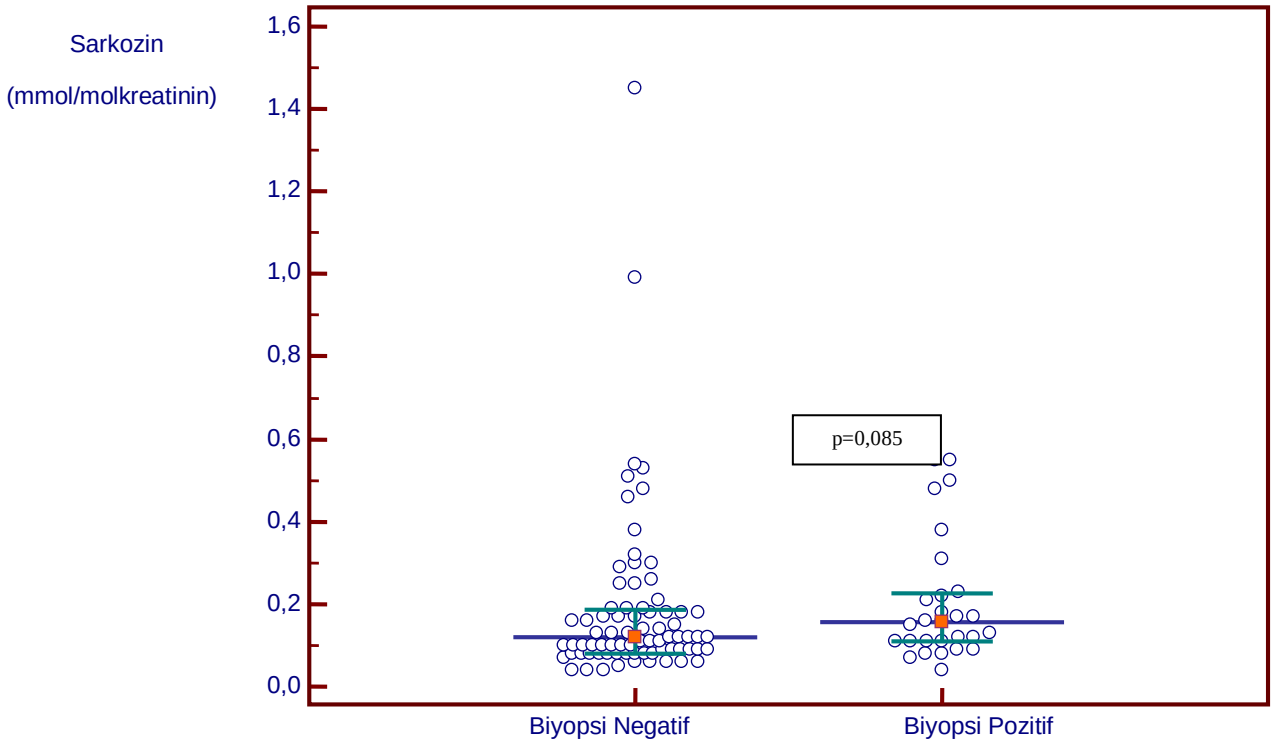
BMI açısından gruplar karşılaştırıldığında biyopsi negatif hastalarda ortalama 26.8 ± 3.2 ve biyopsi pozitiflerde bu oran ortalama 29 ± 3.4 olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p= 0.907).

Serum fPSA değerleri [ortanca (%25-75)] biyopsi negatif hastalarda 0.90 (0.58-1.54) ng/mL ve biyopsi pozitif hastalarda 0.88 (0.59 – 1.62) ng/mL olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p = 0.943). Serum %fPSA ortalama değeri biyopsi negatif hastalarda 20.53 ± 8.64 ve biyopsi pozitif hastalarda 14.43 ± 7.75 olup biyopsi pozitif grupta anlamlı olarak daha düşüktü (p=0.001).

Serum p2PSA değerleri [ortanca (%25-75)] biyopsi negatif hastalarda 16.33 (10.2-24) pg/mL ve biyopsi pozitif hastalarda 18.31 (12.3-33.4) pg/mL olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p= 0.169). Serum *phi* değerleri [ortanca (%25-75)] biyopsi negatif hastalarda 42.5 (25.8-70) ve biyopsi pozitif hastalarda 81.9 (39.2-147) olup biyopsi pozitif grupta anlamlı olarak daha yüksekti (p= 0.002).

Biyopsi pozitif hastalarda prostat volümü 39.5 ± 23 mL, biyopsi negatif hastaların volümlerinden (52.3 ± 26.9 mL) anlamlı olarak daha düşüktü (p= 0.037).

Hastaların idrar sarkozin düzeyleri [ortanca (%25-75)] biyopsi negatif hastalarda 0.12 (0.08 – 0.19) mmol/mol kreatinin, biyopsi pozitif hastalarda ise 0.16 (0.11 – 0.25) mmol/mol kreatinin olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p = 0.085) (Şekil 18).



Şekil 18. Biyopsi pozitif ve negatif hastalardaki idrar sarkozin dağılımları

Serum B12 vitamini düzeyi, biyopsi negatif hastalarda ortalama 347 ± 220 pg/mL arasında ve biyopsi pozitif hastalarda ortalama 343 ± 160 pg/mL olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p = 0.922). Serum folat düzeyi ortalamaları biyopsi negatif ve biyopsi pozitif hastalarda sırasıyla 9.5 ± 3.5 ng/mL; 8.4 ± 2.5 ng/mL olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p= 0.114).

İdrar betaalanin düzeyleri biyopsi negatif ve pozitif hastalarda [ortanca (%25-75)] sırasıyla 0.56 (0.31 – 0.84) ve 0.60 (0.40 – 0.71) mmol/mol kreatinin idi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p = 0.571). İdrar alanin düzeyi biyopsi negatif hastalarda ortalama 29.01 ± 14.45 mmol/mol kreatinin arasında ve biyopsi pozitif hastalarda ortalama 30.61 ± 11.2 mmol/mol kreatinin olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p = 0.593).

İdrar sistein düzeyleri [ortanca (%25-75)] biyopsi negatif hastalarda 0.16 (0.13 – 0.22) mmol/mol kreatinin ve biyopsi pozitif hastalarda 0.18 (0.14 – 0.24) mmol/mol kreatinin olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p = 0.197).

İdrar metiyonin düzeyi biyopsi negatif hastalarda ortalama 0.97 ± 0.36 mmol/mol kreatinin ve biyopsi pozitif hastalarda ortalama 1.07 ± 0.40 mmol/mol kreatinin olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p = 0.222).

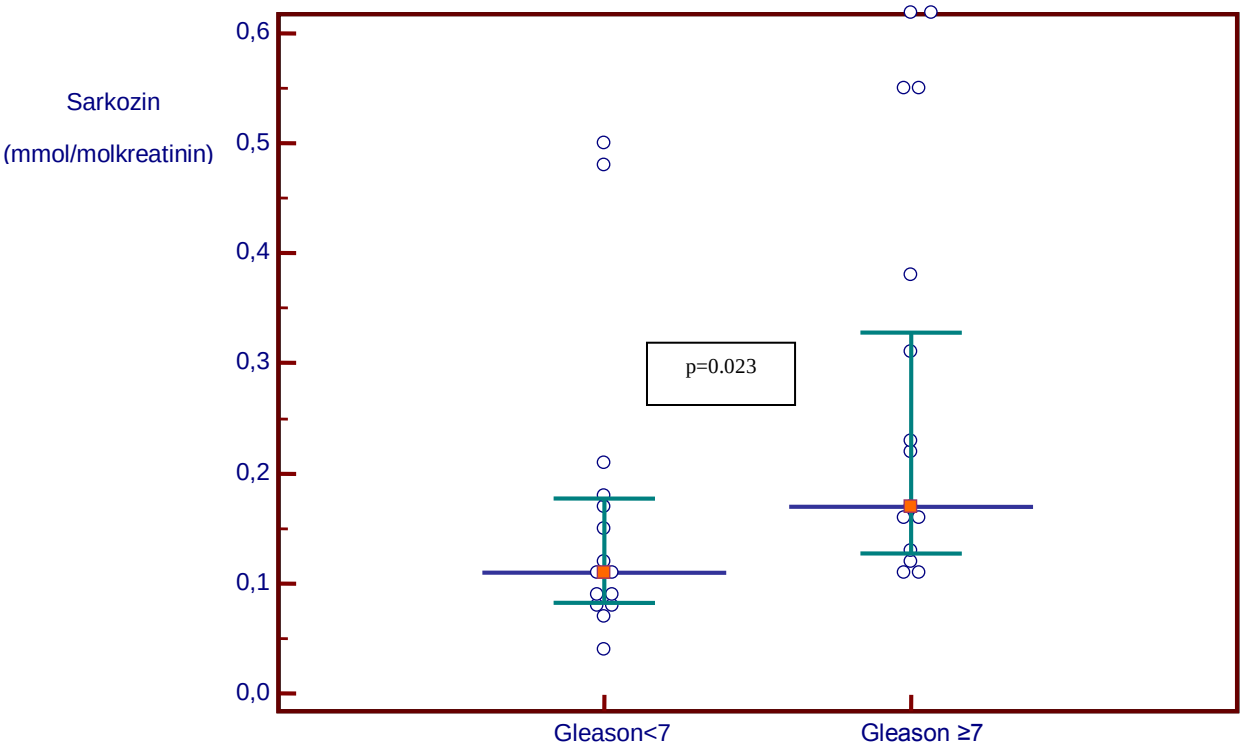
İdrar homosistein değerleri [ortanca (%25-75)] biyopsi negatif hastalarda 0,07 (0.06 – 0.10) mmol/mol kreatinin ve biyopsi pozitif hastalarda 0.07 (0.06 – 0.11) mmol/mol kreatinin olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p = 0.963).

Tablo 3. Hastalarda ölçülen ve normal dağılım göstermeyen parametreler

	Biyopsi negatif		**Biyopsi pozitif**		**p değeri**
	Ortanca	**25-75 Yüzdelik**	**Ortanca**	**25-75 Yüzdelik**	
Sarkozin	0.12	0.08-0.19	0.16	0.11-0.25	0.085
Beta-Alanin	0.56	0.31-0.84	0.60	0.40-0.71	0.571
Sistein	0.16	0.13-0.22	0.18	0.14-0.24	0.197
Homosistein	0.07	0.06-0.10	0.07	0.06-0.11	0.963
fPSA	0.90	0.58-1.54	0.88	0.59-1.62	0.943
PSA	5.21	3.09-8.72	6.83	4.4-11.82	0.053
p2PSA	16.33	10.2- 24	18.31	12.3-33.4	0.169
phi	42.50	25.8 - 70	81.90	39.2-147	*0.002*

Dağılımları normal olan veriler ortalama ve standart sapma değerleri ile Tablo 2'de, normal dağılmayan veriler ortanca ve 25-75 yüzdelik dilimleri ile Tablo 3'te gösterilmiştir.

Biyopsi pozitif hastalar, Gleason skorlarına göre <7 (n=15) ve ≥ 7 (n=14) olarak iki gruba ayrıldı ve gruplar arasında PSA, %fPSA, p2PSA, phi ve sarkozin açısından aralarında fark olup olmadığına bakıldı. Phi (p=0.0890), p2PSA (p=0.315), prostat volümü (p= 0.321) ve %fPSA (p=0.060) açısından gruplar arasında bir fark yokken, sarkozin (p=0.023) ve PSA (p=0.050) Gleason skoru ≥7 olan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksekti (Şekil 19).

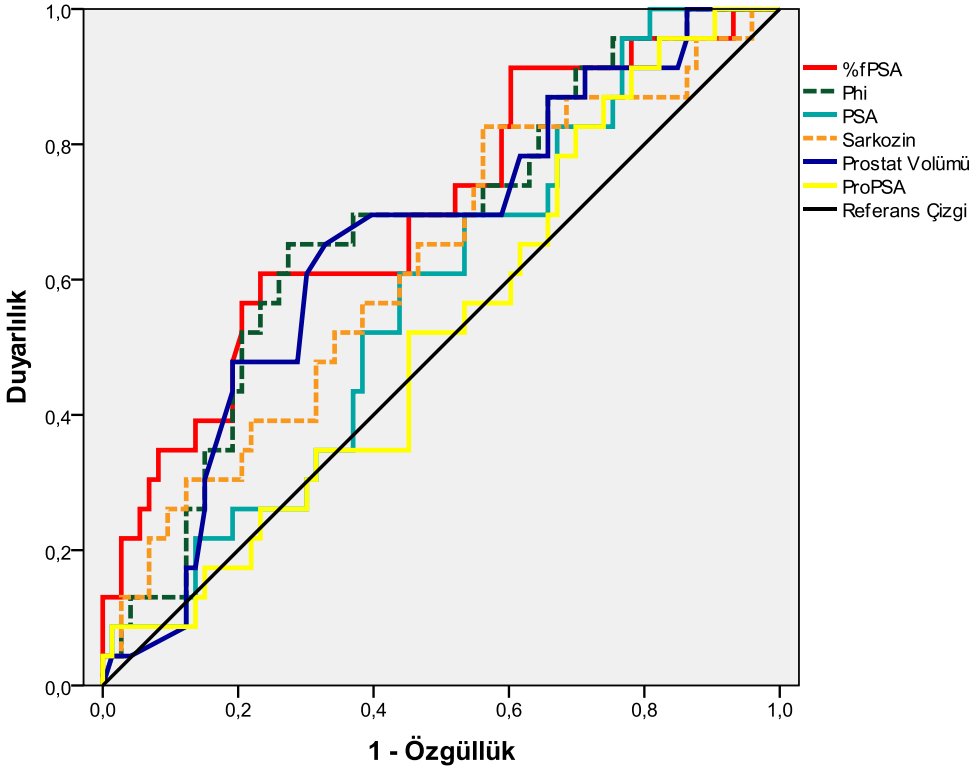


Şekil 19. Gleason skorlarına göre idrar sarkozini

4.1 ROC Eğrileri

Prostat biyopsisi altın standart kabul edilerek parametrelerin gerçek pozitif (GP) ve yanlış negatif (YN) değerleri ile gerçek negatif (GN) ve yanlış pozitif (YP) değerleri tespit edildi. Test edilen parametrenin her eşik değeri için GP/(GP+YN)x100 formülü ile duyarlılıkları (%) ve GN/(GN+YP)x100 formülü ile de özgüllükleri (%) tespit edildi. Sonra duyarlılığı y eksenine ve 100-özgüllüğü de x eksenine konarak ROC eğrileri elde edildi. Duyarlılık ve özgüllüğün en yüksek olduğu kesim noktaları belirlendi. Performanslarını karşılaştırmak için ROC eğrilerinin eğri altında kalan alanları kullanıldı. Elde edilen ROC eğrisinde eğri altında kalan alanları yüksek olan değerler sırasıyla %fPSA, phi, prostat volümü ve PSA idi (Şekil 20).

Yüzde fPSA'nın 13.6 değeri için duyarlılık %58.6 ve özgüllük %80.2 idi. ProPSA için kesim noktası 17.15 pg/mL alındığında duyarlılık %58.6 ve özgüllük %55.3 idi. Phi için kesim noktası 64.6 alındığında duyarlılık %65.5, özgüllük ise %73.7 idi. Prostat volümünün 36 mL değeri için duyarlılık %65.2 ve özgüllük %67.12 idi. PSA'da ise kesim noktası 5.75 ng/mL alındığında duyarlılık %65.5 ve özgüllük %57.9 olarak tespit edildi (Tablo 4).



Şekil 20. PSA, %fPSA, phi, sarkozin, proPSA ve prostat volümü ROC eğrisi

Tablo 4. PSA, %fPSA, phi, sarkozin, proPSA ve prostat volümü duyarlılık ve özgüllükleri

	Kesim değeri	**Duyarlılık (%)**	**Özgüllük (%)**	**Eğri Altında Kalan Alan**
Sarkozin	0.12	58.6	55.3	0.609
PSA	5.75	65.5	57.9	0.622
%fPSA	13.6	58.6	80.2	0.707
p2PSA	17.15	58.6	55.3	0.587
phi	64.6	65.5	73.7	0.696
Prostat Volümü	36	65.2	67.12	0.652

Özgüllüklerini daha iyi ortaya koyabilmek için parametrelerin %90 duyarlılıktaki özgüllükleri hesaplandı. Böylece hangi parametrenin gereksiz biyopsileri daha çok engelleyeceği ortaya kondu (Tablo 5).

Tablo 5. PSA, %fPSA, p2PSA, phi, sarkozin ve prostat volümü %90 duyarlılıktaki kesim değerleri ve özgüllükleri

	Duyarlılık %90 Olduğunda	
	Kesim değeri	**Özgüllük (%)**
PSA (ng/mL)	2.86	22.4
%fPSA	22.8	38.2
p2PSA (pg/mL)	8.4	18.4
Phi	25.4	23.7
Sarkozin (mmol/molkreatinin)	0.07	19.5
Prostat volümü (mL)	66	28.8

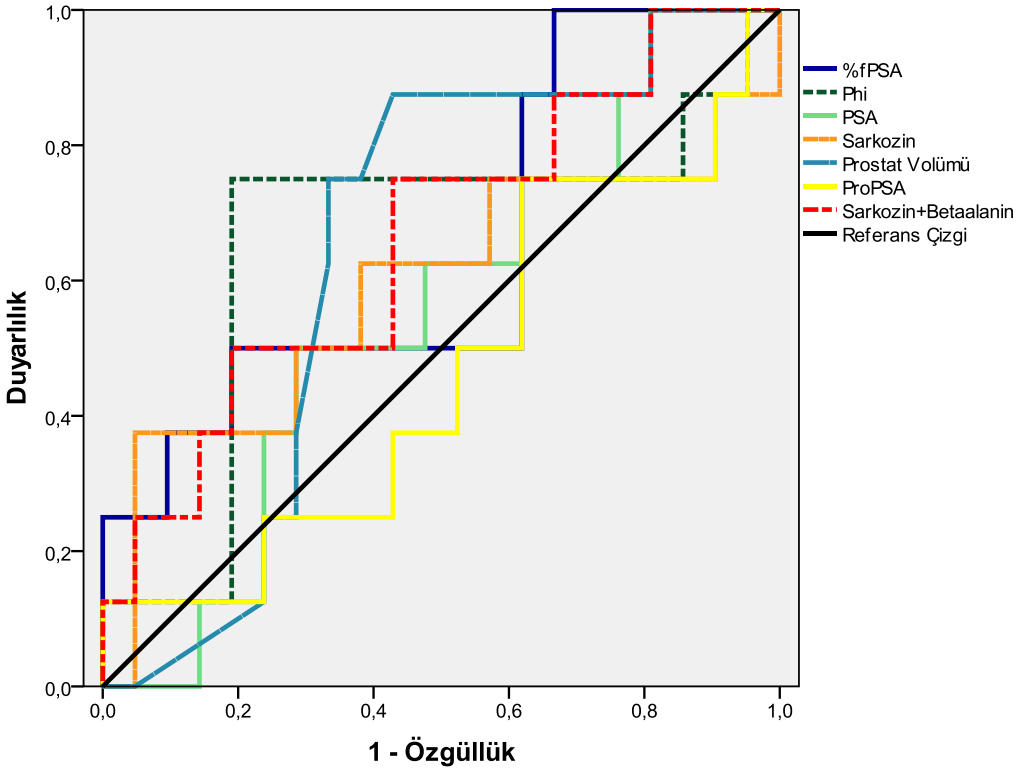
PSA'nın normal prostat dokusundan kana geçişi yaşla beraber artmaktadır. Bu artış, prostat kanseri açısından yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nedenle yaşlara göre farklı referans aralığı kullanılmaktadır (66). Buna göre biz de hastalarımızı yaşlarına göre dört kategoriye ayırdık. Bu gruplar ve yaşa göre düzeltilmiş PSA kesim değerleri Tablo 6'da gösterilmiştir:

Tablo 6. Hastaların yaşlara göre dağılımı ve PSA kesim değerleri

Yaş	**Hasta Sayısı (n)**			**PSA kesim değeri (ng/mL)**
	Biyopsi Negatif	**Biyopsi Pozitif**	**Toplam**	
40-49	2	0	2	2.5
50-59	22	8	30	3.5
60-69	46	14	60	4.5
70-79	6	6	12	6.5

Hastalarımızın sayısal olarak yeterli olduğu gruplarda PSA kesim değerlerine göre ROC eğrileri çizildi:

Buna göre 50 - 59 yaş aralığında PSA kesim değeri 3.5 ng/mL olarak ele alındığında PSA'nın prostat kanseri için duyarlılığı %75 ve özgüllüğü %36.3 idi. Bu yaş aralığında çizilen ROC eğrisine göre sarkozin+betaalanin mevcut biyobelirteçler arasında en yüksek eğri altındaki alana sahipti (Şekil 21) ve 0.66 mmol/molkreatinin kesim değeri için duyarlılığı %75 ve özgüllüğü %59 idi. ProPSA için kesim noktası 11.7 pg/mL alındığında duyarlılık %75 ve özgüllük %41 idi. Phi için kesim değeri 59.5 kabul edildiğinde duyarlılık %75 ve özgüllük %81.8 idi. Prostat volümü 35 mL'nin altındaki değerler için duyarlılık %87.5 ve özgüllük %57.1 idi (Tablo 7).

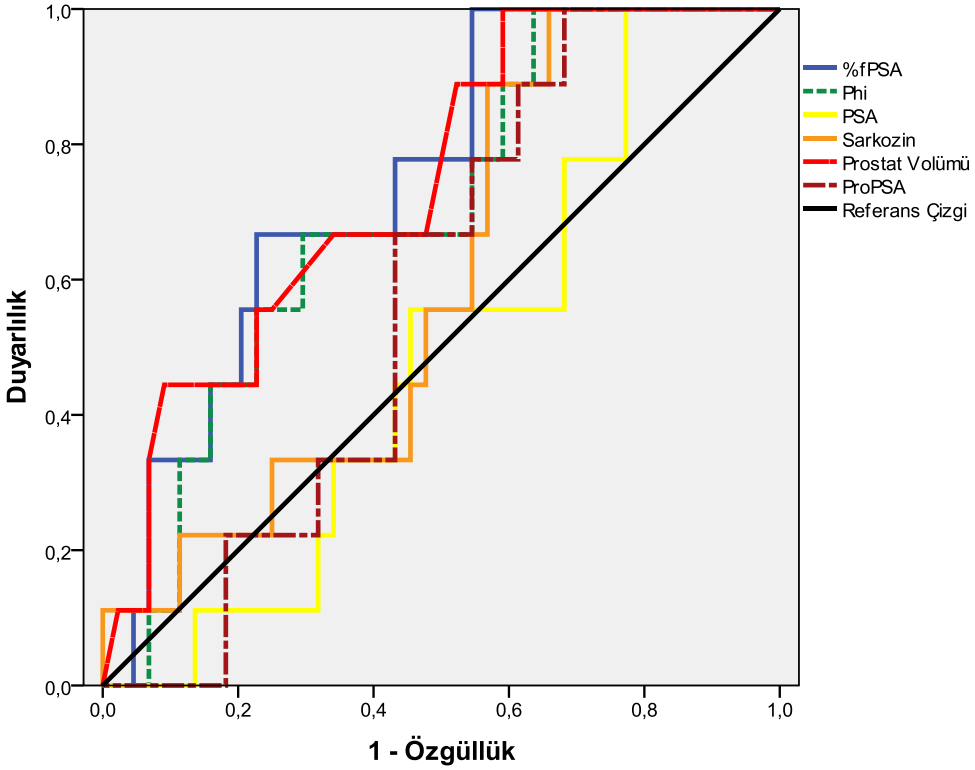


Şekil 21. 50-59 yaş arası PSA, %fPSA, phi, sarkozin, sarkozin-betaalanin ve prostat volümü ROC eğrisi

Tablo 7. 50-59 yaş sarkozin, sarkozin-betaalanin, PSA, %fPSA, p2PSA, phi ve prostat volümü duyarlılık, özgüllük ve eğri altında kalan alanlar

	Kesim değeri	**Duyarlılık (%)**	**Özgüllük (%)**	**Eğri Altındaki Alan**
Sarkozin	0.14	62.5	63.6	0.597
Sarkozin-BetaAlanin	0.66	75	59	0.665
PSA	3.5	75	36.3	0.563
%fPSA	13	50	81.8	0.649
p2PSA	11.7	75	41	0.483
phi	59.5	75	81.8	0.659
Prostat Volümü	35	87.5	57.1	0.646

60-69 yaş arası hastalarda PSA kesim değeri 4.5 ng/mL olarak belirlendiğinde PSA'nın prostat kanseri için duyarlılığı %64.2 ve özgüllüğü %32.6 idi. Bu yaş aralığında çizilen ROC eğrisi verilerine göre %fPSA mevcut biyobelirteçler arasında en yüksek eğri altındaki alana sahip olup (Şekil 22) 14.3'ün altındaki değerler için duyarlılığı %64 ve özgüllüğü %78 idi. ProPSA için kesim noktası 17.15 pg/mL alındığında duyarlılık %71.4 ve özgüllük %56.5 idi. Phi için kesim değeri 64.6 kabul edildiğinde duyarlılık %64.3 ve özgüllük %71.7 idi. Prostat volümü 37 mL'nin altındaki değerler için duyarlılık %66.7 ve özgüllük %66 idi (Tablo 8). Eğri altında kalan alanlar açısından sırasıyla %fPSA, prostat volümü ve phi en yüksek değerlere sahipti (sırası ile; p = 0.022, 0.024 ve 0.021).

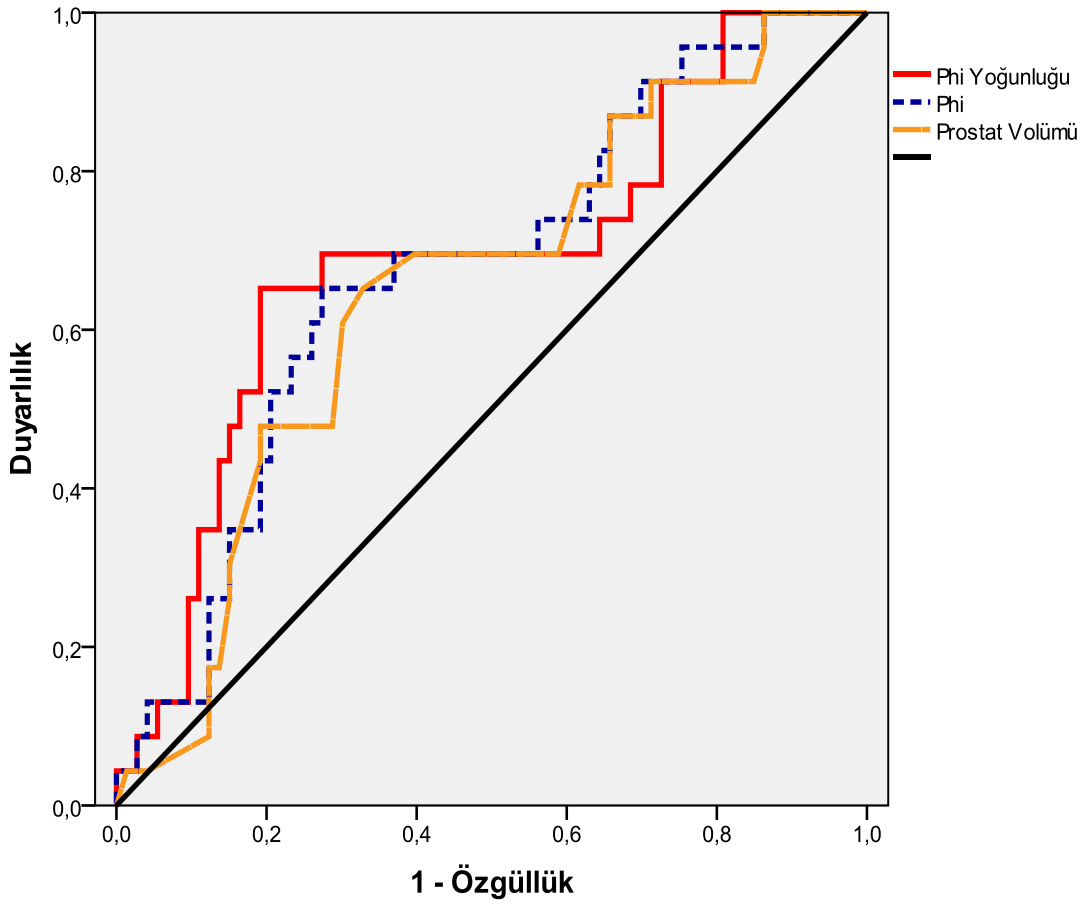


Şekil 22. 60-69 yaş arası PSA, p2PSA, phi, sarkozin, %fPSA ve prostat volümü ROC eğrisi

Tablo 8. 60-69 yaş PSA, p2PSA, phi, sarkozin, %fPSA ve prostat volümü duyarlılık, özgüllük ve eğri altında kalan alanlar

	Kesim değeri	**Duyarlılık (%)**	**Özgüllük (%)**	**Eğri Altındaki Alan**
Sarkozin	0.10	78.5	45.7	0.573
PSA	4.5	64.2	32.6	0.574
%fPSA	14.3	64	78	0.745
p2PSA	17.15	71.4	56.5	0.643
phi	64.6	64.3	71.7	0.705
Prostat Volümü	37	66.7	66	0.740

Tüm yaş grupları göz önünde bulundurulduğunda prostat volümünün biyopsi negatif ve biyopsi pozitif grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olması nedeniyle ROC eğrisindeki performansı göz önünde bulundurularak, phi/prostat volümü'nün (phi yoğunluğu) tanısal performansa olan katkısı incelendi (Şekil 23). Phi yoğunluğu için kesim noktası 2.15 alındığında duyarlılık 65.2 ve özgüllük %80.8 olarak izlendi (Tablo 9).



Şekil 23. Phi, phi yoğunluğu ve prostat volümü ROC eğrisi

Tablo 9. Phi, phi yoğunluğu ve prostat volümü duyarlılık, özgüllük ve eğri altındaki alanlar

	Kesim Noktası	**Duyarlılık**	**Özgüllük**	**Eğri Altında Kalan Alan**	**p değeri**
Phi Yoğunluğu	2.15	65.2	80.8	0.689	0.006
Phi	64.6	65.5	73.7	0.675	0.002
Prostat Volümü	36	65.2	67.12	0.652	0.037

5 TARTIŞMA:

Çalışmaya aldığımız iki grubun yaş ortalamaları açısından aralarında fark olmaması, yaşa bağlı değişkenlerin sonuçlarımıza etki etmediğini göstermektedir. Sigara kullanımı ve alkol tüketimi açısından gruplar arasında fark tespit edilmemesi, bu açıdan çalışmayı etkileyen bir unsur olmadığını ortaya koymuştur.

Serum PSA ortanca değerleri açısından gruplar arasında fark olmaması (p= 0.053) PSA'nın prostat kanseri tanısında iyi bir biyobelirteç olmadığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Bu da PSA'ya alternatif özgüllüğü daha yüksek biyobelirteçler saptamak için yaptığımız araştırmanın gerekliliğini ortaya koymaktadır. Obezitenin, hemodilüsyon nedeniyle düşük serum PSA düzeylerine neden olduğu öne sürülmüştür (67). Çalışmamızda BMI açısından gruplar arasında fark olmaması grupların PSA değerlerinin hemodilüsyondan etkilenmediğini ortaya koymaktadır.

Serum ortalama %fPSA değerleri Sokoll ve arkadaşlarının (68) yapmış oldukları çalışmada olduğu gibi biyopsi pozitif grupta anlamlı şekilde daha düşüktü.

Gruplarımız arasında p2PSA açısından herhangi bir fark tespit edilmemesine rağmen prostat kanseri tanısı koymada Catalona ve arkadaşlarının (31) yapmış olduğu çalışmaya benzer şekilde phi'nin anlamlı derecede biyopsi pozitif grupta daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu sonuçlarımız yine Guazzoni ve arkadaşlarının (69) yaptığı çalışmayla da uyumluydu.

Çalışmamızda prostat volümü ortalamasının biyopsi pozitif grupta anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edildi. Bu sonuç prostat volümünün de prostat kanseri tanısında değerlendirmeye alınması gerektiğini gösterdi. Bu sonuçlar Al-Azab ve arkadaşlarının (70) prostat volümünün, PSA 2-9 ng/mL arasındaki hastalarda prostat kanseri tanısı koymada yararlı olduğu yönünde yaptığı çalışma ile uyumluydu. Bununla beraber sonuçlarımız yine Kobayashi ve arkadaşlarının (71) PSA 2-10 ng/mL arasında olan 154 hasta ile yaptıkları çalışmada prostat volümünün prostat kanseri tanısında PSA'dan anlamlı bir şekilde daha iyi olduğunu ortaya

koyduğu çalışma ile de uyumluydu. Kim ve arkadaşları (72) ile Tang ve arkadaşları (73) da yaptıkları çalışmada prostat volümünün PSA'dan daha iyi bir prognostik değere sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Sarkozin ile ilişkili olarak ilk 1999 yılında "Nature" dergisinde yayınlanan Sreekumar ve arkadaşları (2) tarafından yapılan geniş çaplı çalışmada, 262 prostat ilişkili örnekten 1126 metabolit tanımlanmış ve benign prostatik epitelyal hücrelerdeki miktarlarla kıyaslandığında, invaziv prostat kanseri hücrelerinde bu metabolitler arasında sarkozinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bundan başka aynı çalışmada glisinden sarkozin oluşumunu sağlayan enzim olan glisin-N-metiltransferaz enzimi bloke edildiğinde prostat kanser invazyonunun zayıfladığı ve tam tersi sarkozini yıkan enzimlerin inhibisyonuyla da BPH'lı hücrelerde invaziv fenotipin uyarıldığı da ortaya konmuştur. Dolayısıyla bu sonuçlar ışığında sarkozinin prostat kanserli dokuların invazyonunda ve daha kötü seyretmesiyle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (2). Bu çalışmadan sonra bilim dünyası bu metabolitin bir biyobelirteç olup olmadığıyla ilgili birçok çalışma yapmaya başlamıştır. MS sistemlerinde analiz edilen sarkozin ve alanin izomerlerinin moleküler yapı ve ağırlıkları aynı olduğundan analiz edildiklerinde m/z oranları aynı olduğu için aynı pik içinde değerlendirilmektedir. Bu da sarkozini normalden daha yüksek miktarda göstermektedir. Alanin izomerlerinin sarkozin sonuçlarını bu şekilde interfere etmesini engellemek için sarkozin ve alanin izomerlerini birbirlerinden ayırabilen bir analiz yöntemi kullanıldı. Böylece elde ettiğimiz sarkozin sonuçlarının alanin izomerlerinden etkilenmediği söylenebilir. Ancak yapılan karşılaştırmada idrar sarkozin, alanin ve betaalanin düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi. Bu sonuç sarkozini ayrıştırmadan analiz eden Jentzmik ve arkadaşlarının (4) yapmış olduğu çalışma ile Wu ve arkadaşlarının (74) ve Struys ve arkadaşlarının (3) sarkozin'i alanin izomerlerinden ayrıştırarak yapmış oldukları çalışmanın sonuçlarıyla uyumluydu. Bununla ilgili kesin bir şey söyleyebilmek için daha çok sayıda hasta ile çalışmanın yapılması önerilmektedir. Lucarelli ve arkadaşları (5) tarafından daha çok örneklem ile yapılan çalışmada serum sarkozin düzeyinin PSA <4 ng/mL olduğu durumlarda PSA ve %fPSA'dan daha yüksek öngörü değerine sahip olduğunu ortaya koymuştur ancak bu analizi

florometrik yöntemle yaptığı için bu sonuçların MS sistemleriyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılamayacağı ve güvenilir olamayacağı öne sürülmüştür. O nedenle Jack A. Schalken'in de söylediği gibi gerek seçilen kohort ve karşılaştırılan parametreler gerekse yapılan analizlerde belirgin bir standart olmaması nedeniyle sonuçların birbirleriyle kıyaslanmaları mümkün olmamaktadır. Çünkü Sreekumar ve arkadaşlarının yaptığı analizde sarkozin değerleri idrar sedimentinde çalışılıp alanin ile oranlanarak verildiği halde Jentzmik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sarkozin değerleri idrar süpernatanında çalışılıp kreatinin ile oranlanarak ele alınmıştır (6). Biz yaptığımız çalışmada bu değişkenleri en aza indirip standart bir prosedür oluşturmaya çalıştık.

B12 vitamini ve folat metiyonin ve sarkozin metabolizmasına katıldıklarından eksiklikleri sarkozin düşüklüğüne yol açabilmektedir, idrar sarkozin sonuçlarımızın bundan etkilenmediğini ortaya koymak için B12 vitamini ve folat ölçümü yapıldı. Gruplar arasında B12 vitamini ve folat açısından fark yoktu ve düşük değerlere sahip hastalar dışlandığından sarkozin değerlerinin bundan etkilenmediği söylenebilir.

İki hasta grubu arasında idrar sistein, metiyonin ve homosistein düzeyleri açısından da anlamlı bir fark görülmedi. Stabler ve arkadaşları da (75) yaptıkları çalışmada idrar sistein ve sarkozin düzeyleri nüks gerçekleşen grupta nüks olmayan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olmasına rağmen idrar homosistein düzeyleri arasında anlamlı bir fark tespit edememişlerdi.

Çalışmanın planı gereği metastaz ve nüks varlığı ele alınmamasına rağmen biyopsi pozitif hastalar Gleason skorlarına göre < 7 ve ≥ 7 olarak iki gruba ayrılarak riskli prostat kanserini gösterme açısından parametreler değerlendirildiğinde Gleason skoru ≥ 7 olan grupta sarkozin ve PSA'nın anlamlı şekilde yüksek oldukları tespit edildi. Bu sonuç sarkozinin prostat kanserini benign durumlardan ayırt etmekten ziyade riskli kanser ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu Jentzmik ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlarla çelişmesine rağmen, nükste idrar sarkozin düzeylerini inceleyen Stabler ve arkadaşlarının (75) yaptıkları çalışmada ortaya koydukları veriler ile uyumluydu.

Prostat biyopsisi altın standart kabul edilerek ROC eğrileri çizilerek eğri altında kalan alanlarına göre parametrelerin tanısal performansları karşılaştırıldığında en iyi tanı performanları sırasıyla %fPSA > phi > prostat volümü > PSA idi. Bu Stephan ve arkadaşları (76), Semjonow ve arkadaşları (77), Guazzoni ve arkadaşları (69) ve Catalona ve arkadaşlarının (31) yaptığı çalışmada elde ettiği veriler phi > %fPSA > PSA olmasına rağmen uyumluydu. Phi ve %fPSA açısından mevcut olan farkın kohortlardan kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü.

Prostat kanseri tanısında en ciddi sorun özgüllüktür, çünkü mevcut biyobelirteçler çok iyi duyarlılığa sahip olmasına rağmen özgüllükleri düşük olduğundan yanlış pozitif sonuçlara neden olarak hastalara gereksiz biyopsi yapılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle değerlendirmeye aldığımız parametrelerin %90 duyarlılıkta sahip oldukları özgüllükleri hesaplanarak en iyi performansa sahip olanlar belirlenmek istendi. Yapılan değerlendirmede duyarlılığın %90 olduğu durumda özgüllükler ele alındığında en iyi özgüllük değerleri sırasıyla %fPSA, prostat volümü, phi ve PSA şeklindeydi. Phi değeri için elde ettiğimiz özgüllük değeri (%23.7) Stephan ve arkadaşlarının (78) bulduğu %33, ve Lughezzani ve arkadaşlarının (33) bulduğu %29.1 oranlarına benzerdi. Aralarındaki küçük farklar, seçilen kohort sayısı ve dağılımıyla ilişkili olabilir. PSA ve %fPSA'nın %90 duyarlılıktaki özgüllük değerleri (sırasıyla %22.4 ve %38.2) Carsten ve arkadaşlarının (79) elde ettiği sonuçlarla (%22.7 ve %40.9) uyumlu olmasına rağmen Lughezzani ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuçlardan (%16.1 - %17.3) daha yüksekti. ProPSA açısından bakıldığında %90 duyarlılıkta elde ettiğimiz özgüllük (%18.4) Lughezzani ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada elde ettikleri değere yakın idi.

PSA'nın normal prostat dokusundan kana geçişi yaşla beraber arttığı için yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nedenle yaşlara göre farklı referans aralıkları kullanılmaktadır (66). Hastalarımız içinde 50-59 yaş ve 60-69 yaş aralığında olanlar için belirlenen PSA kesim değerleri kullanılarak yapılan değerlendirmede sarkozin ve betaalanin izomerini ayrıştırmadan elde edilen sarkozin+betaalanin'in %75 duyarlılık ve %59 özgüllük ile 50-59 yaş aralığında PSA'dan daha iyi tanı performansına sahip bir biyobelirteç olduğu görüldü. Ancak,

özellikle biyopsi pozitif gruptaki hasta sayımızın azlığı nedeniyle betaalanin sarkozin ilişkisini ortaya koymak için daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır. Bununla beraber çalışmamızda yine önceki çalışmalarda da ortaya konduğu gibi %fPSA, prostat volümü ve phi'nın her iki grupta da tanı koymadaki özgüllüğünün PSA'dan daha iyi olduğu ortaya kondu. Ancak biyopsi pozitif hasta sayımızın azlığından ötürü PSA'nın 2-4 ng/mL arasında olduğu gruptaki performansları belirlenemedi.

Tüm sonuçlar incelendiğinde %fPSA ve phi ile beraber prostat volümünün performansının önemli ölçüde yüksek olduğu görüldü. Buradan yola çıkarak (p2PSA/fPSA)x√PSA formülü ile hesaplanan phi'nin paydasına prostat volümünün eklenmesi ile elde edilen phi yoğunluğu, phi ile karşılaştırıldığında özgüllüğün arttığı görüldü. Bu fark her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile daha geniş tabanlı ileriye yönelik çalışmalarla bu konuda daha iyi ve yararlı bilgilerin elde edileceğini düşündürmektedir.

6 SONUÇLAR:

Bu çalışma neticesinde elde edilen sonuçlara göre idrar sarkozin düzeyinin prostat kanseri tanısında bir biyobelirteç olarak kullanılamayacağı ortaya kondu. Prostat volümü, %fPSA ve phi'nin PSA'ya göre daha yüksek özgüllüğe sahip oldukları tespit edildi. Sarkozin ve PSA'nın Gleason Skoru ≥7 olan hasta grubunda yüksek olması sarkozinin riskli kanseri göstermede etkili olduğunu ortaya koydu. Ayrıca phi ve volümün beraber kullanılmasıyla elde edilen phi yoğunluğunun özgüllüğü daha da arttırdığı ortaya kondu. Bunların yanısıra özellikle biyopsi pozitif hasta grubunun örneklem büyüklüğünün az olması nedeniyle PSA'nın 2-4 ng/mL arasında olduğu ve gereksiz biyopsilerin daha çok yapıldığı bu aralıkta gerekli değerlendirmenin yapılamaması çalışmanın kısıtlılığı olarak sayılabilir. Dolayısıyla daha çok sayıda hasta ile çalışmanın yapılması önerilir.

7 KAYNAKLAR:

(1) Dr.Rahmi Gökhan Ekin, Dr.Ferruh Zorlu. Türkiye verilerine göre prostat kanseri taranmalı mı? Üroonkoloji eBülten Haziran 2013; 2: 71-75.

(2) Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. Nature 2009 Feb 12; 457 (7231): 910-4.

(3) Struys EA, Heijboer AC, van MJ, Jakobs C, Blankenstein MA. Serum sarcosine is not a marker for prostate cancer. Ann Clin Biochem 2010 May; 47 (Pt 3): 282.

(4) Jentzmik F, Stephan C, Miller K, Schrader M, Erbersdobler A, Kristiansen G, et al. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours. Eur Urol 2010 Jul; 58 (1): 12-8.

(5) Lucarelli G, Fanelli M, Larocca AM, Germinario CA, Rutigliano M, Vavallo A, et al. Serum sarcosine increases the accuracy of prostate cancer detection in patients with total serum PSA less than 4.0 ng/ml. Prostate 2012 Nov; 72 (15): 1611-21.

(6) Schalken JA. Is urinary sarcosine useful to identify patients with significant prostate cancer? The trials and tribulations of biomarker development. Eur Urol 2010 Jul; 58 (1): 19-20.

(7) Jentzmik F, Stephan C, Lein M, Miller K, Kamlage B, Bethan B, et al. Sarcosine in prostate cancer tissue is not a differential metabolite for prostate cancer aggressiveness and biochemical progression. J Urol 2011 Feb; 185 (2): 706-11.

(8) Tanagho EA. Anatomy of the genitourinary tract; in Tanagho TA, McAninch JE (eds): Smith's General Urology, ed 14, Nonvalk, Appleton & Lange, 1995, pp 1-16

(9) Hinman F Jr.Atlas of Urosurgical Anatomy, Philadelphia, W.B Saunders Co, 1993.

(10) McNeal JE. The prostate and prostatic urethra: A morphologic study.J Urol 1972; 107:1008-1016.

(11) Baydinç C: Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı; Temel Üroloji. Güneş Kitabevi Ltd Şti, Ankara 1998.

(12) Matthew J.Roberts, Horst J.Schirra, Martin F.Lavin. Metabolomics: A novel approach to early and noninvasive prostate cancer detection. Korea: Korean Journal of Urology; 2011.

(13) Fair WR, Couch J, Wehner N. Prostatic antibacterial factor. Identity and significance. Urology 1976 Feb; 7 (2): 169-77.

(14) Costello LC, Franklin RB. Prostatic fluid electrolyte composition for the screening of prostate cancer: a potential solution to a major problem. Prostate Cancer Prostatic Dis 2009;12 (1): 17-24.

(15) Yacoe ME, Sommer G, Peehl D. In vitro proton spectroscopy of normal and abnormal prostate. Magn Reson Med 1991 Jun; 19 (2): 429-38.

(16) Tanagho EA. Campbell's Urology. 6 ed. 1992; Chapter 95-97.

(17) Chan JM, Jou RM, Carroll PR. The relative impact and future burden of prostate cancer in the United States. J Urol 2004 Nov;172 (5 Pt 2): S13-S16.

(18) Gonzalgo ML, Isaacs WB. Molecular pathways to prostate cancer. J Urol 2003 Dec; 170 (6 Pt 1): 2444-52.

(19) Bostwick DG. Grading prostate cancer. Am J Clin Pathol 1994 Oct; 102 (4 Suppl 1): 38-56.

(20) Mikami Y, Manabe T, Epstein JI, Shiraishi T, Furusato M, Tsuzuki T, et al. Accuracy of gleason grading by practicing pathologists and the impact of education on improving agreement. Hum Pathol 2003 Jul; 34 (7): 658-65.

(21) Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. Mod Pathol 2004 Mar; 17 (3): 292-306.

(22) Ozdamar SO, Sarikaya S, Yildiz L, Atilla MK, Kandemir B, Yildiz S. Intraobserver and interobserver reproducibility of WHO and Gleason histologic grading systems in prostatic adenocarcinomas. Int Urol Nephrol 1996; 28 (1): 73-7.

(23) Tanagho EA, McAnich JW. Smith's General Urology. 17 ed. 2008.

(24) Makarov DV, Loeb S, Getzenberg RH, Partin AW. Biomarkers for prostate cancer. Annu Rev Med 2009; 60: 139-51.

(25) Gutman AB, Gutman EB. An acid phosphatase occuring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostate gland. J Clin Invest 1938 Jul; 17 (4): 473-8.

(26) Raaijmakers R, Wildhagen MF, Ito K, Paez A, de Vries SH, Roobol MJ, et al. Prostate-specific antigen change in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, section Rotterdam. Urology 2004 Feb; 63 (2): 316-20.

(27) Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. Clin Chem 1991 Sep; 37 (9): 1618-25.

(28) Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. Cancer Res 1991 Jan 1; 51 (1): 222-6.

(29) Sokoll LJ, Chan DW, Mikolajczyk SD, Rittenhouse HG, Evans CL, Linton HJ, et al. Proenzyme psa for the early detection of prostate cancer in the 2.5-4.0 ng/ml total psa range: preliminary analysis. Urology 2003 Feb; 61 (2): 274-6.

(30) Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, Evans CL, Linton HJ, Amirkhan A, et al. Serum pro prostate specific antigen improves cancer detection compared to free and complexed prostate specific antigen in men with prostate specific antigen 2 to 4 ng/ml. J Urol 2003 Dec; 170 (6 Pt 1): 2181-5.

(31) Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma CH, et al. A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. J Urol 2011 May; 185 (5): 1650-5.

(32) Le BV, Griffin CR, Loeb S, Carvalhal GF, Kan D, Baumann NA, et al. [-2]Proenzyme prostate specific antigen is more accurate than total and free prostate specific antigen in differentiating prostate cancer from benign disease in a prospective prostate cancer screening study. J Urol 2010 Apr; 183 (4): 1355-9.

(33) G.Lughezzani, M.Lazzeri, V.Scattoni, A.Larcher, G.Gadda, L.Nava, et al. Clinical Cut-Offs of Isoform [-2]proPSA (p2PSA) Derivatives, Namely %p2PSA and phi (prostate health index) for Guiding Biopsy Decision in Caucasian Population. 27th Annual EAU Congress, Paris, 24-28 February 2012.

(34) Su SL, Huang IP, Fair WR, Powell CT, Heston WD. Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA: ratio of expression as a potential measurement of progression. Cancer Res 1995 Apr 1; 55 (7): 1441-3.

(35) Horoszewicz JS, Kawinski E, Murphy GP. Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. Anticancer Res 1987 Sep; 7 (5B): 927-35.

(36) Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Young CY, et al. Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker. Urology 1997 Jun; 49 (6): 857-62.

(37) Tremblay RR, Coulombe E, Cloutier S, Brunet C, Deperthes D, Frenette G, et al. Assessment of the trypsin-like human prostatic kallikrein, also known as hK2, in the seminal plasma of infertile men: respective contributions of an ELISA procedure and of Western blotting. J Lab Clin Med 1998 Apr; 131 (4): 330-5.

(38) Kwiatkowski MK, Recker F, Piironen T, Pettersson K, Otto T, Wernli M, et al. In prostatism patients the ratio of human glandular kallikrein to free PSA improves the discrimination between prostate cancer and benign hyperplasia within the diagnostic "gray zone" of total PSA 4 to 10 ng/mL. Urology 1998 Sep; 52 (3): 360-5.

(39) Partin AW, Catalona WJ, Finlay JA, Darte C, Tindall DJ, Young CY, et al. Use of human glandular kallikrein 2 for the detection of prostate cancer: preliminary analysis. Urology 1999 Nov; 54 (5): 839-45.

(40) Nam RK, Diamandis EP, Toi A, Trachtenberg J, Magklara A, Scorilas A, et al. Serum human glandular kallikrein-2 protease levels predict the presence of prostate cancer among men with elevated prostate-specific antigen. J Clin Oncol 2000 Mar; 18 (5): 1036-42.

(41) Yousef GM, Kyriakopoulou LG, Scorilas A, Fracchioli S, Ghiringhello B, Zarghooni M, et al. Quantitative expression of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in ovarian cancer: a new independent and favorable prognostic marker. Cancer Res 2001 Nov 1; 61 (21): 7811-8.

(42) Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N Engl J Med 1987 Oct 8; 317 (15): 909-16.

(43) Carter HB, Morrell CH, Pearson JD, Brant LJ, Plato CC, Metter EJ, et al. Estimation of prostatic growth using serial prostate-specific antigen measurements in men with and without prostate disease. Cancer Res 1992 Jun 15;52 (12): 3323-8.

(44) Oesterling JE, Martin SK, Bergstralh EJ, Lowe FC. The use of prostate-specific antigen in staging patients with newly diagnosed prostate cancer. JAMA 1993 Jan 6; 269 (1): 57-60.

(45) Morgan TO, Jacobsen SJ, McCarthy WF, Jacobson DJ, McLeod DG, Moul JW. Age-specific reference ranges for prostate-specific antigen in black men. N Engl J Med 1996 Aug 1; 335 (5): 304-10.

(46) Chen Z, Chen H, Stamey TA. Prostate specific antigen in benign prostatic hyperplasia: purification and characterization. J Urol 1997 Jun; 157 (6): 2166-70.

(47) Christensson A, Bjork T, Nilsson O, Dahlen U, Matikainen MT, Cockett AT, et al. Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urol 1993 Jul; 150 (1): 100-5.

(48) Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, Wang TJ, Rittenhouse HG, Ratliff TL, et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. JAMA 1995 Oct 18; 274 (15): 1214-20.

(49) Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, Rittenhouse HG, Marks LS, Song W, et al. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. Cancer Res 2000 Feb 1; 60 (3): 756-9.

(50) Mikolajczyk SD, Grauer LS, Millar LS, Hill TM, Kumar A, Rittenhouse HG, et al. A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum. Urology 1997 Nov; 50 (5): 710-4.

(51) Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Marks LS, et al. "BPSA," a specific molecular form of free prostate-specific antigen, is found predominantly in the transition zone of patients with nodular benign prostatic hyperplasia. Urology 2000 Jan; 55 (1): 41-5.

(52) Zhang WM, Leinonen J, Kalkkinen N, Dowell B, Stenman UH. Purification and characterization of different molecular forms of prostate-specific antigen in human seminal fluid. Clin Chem 1995 Nov; 41 (11): 1567-73.

(53) Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, Millar LS, Saedi MS. Expression of pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. Cancer Res 1997 Aug 1; 57 (15): 3111-4.

(54) Mikolajczyk SD, Marker KM, Millar LS, Kumar A, Saedi MS, Payne JK, et al. A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a more specific serum marker of prostate cancer. Cancer Res 2001 Sep 15; 61 (18): 6958-63.

(55) Khan AR, James MN. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. Protein Sci 1998 Apr; 7 (4): 815-36.

(56) Peter J, Unverzagt C, Krogh TN, Vorm O, Hoesel W. Identification of precursor forms of free prostate-specific antigen in serum of prostate cancer patients by immunosorption and mass spectrometry. Cancer Res 2001 Feb 1; 61 (3): 957-62.

(57) Stephen D.Mikolajczyk, Eonard S.Marks, Lan W.Partin, Ndharry G.Rittenhouse. Free prostate specific antigen in serum is becoming more complex. Journal of Urology 2002 Jun; 59 (6): 797-802.

(58) Luka Z, Mudd SH, Wagner C. Glycine N-methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels. J Biol Chem 2009 Aug 21; 284 (34): 22507-11.

(59) Couzin J. Biomarkers. Metabolite in urine may point to high-risk prostate cancer. Science 2009 Feb 13; 323 (5916): 865.

(60) Dunn WB, Broadhurst D, Ellis DI, Brown M, Halsall A, O'Hagan S, et al. A GC-TOF-MS study of the stability of serum and urine metabolomes during the UK Biobank sample collection and preparation protocols. Int J Epidemiol 2008 Apr; 37 Suppl 1: i23- i30.

(61) Zweigenbaum J, Henion J. Bioanalytical high-throughput selected reaction monitoring-LC/MS determination of selected estrogen receptor modulators in human plasma: 2000 samples/day. Anal Chem 2000 Jun 1; 72 (11): 2446-54.

(62) Meyer TE, Fox SD, Issaq HJ, Xu X, Chu LW, Veenstra TD, et al. A reproducible and high-throughput HPLC/MS method to separate sarcosine from alpha- and beta-alanine and to quantify sarcosine in human serum and urine. Anal Chem 2011 Jul 15; 83 (14): 5735-40.

(63) Andersen BD, Wise BL. Textbook of clinical chemistry. Philadelphia: WB Saunders Company. 1986.

(64) Cooks RG, Busch KL, Glish GL. Mass spectrometry: analytical capabilities and potentials. Science 1983 Oct 21; 222 (4621): 273-91.

(65) Lehrer M. In Kaplan LA. Mass spectrometry.St.Louis:Mosby Company. 1996.

(66) Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. JAMA 1993 Aug 18; 270 (7): 860-4.

(67) Baillargeon J, Pollock BH, Kristal AR, Bradshaw P, Hernandez J, Basler J, et al. The association of body mass index and prostate-specific antigen in a population-based study. Cancer 2005 Mar 1; 103 (5): 1092-5.

(68) Sokoll LJ, Sanda MG, Feng Z, Kagan J, Mizrahi IA, Broyles DL, et al. A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010 May; 19 (5): 1193-200.

(69) Guazzoni G, Nava L, Lazzeri M, Scattoni V, Lughezzani G, Maccagnano C, et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA significantly improves the prediction of prostate cancer at initial extended prostate biopsies in patients with total PSA between 2.0 and 10 ng/ml: results of a prospective study in a clinical setting. Eur Urol 2011 Aug; 60 (2): 214-22.

(70) Stephan C, Jung K, Lein M, Deger S. Re: Al-Azab R, Toi A, Lockwood G, et al. Prostate volume is strongest predictor of cancer diagnosis at transrectal ultrasound-guided prostate biopsy with prostate-specific antigen values between 2.0 and 9.0 ng/mL (Urology 69: 103-107, 2007). Urology 2008 Oct; 72 (4): 951.

(71) Kobayashi T, Mitsumori K, Kawahara T, Nishizawa K, Ogura K, Ide Y. Prostate gland volume is a strong predictor of biopsy results in men 70 years or older with prostate-specific antigen levels of 2.0-10.0 ng/mL. Int J Urol 2005 Nov; 12 (11): 969-75.

(72) Kim YM, Park S, Kim J, Park S, Lee JH, Ryu DS, et al. Role of prostate volume in the early detection of prostate cancer in a cohort with slowly increasing prostate specific antigen. Yonsei Med J 2013 Sep; 54 (5): 1202-6.

(73) Tang P, Jin XL, Uhlman M, Lin YR, Deng XR, Wang B, et al. Prostate volume as an independent predictor of prostate cancer in men with PSA of 10-50 ng ml(-1). Asian J Androl 2013 May; 15 (3): 409-12.

(74) Wu H, Liu T, Ma C, Xue R, Deng C, Zeng H, et al. GC/MS-based metabolomic approach to validate the role of urinary sarcosine and target biomarkers for human prostate cancer by microwave-assisted derivatization. Anal Bioanal Chem 2011 Aug; 401 (2): 635-46.

(75) Stabler S, Koyama T, Zhao Z, Martinez-Ferrer M, Allen RH, Luka Z, et al. Serum methionine metabolites are risk factors for metastatic prostate cancer progression. PLoS One 2011; 6 (8): e22486.

(76) Carsten Stephan, Sébastien Vincendeau, Alain Houlgatte, Axel Semjonow. Prostate Health Index *(phi)* using [-2]proPSA improves detection of prostate cancer preferentially identifying aggressive cancers. 26th Annual EAU Congress, Vienna, 2011.

(77) Semjonow A, Kopke T, Eltze E, Pepping-Schefers B, Burgel H, Darte C. Pre-analytical in-vitro stability of [-2]proPSA in blood and serum. Clin Biochem 2010 Jul; 43 (10-11): 926-8.

(78) Stephan C, Vincendeau S, Houlgatte A, Cammann H, Jung K, Semjonow A. Multicenter evaluation of [-2]proprostate-specific antigen and the prostate health index for detecting prostate cancer. Clin Chem 2013 Jan; 59 (1): 306-14.

(79) Stephan C, Cammann H, Deger S, Schrader M, Meyer HA, Miller K, et al. Benign prostatic hyperplasia-associated free prostate-specific antigen improves detection of prostate cancer in an artificial neural network. Urology 2009 Oct; 74 (4): 873-7.