



**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ HAYDARPAŞA NUMUNE
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

ÜROLOJİ KLİNİĞİ

**MESANE KANSERLİ OLGULARDA İNDOLEAMİN 2,3-DİOKSİ-
JENAZ 1 (IDO-1) ENZİM AKTİVİTESİ İLE RS10089084 GEN PO-
LİMORFİZMİNİN İLİŞKİSİ**

Dr. Kemal Kayar

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2022





**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ HAYDARPAŞA NUMUNE
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

ÜROLOJİ KLİNİĞİ

**MESANE KANSERLİ OLGULARDA İNDOLEAMİN 2,3-DİOKSİ-
JENAZ 1 (IDO-1) ENZİM AKTİVİTESİ İLE RS10089084 GEN PO-
LİMORFİZMİNİN İLİŞKİSİ**

Dr. Kemal Kayar

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Levent Verim

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2022

TEŞEKKÜR

Zorlu geçen asistanlık sürecimizde her zaman yanımda olan, hiçbir yardımı esirgemeyen, eğitimimiz için çok önemli katkıları olan Üroloji kliniğinin idari sorumlusu olan saygıdeğer hocam Op. Dr. Ömer Ergin Yücebaş'a ve eğitim sorumlusu olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Metin İshak Öztürk'e,

İyi bir hekim olma yolunda yürüdüğümüz bu zorlu yolda, mesleki eğitim ve iyi bir insan olmak adına, benden yardımlarını esirgemeyen değerli ağabeylerim Doç. Dr. Levent Verim, Prof. Dr. Ahmet Rüknettin Aslan, Op. Dr. Çağatay Tosun, Doç. Dr. Emre Karabay, Op. Dr. Ömer Yüksel, Op. Dr. Fatih Özdemir'e,

Tezimde büyük yardımları olan İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Moleküler Tıp Ana Bilim Dalı'nda görevli saygıdeğer hocam Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

Asistanlığa başladığım günden bu yana ağabeyliklerini esirgemeyen kıdemlilerim Op. Dr. Serdar Duvar, Op. Dr. Osman Bilen'e ve şu an beraber çalıştığım İlker Artuk, Mehmet Fatih Gülçer, Emre Pehlevan, Konuralp Karbeyaz, Samet Demir, Kayhan Görkem Tuncel, Recep Çıkrıkçı, Buğrahan Buhur Özdemir ve Hatice Ardiç'a,

Tüm bu süreçte değerli yardımlarını esirgemeyen çok değerli hemşirelerimiz, personellerimiz ve tıbbi sekreterlerimize,

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, her türlü sabrı ve desteği gösteren anneme, babama, ablama ve hem iş arkadaşım hem kardeşim olan Dr. Rıdvan Kayar'a,

Hayatımın her zorluğunda bana destek olan sevgili eşim Uzm. Dr. Çisem Duman Kayar'a,

Hayatımıza girdiği ilk andan beri bize en güzel duyguları yaşatan sevgili kızım Bade Kayar'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ÖZET.....	xiii
ABTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MESANENİN NORMAL YAPISI VE GELİŞİM.....	3
2.1.1. Mesane Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Mesane Anatomisi.....	3
2.1.2.1. Mesanenin vasküler yapıları.....	4
2.1.2.2. Mesanenin sinirleri.....	4
2.1.3. Mesane Histolojisi.....	5
2.1.3.1. Tunika mukoza.....	5
2.1.3.1.1. Ürotelyum.....	5
2.1.3.1.1.a. Apikal tabaka.....	6
2.1.3.1.1.b. Ara tabaka.....	6
2.1.3.1.1.c. Bazal tabaka.....	6
2.1.3.1.2. Lamina propria.....	6
2.1.3.2. Tunika Muskularis.....	7
2.1.3.3. Tunika Adventisya.....	7
2.2. MESANE KANSERİ.....	7
2.2.1. Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patoloji.....	7
2.2.1.1. Epidemiyoloji.....	7
2.2.1.2 Etiyoloji.....	8
2.2.1.2.1. Sigara.....	9
2.2.1.2.2. Mesleki maruziyet.....	9
2.2.1.2.3. Genetik.....	10
2.2.1.2.4. Medikal tedaviler ve enfeksiyonlar.....	11

2.2.1.2.5. Diyet faktörü ve çevre kirliliği.....	11
2.2.1.3. Patoloji.....	11
2.2.2. Tanı Yöntemleri.....	13
2.2.2.1. Sistoskopi.....	14
2.2.2.2. Görüntüleme yöntemleri.....	14
2.2.2.3. Sitoloji.....	15
2.2.2.4. Biyobelirteçler.....	15
2.2.3. Evreleme.....	16
2.2.4. Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanserinde Risk Grupları.....	18
2.2.5. Risk Gruplarına Göre Tedavi Seçenekleri.....	21
2.2.5.1. Düşük Riskli KİOMK.....	21
2.2.5.2. Orta Riskli KİOMK.....	21
2.2.5.3. Yüksek Riskli KİOMK.....	21
2.2.5.4. Çok Yüksek Riskli KİOMK.....	22
2.3. TRİPTOFAN METABOLİZMASI.....	22
2.4. İNDOLEAMİNE 2,3 DİOKSİJENAZ-1.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. GEREÇ.....	26
3.1.1. Hasta Örneklerinin Toplanması.....	26
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	27
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	27
3.2. YÖNTEMLER.....	28
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu.....	28
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ve Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi Yöntemi.....	29
3.2.2.1. IDO1 Gen Bölgesinin (rs10089084, G/C) PZR ile çoğaltılması.....	29
3.2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	30
3.2.2.3. Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yöntemi.....	30
3.2.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Analizi.....	31
3.3. ARAŞTIRMANIN TİPİ.....	32
3.4. ARAŞTIRMANIN YERİ, ZAMANI VE PLANI.....	32
3.5. ARAŞTIRMA EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ/ÇALIŞMA GRUPLARI... ..	33

3.5.1. Mesane Kanseri Grubu Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri.....	33
3.5.2. Mesane Kanseri Grubu Çalışmadan Dışlama Kriterleri.....	33
3.6. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ.....	34
3.7. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI.....	34
3.8. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	34
3.9. ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. DEMOGRAFİK VERİLER VE. PATOLOJİK BULGULAR.....	35
4.2. IDO1 RS10084089 G/C POLİMORFİZMİNE AİT BULGULAR.....	37
4.3. PLAZMA TRİPTOFAN VE KİNÜRENİN DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	40
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇLAR.....	55
7. KAYNAKLAR.....	56
8. EKLER.....	65
9. ÖZGEÇMİŞ.....	71

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. DSÖ mesane tümörü sınıflaması.....	12
Tablo 2.2. Amerikan Üroloji Derneği Mikroskopik Hematüri Risk Sınıflandırma Sistemi.....	13
Tablo 2.3. Ek risk faktörleri.....	14
Tablo 2.4. US FDA tarafından onaylanmış idrar biyobelirteçleri.....	16
Tablo 2.5. Mesane kanserinin 2017 TNM sınıflandırması.....	17
Tablo 2.6. EORTC risk tablosu.....	19
Tablo 2.7. EORTC rekürrens risk oranı.....	19
Tablo 2.8. EORTC progresyon risk oranı.....	20
Tablo 2.9. EAU yüzeyel mesane kanseri prognostik risk sınıflaması.....	20
Tablo 3.1. PCR reaksiyonu karışımı.....	29
Tablo 3.2. PCR Koşulları	29
Tablo 3.3. Kromatografik analiz koşulları.....	31
Tablo 3.4. Araştırma Planı.....	32
Tablo 4.1. Çalışma gruplarına ait demografik veriler.....	35
Tablo 4.2. Mesane kanser hastalarında ve sağlıklı kontrollerde IDO1 rs10089084 G/C genotipleri.....	37
Tablo 4.3. İndoleamine 2-3 Dioksijenaz 1 rs10089084 G/C genotiplerinin hastaların patolojik parametreleri ile karşılaştırılması.....	38
Tablo 4.4. İndoleamine 2-3 Dioksijenaz 1 rs10089084 G/C genotiplerinin hastaların komorbidite verileri ile karşılaştırılması.....	39
Tablo 4.5. Mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollerde plazma KYN/TRP düzeyleri.....	40
Tablo 4.6. TaLG ve TaHG grupları KYN/TRP düzeyleri.....	41
Tablo 4.7. TaLG ve T1HG grupları KYN/TRP düzeyleri.....	42
Tablo 4.8. TaHG ve T1HG grupları KYN/TRP düzeyleri.....	42
Tablo 4.9. Patolojik parametreler ile TRP/KYN düzeylerinin karşılaştırılması.....	43
Tablo 4.10. TRP/KYN düzeylerinin hastaların komorbidite verileri ile karşılaştırılması.....	44
Tablo 4.11. G alleli taşıyan MK'lı ve sağlıklı kontrollerin TRP/KYN düzeylerinin karşılaştırılması.....	45

Tablo 4.12. C alleli taşıyan MK'lı ve sağlıklı kontrollerin TRP/KYN düzeylerinin karşılaştırılması.....	45
Tablo 4.13. G alleli taşıyan MK'lı bireylerin patolojik parametreleri ile KYN/TRP düzeylerinin karşılaştırılması.....	46
Tablo 4.14. C alleli taşıyan MK'lı bireylerin patolojik parametreleri ile KYN/TRP düzeylerinin karşılaştırılması.....	47



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 3.1.** IDO1 Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü.....31
- Şekil 4.1.** IDO1 G/C PZR ürünlerinin %2,5'lik agaroz jel görüntüsü.....36
- Şekil 4.2.** Patolojik evre ile KYN/TRP oranlarının ilişkisi.....41



SİMGELER VE KISALTMALAR

AHR:	Aril Hidrokarbon Reseptörü
AUA:	American Urological Association
BCG:	Bacillus Calmette-Guerin
BT:	Bilgisayarlı Tomografi
CIS:	Karsinoma İn Situ
DM:	Diyabetes Mellitus
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EAU:	European Association Of Urology
EDTA:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
eIF2a:	Eukaryotic Initiation Factor 2
EORTC:	European Organizations for Research and Treatment of Cancer
FGFR3:	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
GSTM1:	Glutasyon S-Transferaz Mu 1
HPLC-FD:	Floresan Dedektörlü Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HT:	Hipertansiyon
IDO1:	İndoleamin 2,3-Dioksijenaz 1
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry
GCN2:	General Control Non-Derepressible-2
HG:	Yüksek Dereceli
KAH:	Koroner Arter Hastalığı
KBH:	Kronik Böbrek Hastalığı
KİOMK:	Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanseri
KOAH:	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
KYN:	Kinürenin
LG:	Düşük Dereceli
LVI:	Lenfovasküler İnvazyon
MK:	Mesane Kanseri
MRG:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NaCl:	Sodyum Klorid
NAT2:	N-Asetil-Transferaz 2
NK:	Natural killer

OD: Optik Dansite
PCA: Perklorik Asit
PET: Pozitron Emisyon Tomografi
PIRADS: Prostate İmaging-Reporting And Data System
PCR: Polymerase Chain Reaction
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS: Sodyum Dedodesil Sülfat
SNP: Single Nucleotid Polymorphism
TDO: Triptofan 2,3-Dioksijenaz
TE: Tris-EDTA
TRP: Triptofan
TUR: Transüretal Rezeksiyon
UICC: Union International Contre le Cancer
US FDA: United States Food and Drug Administration
USG: Ultrasonografi
VIRADS: Vesical İmaging-Reporting And Data System
VNTR: Variable Number Tandem Repeat
WBL: Lökosit Parçalama Çözeltilisi

ÖZET

AMAÇ

Mesane kanserinin etiyopatogenezinde etkili, genetik ve metabolik moleküllerin etki mekanizmaları henüz tanımlanmamıştır. Mesane kanserinin erken teşhisi ve tedavisinde biyobelirteçlerin önemi bilinmektedir. IDO1 enziminin immün toleransta ve kanser patogenezinde yeri önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda TRP yolağında görev alan IDO1 enzim ekspresyon seviyesi ve bunun aktivitesiyle oluşan metabolitlerin düzeyi ile IDO1 enzim aktivitesini değiştirebileceği düşünülen rs10089084 gen polimorfizmin mesane kanseri patogenezi üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mesane kanseri tanılı 44 olgu ve 70 sağlıklı kontrol grubu olmak üzere toplam 114 olgu dahil edildi. Laboratuvar analizleri İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Olgulardan EDTA'lı tüpe 10cc kan alındı. Kanlar 4500rpm'de 5 dk santrifüj edilip supernatant kısmı alikotlanarak floresan dedektör yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-FD) için -20°C'de depolanırken tüpte kalan örnek DNA izolasyonu için +4°C'de saklandı. Gen polimorfizmi için, DNA izolasyonu ve PCR-RFLP metodları kullanılarak IDO1 rs10089084 G/C gen polimorfizmi analiz edildi. TRP ve KYN düzeyleri ölçümü için FD-HPLC analizi yapıldı. Elde edilen genotipler ve TRP-KYN düzeyleri ile hastaların klinik ve patolojik parametreleri karşılaştırılarak değerlendirildi.

BULGULAR

Hasta grubunun yaş ortalaması 66,61 $\pm$ 9,44, kontrol grubunun 60,6 $\pm$ 7,93 olarak saptandı. Hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımları arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,783). KYN düzeyleri ve KYN/TRP oranı Hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek tespit edildi. (p=0,001, p=0,003). G aleli (GG/GC) taşıyan grupta Kontrol grubuna göre KYN ve KYN/TRP oranı düzeyleri

gruplar arasında anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p=0,0001$, $p=0,04$). C aleli (GC/CC) taşıyan grupta KYN düzeyleri ve KYN/TRP oranı anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p=0,0001$, $p=0,013$). Hasta grubunda, nekroz varlığında KYN/TRP oranı anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p=0,009$).

SONUÇ

Mesane kanserli hastalarda rs10089084 G/C gen polimorfizminin değerlendirilmesi literatürde ilk olup bu polimorfizmin mesane kanseri oluşum riskinde göz önünde bulundurulması gereken bir parametre olabileceği düşünülmektedir. KYN/TRP oranı düzeylerinin mesane kanseri için biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER:

Mesane kanseri; IDO; rs10089084

ABSTRACT

AIM

The mechanisms of action of genetic and metabolic molecules which are effective in the etiopathogenesis of bladder cancer have not been defined yet. The importance of biomarkers for early detection and effective control of bladder cancer is well known. The role of IDO1 enzyme in immunotolerance and cancer pathogenesis has been demonstrated in previous studies. In our study, the levels of metabolites formed by IDO1 enzyme activity in the TRP pathway, were examined. In addition, the effects of a polymorphism (IDO1; rs10089084) changing the expression level and activity of TRP pathway enzyme IDO1 on the etiopathogenesis of the disease were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

A total of 114 patients, 44 bladder cancer and 70 healthy controls, were included in the study. Blood was taken from all patients in a tube with EDTA. IDO1 rs10089084 G/C gene polymorphism was analyzed using DNA isolation PCR-RFLP methods. FD-HPLC analysis was performed to measure of TRP and KYN levels. The obtained genotypes and TRP-KYN levels were evaluated by comparing the clinical and pathological parameters of the patients.

RESULTS

There was no significant difference between the genotype distributions of the patient and control groups ($p=0.783$). The KYN and KYN/TRP ratio levels were significantly higher in the patient group ($p=0.001$, $p=0.003$). KYN and KYN/TRP ratio levels were significantly higher ($p=0.0001$, $p=0.04$). In the group carrying the G allele (GG/GC), while KYN and KYN/TRP ratio levels were significantly higher ($p=0,0001, p=0,013$) in the group carrying the C allele (GC/CC). In the patient group, KYN/TRP ratio was found to be significantly higher in the presence of necrosis ($p=0,009$)

CONCLUSION

rs10089084 G/C gene polymorphism in patients with bladder cancer is firstly evaluated in this study and may be a valuable parameter in assessing bladder cancer risk and KYN and KYN/TRP ratio levels may be a biomarker for bladder cancer.

KEYWORDS:

Bladder cancer; IDO; rs10089084



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri (MK), dünya genelinde erkek popülasyonunda en sık teşhis edilen yedinci kanser iken, her iki cinsiyet birlikte değerlendirildiğinde onuncu sıraya düşmektedir (1). Risk faktörleri arasında tütün dumanı, ailede kanser öyküsü, sık mesane enfeksiyonları ve belirli kimyasallara maruz kalma yer alır (2, 3). Mesane kanserinde tedavi seçenekleri tümör evresine bağlıdır ve transüretral rezeksiyon (TUR), intravezikal instilasyon, immünoterapi, kemoterapi, radyoterapi ve radikal cerrahi içerir (4-6). Ayrıca MK'lar içinde kasa invaze olmayan MK ile karşılaştırıldığında, kasa invaze olan tümörler genellikle kötü prognoza sahiptir (7). Bununla birlikte, yüksek tümör nüksü oranları tüm MK hastaları için kritik öneme sahiptir ve klinik bir yüküdür. Artan moleküler onkolojik çalışmalarla MK'nın moleküler mekanizmalarının incelenmesi ile bazı yararlı sonuçlar elde edilmiştir (8, 9).

Ancak MK'nın etiyojisi, patogenezi, MK'nın oluşumu ve gelişimi esnasında etkili genetik ve/veya metabolik moleküllerin etki mekanizmaları ile ilgili daha ileri çalışmalar, MK'nın erken teşhisi ve tedavisi için, kritik biyobelirteçlerin keşfi ve yeni stratejilerin belirlenmesine yardımcı olabilir.

Üriner alanda yapılan metabolomik çalışmalar, MK'da triptofan (TRP) katabolizmasının düzensizliğini ortaya çıkarmıştır (10). Bu çalışmalardan birinde, sağlıklı bireylere kıyasla MK hastalarının serum örneklerinde TRP metabolitinin düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Dolaşımdaki TRP'nin %95'inden fazlası, indoleamin 2,3-dioksijenaz 1 (IDO1) ve triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO) içeren TRP yolu boyunca metabolize edilir. Mesane kanserinde değişen TRP katabolizması yoluna ait metabolit seviyesinin, kanser hücrelerinin immün sistemden kaçması için geliştirdiği bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir (10-13). Kanser hücreleri tarafından üretilen kinürenin (KYN) ve diğer TRP metabolitleri, baskılayıcı T hücrelerinin aktivasyonunu düzenleyerek T hücre bağışıklığını modüle edebilir, böylece kanser hücresinin hayatta kalmasını teşvik edebilirler (14). Bu nedenle bu metabolitleri düzenleyen IDO1 gibi enzimlerin ekspresyon seviyesi hastalığın gelişimi için önemli rol oynar. Lee ve arkadaşlarının 2020'de sağlıklı ve MK olan hasta bireylere ait idrar ve kan örnekleri ile yaptıkları çalışmada, MK hastalarının plazmalarında TRP düzeyinin

önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca hem plazma hem de idrar örneklerinde KYN–TRP oranlarının anlamlı derecede yüksek olduğunu ve insan mesane tümöründe TDO'nun değil de IDO1'in ekspresyon düzeyinin arttığını bildirmişlerdir. Lee ve arkadaşları KYN-TRP oranının, MK için umut verici bir sürveyans biyobelirteç olduğunu öne sürerken, klinik çeviriden önce bu mekanizmayı etkileyen moleküler faktörlerin daha fazla çalışma ile aydınlatılarak doğrulanması gerektiğini de vurgulamışlardır (10).

Bizim çalışmamızda MK'lı ve sağlıklı bireylerin serumlarında TRP yolağında görev alan IDO1 enzim aktivitesi sonrasında oluşan metabolitlerin düzeyleri incelenecektir. Ayrıca TRP yolu enzimlerinden IDO1'in ekspresyon seviyesini ve enzim aktivitesini değiştirebileceği düşünülen bir polimorfizmin (IDO1; rs10089084) hastalığın etiopatogeneze olan etkileri değerlendirilecektir. Elde edilen tüm veriler sonrasında MK'lı hastalarda IDO1 enziminin aktivitesini etkileyebilecek ilgili gene ait polimorfik varyantın ve TRP metabolitlerin düzeyleri saptanarak hastalığın etiopatogeneze bu yolak açısından ışık tutulmuş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MESANENİN NORMAL YAPISI VE GELİŞİMİ

2.1.1. Mesane Embriyolojisi

Gebeliğin dördüncü ve altıncı haftaları arasında, ürorektal septum endodermal kloakayı ventral ürogenital sinüs ve dorsal rektuma ayırır. Ürogenital sinüsün kraniyal kısmı allantois ile devam eder ve mesane ve pelvik üretraya doğru gelişir. Kaudal kısım erkeklerde fallik üretrayı ve kadınlarda distal vajinayı oluşturur. Erkeklerden farklı olarak, kadın üretrasının tamamı ürogenital sinüsün pelvik kısmından kaynaklanır. Allantois, yolk kesesinden ekstraembriyonik bir boşluk olarak gelişir ve gelecekteki mesane olan kloakanın kraniyoventral kısmı ile birleşir. Gebeliğin dördüncü ile beşinci ayı civarında, mesane pelvise inerken allantoik kanal ve ventral kloaka kıvrılır (15).

2.1.2. Mesane Anatomisi

Mesane, idrar için bir rezervuar görevi gören ekstrapéritoneal, içi boş kaslı bir organdır. Mesane boşken minör pelviste bulunur ve dolduğunda abdominal kaviteye uzanır. Çocuklarda mesane abdomende yer alır ve puberteye kadar tam olarak pelvise inmez. Mesane genişleyebilen bir organdır ve tipik olarak 500 mililitreye kadar idrar tutabilir. Pediatrik popülasyonda mesanenin hacmi şu şekilde tahmin edilebilir: $(Yaş + 2) \times 30 \text{ mL}$ (16).

Mesane üreteral orifislerin üzerinde uzanan bir gövde, trigon ve mesane boynundan oluşan bir tabandan oluşur. Nöromorfoloji ve nörofarmakoloji açısından iki alan birbirinden farklı fakat kendi içinde homojendir (17). Mesane tabanı, trigonun altında uzanan yüzeysel uzunlamasına bir tabaka ile laminar bir yapıya sahiptir. Yüzeysel tabakanın derinindeki bir kas tabakası detrusor ile devam etmektedir (18). Mesane tabanındaki derin kas tabakasının daha küçük kas demetleri, ağırlıklı olarak dairesel bir yönelim sergiler. Erkek mesane boynunda tam ve yetkin bir düz kas halkası tanımlanmıştır (19).

Mesane, ekstraperitoneal bölme içinde yer alan anterior pelviste bulunur. Retropubik boşluk olarak da adlandırılan retzius boşluğu, mesaneyi önde pubik kemik ve transversalis fasyasından ayırır ve gevşek areolar dokudan oluşur. Bu boşluğun di-seksiyonu mesane ön duvarına erişim sağlar. Mesane posterior komşuluğunda kadında iç genital organlar (uterus ve vajen), erkekte rektum bulunur. Prostat bezi mesanenin inferior komşuluğunda bulunur. Seminal veziküller ise mesanenin posteroinferior komşuluğunda olan sakküler yapılardır (20). Karın ön duvarını kaplayan pariyetal periton, mesanenin kubbesi üzerinde kıvrılarak periton yansımasını oluşturur ve pelvis ile abdominal kaviteyi etkili bir şekilde ayırır (21).

2.1.2.1. Mesanenin vasküler yapıları: Mesanenin kanlanması internal iliak arterden köken alan süperior vezikal, medial vezikal ve inferior vezikal arter tarafından sağlanır. Ayrıca her iki cinsiyette obturator arterin ve inferior gluteal arterin dalları mesane kanlanmasına katkı sağlar. Ek olarak kadınlarda uterin arter ve vajinal arterin dalları mesane kanlanmasına katkı sağlamaktadır. Venöz drenaj ise mesanenin inferolateralinde bulunan vezikal venöz pleksusun internal iliak vene drene olmasıyla sağlanır (21). Mesanenin lenfatik drenajı eksternal iliak lenf nodlarının iç ve orta kısımları ve internal iliak lenf nodlarına olur. Bazen sakral lenf nodlarına da drenaj olmaktadır. Ancak eksternal iliak lenf nodlarının dış kısmına mesanenin lenfatik drenajı olmamaktadır (22).

2.1.2.2. Mesanenin sinirleri: Alt üriner sistem parasempatik, sempatik ve somatik sinir sistemlerini içeren periferik sinirler tarafından innerve edilir:

- 1) Pelvik parasempatik sinirler (S2-S4): Spinal kordun sakral seviyesinde ortaya çıkar, mesaneyi uyarır ve üretrayı gevşetir. Sakral parasempatik nükleus sakral ara gri maddenin lateral kısmında yer alır. Parasempatik preganglionik nöronlar, aksonları ventral kökler yoluyla periferik ganglionlara gönderir. Parasempatik postganglionik nöronlar, hem pelvik pleksusta hem de detrusor tabakasında da bulunur.
- 2) Lomber sempatik sinirler (T12-L2): Mesane gövdesini inhibe eder ve mesane tabanı ile üretrayı uyarır. Rostral lomber omurilik segmentlerinden sempatik çıkış, mesane ve üretraya nöradrenerjik uyarıcı ve inhibe edici bir girdi sağlar. Periferik sempatik yollar, sempatik zincir gangliyonlardan inferior mezenterik ganglionlara ve

daha sonra hipogastrik sinirler yoluyla pelvik ganglionlara geçen bir yol izler. Simpatik preganglionik nöronlar, inferior mezenterik gangliondaki postganglionik nöronlarla ve ayrıca paravertebral ganglionlar ve pelvik ganglionlardaki postgangliyonik nöronlarla sinaptik olarak bağlanır.

3) Pudental sinirler (S2-S4): Eksternal üretral sfinkteri uyarır. Genellikle Onuf çekirdeği olarak adlandırılan sakral omurilikte ventral boynuzun lateralinde yer alır.

Bu sinirler hem afferent duyu hem de efferent motor sinirlerini içerir (23)

2.1.3. Mesane Histolojisi

Mesane duvarının mikroskopik yapısı, içten dışa doğru aşağıdaki katmanlara ayrılır (24):

- 1) Tunika Mukoza
 - Ürotelyum
 - Lamina Propria
- 2) Tunika Muskularis
- 3) Tunika Adventisya

2.1.3.1. Tunika mukoza: Mesanenin mukozası ürotelyum ve altındaki lamina propriadan oluşur (25).

2.1.3.1.1. Ürotelyum: Mesane epitel, çok katlı değişici epitel olan ürotelyumdur. Gevşemiş bir idrar kesesinde ürotelyum beş veya yedi kat kalınlığındadır. Mesane idrarla dolduğunda, mesane duvarı artan hacmi karşılamak için gerilir. Şişmiş mesanede, ürotelyum yapısal bir hasar olmaksızın iki veya üç tabaka halinde yeniden düzenlenir. Ürotelyumun bu geçiş yeteneği nedeniyle geçiş epiteli olarak da bilinir (24). Üç tabakadan oluşur:

- a) Apikal Tabaka
- b) Ara Tabaka
- c) Bazal Tabaka

2.1.3.1.1.a. Apikal tabaka: En içteki tabakadır. Sıklıkla iki çekirdekli olan tek bir şemsiye şeklindeki hücreler tabakasıdır (şemsiye hücreler) (24). Mesane dolduğunda şemsiye hücreleri gerilir ve düzleşir; oysa mesane boşken hücreler küboidaldir (26). Şemsiye hücrelerinin lümene bakan zarının yaklaşık %90'ı, hücrelere "taraklı" bir görünüm veren plaklarla kaplıdır. Plaklar, iç yaprakçıktan daha kalın olan ve asimetriye neden olan bir membran dış yaprakçığa sahiptir. Böylece plak bölgesi aynı zamanda asimmetrik birim membran olarak da adlandırılır. Plaklar arasındaki alanlar, dış ve iç yaprakçık kalınlığı açısından simetriktir; bu alana menteşe bölgesi denir (27). Plaklar, şemsiye hücreler arasındaki parasellüler akışı azaltan sıkı bağlantı proteinlerinin yanı sıra ek bariyer işlevi sağlayan altıgen şekilli makromoleküler yapılar oluşturan üroplakinlerden oluşur (24, 27).

2.1.3.1.1.b. Ara tabaka: Genellikle iki veya üç kat poligonal hücre tabakasından oluşur (24). Ara tabakadaki hücre sayısı mesane dolumuyla birlikte bir hücre kalınlığına kadar incelebilirken, mesanede idrar yokken 5-6 hücre kalınlığına kadar çıkabilir. Bazal tabaka hücreleri ile kıyaslandığında daha büyük boyuttadırlar ve çekirdekleri oval şekildedir (28).

2.1.3.1.1.c. Bazal tabaka: İki veya üç kat küçük kübik veya prizmatik hücre tabakasından oluşur (24, 28).

2.1.3.1.2. Lamina propria: Lamina propria, ürotelyumun bazal membranı ile kas tabakası arasında uzanır ve fibroblastlar, adipositler, interstisyel hücreler ile afferent ve efferent sinir uçları dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerini içeren hücre dışı bir matriksten oluşur. Ek olarak, zengin bir damar ağı, lenfatik damarlar, elastik lifler ve düz kas fasikülleri içerir (29-32). Lamina propria yapısı trigonda bulunmaz ve bundan dolayı mukoza kas tabakası ile direk bağlantılıdır. Bu da trigonun her zaman düz kalmasını sağlar (33). Andersson ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu araştırmalar sonucunda lamina proprianın mesanenin lokalize fonksiyonel merkezi olduğu teorisi ortaya atılmıştır. Detrusor ve düz kas yapılarının koordinasyon merkezi olarak görülmektedir. Mesanenin kapasitans tabakası olduğu, mesane kompliansını belirlediği ve artan hacimlere adaptif değişiklikler sağladığı öne sürülmüştür (34).

2.1.3.2. Tunika Muskularis: Mesane kas yapısı belirli bir düzene bağlı kalmaksızın her yöne uzanan kas liflerinden oluşmuştur. Detrusor olarak adlandırılan bu yapı ancak mesane boynunda belirgin üç tabaka oluşturur. Mesane boynuna yaklaştıkça iç ve dışta longitudinal, ortada sirküler ve dışta longitudinal tabaka oluşturur. İç longitudinal tabaka longitudinal olarak, dış longitudinal tabaka ise sirküler ve spiral şekle dönüşerek kadında üretranın eksternal meatusuna, erkekte prostatik üretranın distaline kadar uzanır ve kısmen prostatın yapısına katılır. Orta sirküler tabaka mesane boynunda ve özellikle önde yoğunlaşır ve üretraya uzanmaz. Bu lifler yelpaze şeklinde açılarak önce yanlara ve sonra arkaya dönerler, derin trigonun dorsal ve lateral bölümüne katılırlar (33).

Mesane düz kaslarında mikroskop altında görülebilen çapraz çizgiler yoktur. Her detrusor düz kas hücresi tek bir çekirdek içerir. Mesane duvarındaki bireysel düz kas hücreleri, merkezi bir çekirdeğe sahip küçük iğ şeklindeki hücrelerdir; tamamen gevşemiş halde, birkaç yüz mikrometre uzunluğunda ve maksimum 5-6 mikron çapındadırlar. Düz kasın hücre zarları, kaveola içerir ve hücre içi sarkoplazmik retikulumun elemanları genellikle kaveola ile ilişkilidir (35).

2.1.3.3. Tunika Adventisya: Mesaneyle beraber diğer pelvik organların en dış tabakasını örten seroza (adventisya), kollajen ve birkaç elastik kas liflerinden oluşur. İçinde kan damarları, sinirler ve ganglionlar bulunur. Bu gerçek bir seroza yapısında değildir (33).

2.2. MESANE KANSERİ

2.2.1. Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patoloji

2.2.1.1. Epidemiyoloji: Mesane kanseri, dünya çapında erkek popülasyonunda en sık teşhis edilen yedinci kanser iken, her iki cinsiyet dikkate alındığında onuncu sıraya geriliyor. Tüm dünyada insidansı (100000 kişi/yıl) erkeklerde 9.5 ve kadınlarda 2.4'tür. Avrupa kıtasında insidansı erkekler için 20 ve kadınlar için 4,6'dır. Dünya çapında, MK mortalite oranı erkekler için 3,3 iken kadınlar için 0,86'dır (1). Türkiye'de insidansı erkekler için 22,9 ve kadınlar için 3,1'dir. Türkiye'de mortalite oranı erkekler için 11,9 ve kadınlar için 3,3'tür (36).

Mesane kanseri insidansı ve mortalite oranları, risk faktörlerindeki farklılıklar, tanısal yöntemlerin gelişmişliğine ve ulaşılabilirliğine bağlı olarak dünya genelinde farklılık yaratmaktadır (37, 38). Sigara içimi, belirli meslek gruplarında kimyasal maruziyeti, içme suyunda arsenik mevcudiyeti, schistosoma haematobium'un neden olduğu kronik üriner enfeksiyonlar gibi risk faktörleri bölgesel farklılık göstermektedir (38). Bazı bölgelerde mesane kanseri gelişmesine yol açan ajanların kullanımına karşı alınan önlemler kanser insidansı ve mortalite hızında azalmayı sağlamıştır (39).

Mesane kanseri tanısı alan hastaların yaklaşık %75'inde hastalık mukoza (Ta, karsinoma in situ (CIS)) veya submukoza (T1) ile sınırlıdır; 40 yaşından küçük hastalarda bu oran daha da yükselmektedir (40). TaT1 ve CIS tanısı alan hastalar uzun sağ kalım süreleri sayesinde daha yüksek prevalansa sahip olmakla birlikte T2-4 tümörlerle karşılaştırıldığında kanser spesifik mortalite oranları da düşüktür (1, 36).

2.2.1.2. Etiyoloji: Yaşam boyu MK riski erkeklerde yaklaşık %1,1 ve kadınlarda %0,27'dir (41). İleri yaş, MK için en büyük risk faktörüdür ve ortalama tanı yaşı 70 ile 84 arasındadır (42). Genetik faktörler bugüne kadar yapılan çalışmalarda MK insidansının yalnızca %7 kadarını açıklayabildi (43). Bu nedenle yaşam tarzı, çevresel ve mesleki maruziyetle ilgili risk faktörlerinin MK gelişiminde potansiyel olarak önemli bir rol aldığı düşünüldü. Yıllar içerisinde birçok risk faktörü üzerinden durulsa da günümüzde edinilen bilgiler doğrultusunda iyi bilinen risk faktörleri; tütün tüketimi, aromatik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi mesleki maruziyete yol açan kimyasallar ve kronik üriner sistem enfeksiyonuna yol açan bakteriyel ve schistosoma haematobium enfeksiyonudur (37). Diğer risk faktörlerine bakacak olursak; alkol tüketimi, kahve alımı, az meyve ve sebze tüketimi, düşük selenyum ve E vitamini alımı, içme suyunun kirlenmesi ve çeşitli tıbbi tedavilerdir (37, 44).

2.2.1.2.1. Sigara: Tütün dumanı maruziyeti, MK için en yaygın risk faktörüdür. Vakaların yaklaşık %50'sinde maruziyet olduğu gösterilmiştir (37, 45). Tütün,

sigara, puro, pipo, nargile, çiğneme, enfiye olarak soluma gibi çeşitli şekillerde tüketilebilmekte ve tek başına ya da afyon ve esrar gibi yasa dışı uyuşturucularla kombinasyon halinde kullanılabilir (46).

Tütün ilişki hastalık riski sigara içme süresi ve sigara içme yoğunluğuna göre değişir. Sigara içme yoğunluğundaki artış idrar yollarında daha çok nitrozamin, bifenil ve arilamin birikmesine yol açarak daha kanserojen etkiye yol açar (47). N-asetiltransferaz 2 (NAT2) ve glutatyon S-transferaz mü 1 (GSTM1) kanserojen maddelerin detoksifikasyonunda görevlidir. NAT2 ve GSTM1 polimorfizmleri nedeniyle aktivitelerindeki değişikliklerin sigaradan kaynaklanan kanser riskini etkilediği bilinmektedir (37, 46). Bu polimorfizmler nedeniyle yavaş asetilasyon olan bireylerde kanserojenlerin daha az detoksifiye edilmesi ürotelyum daha fazla maruziyete yol açar. Yavaş asetilasyon olan bireylerde MK gelişiminin %50'ye kadar daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu risk artışının tütün maruziyeti olan bireylerde olduğuna dair fikir birliği vardır (48).

İlk maruz kalma yaşı, MK riski ile negatif ilişkilidir. Günde 15'ten fazla sigara içildiğinde, artan sigara içme yoğunluğunun MK riski üzerindeki ek etkisinin daha az olduğu görülmektedir. Belki de şaşırtıcı bir şekilde, çok sigara içenler, daha az sigara içenlerle karşılaştırıldığında belirgin şekilde artmış bir risk yaşamazlar. Paket-yılı için benzer bir ilişki gözlenir, ancak yaklaşık 50 paket-yılında bir risk platosu vardır (2). Sigarayı bırakma, her iki cinsiyette de azalmış MK riski ile ilişkilendirilmiştir (45). Ancak 10-20 yıl öncesi kadar sigara içmiş olmanın MK riskini anlamlı oranda azaltmadığı gösterilmiştir. 20 yıldan uzun zaman önce sigara bırakılmış olsa dahi hiç sigara içmemiş kişilere göre MK riski %50 daha fazladır (2, 45).

2.2.1.2.2. Mesleki maruziyet: 1950'lere kadar boya ve kauçuk işçilerinin yaşadığı artan riskten büyük ölçüde benzidin ve naftilamin gibi kimyasal maddeler sorumlu görülüyordu (3, 49). Son zamanlarda artan MK riski ile ilişkili bulunan diğer maddeler arasında polisiklik aromatik hidrokarbonlar, petrol ürünleri, metal, dizel egzozları ve boya maddeleri yer alır (37, 39, 50-53). Bu tür kimyasal maddelere maruz kalma, cilt tarafından emilme veya akciğerler tarafından solunma yoluyla mey-

dana gelebilir. Vücutta işlendikten sonra, bu tür kimyasal maddeler mesanede birikebilir ve kanserojen süreçleri tetikleyebilir. Bununla birlikte, MK'nın mesleki etiyo-jisine ilişkin araştırmalar, yalnızca polisiklik aromatik hidrokarbonlar, dizel egzozla-rına, boya maddelerine ve diğer potansiyel kanserojen maddelere mesleki maruziye-tin devam etmesi nedeniyle değil, aynı zamanda 10-20 yıl önce kanserojen madde-lere maruz kalan işçilerin MK gelişimindeki uzun latent periyot nedeniyle bugün MK gelişme risklerinin devam edebileceği düşünülmesinden dolayı devam etmektedir.

Bu bilgiler eşliğinde yapılan çalışmalarda madenciler, şoförler, lastik işçileri, motor tamircileri, deri işçileri, demirciler, makine kurucuları, kuaförler, boyacılar ve tamircilerde MK insidansında artış anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. Maruziyete se-bep olan meslek gruplarında çalışan kişilerde tütün ürünleri maruziyeti ile MK geli-şimi arasında anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Bu meslek gruplarına bakacak olur-sak; boyacılar, camcılar, madenciler, fırıncılar, çamaşırcılar, ahşap işçileridir (3). Ta-rım işçilerinde MK gelişme riskinde azalma gözlenmiştir (47).

2.2.1.2.3. Genetik: N-asetil-transferaz 2 ve GSTM1 polimorfizmleri nede-niyle aktivitelerindeki değişikliklerin sigaradan kaynaklanan kanser riskini etkilediği bilinmektedir (37, 46). Bu polimorfizmler nedeniyle yavaş asetilasyon olan birey-lerde kanserojenlerin daha az detoksifiye edilmesi, ürotelyumun daha fazla maruzi-yetine yol açar. Yavaş asetilasyon olan bireylerde MK gelişiminin %50'ye kadar daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu risk artışının tütün maruziyeti olan bireylerde olduğuna dair fikir birliği vardır (48). Fibroblast büyüme faktör reseptörü-3 (FGFR3) mutasyonu gözleendiği durumlarda da artmış MK riski gösterilmiştir. FGFR3 mutas-yonu varlığında sıklıkla düşük dereceli, invaziv olmayan tümörler gözleendiği bildiril-miştir (54, 55).

Aile öyküsünün çok az etkisi var gibi görünse de (56) bugüne kadar MK için herhangi bir genetik varyasyonun açık bir önemi gösterilmemiştir. Genetik yatkınlı-ğın, diğer risk faktörlerine duyarlılık üzerindeki etkisi yoluyla MK insidansı üzerinde etkisi vardır (37, 57, 58). Birinci ve ikinci derece akrabalarda MK için artan risk be-lirtilmiştir (59).

2.2.1.2.4. Medikal tedaviler ve enfeksiyonlar: İyonize radyasyon tedavisi ve medikal tedavilerden siklofosfamid ve pioglitazonda MK gelişme riskinin artmış olduğu saptanmıştır (37, 60, 61). Parazitik bir trematod ile tekrarlayan enfeksiyona dayanan kronik endemik bir sistit olan şistozomiyazis de MK'nın bir nedenidir (37). Kronik üriner retansiyon ve buna sekonder gelişen üst sistem dilatasyonu ürotelyumun karsinojen maruziyetinin artmasına neden olur ve oluşan kronik inflamasyonla ilişkili karsinogenez artar. Bu durumlarda da artmış MK riski gözlenmektedir (37, 62).

2.2.1.2.5. Diyet faktörü ve çevre kirliliği: Su içme alışkanlığının MK gelişmesi üzerindeki etkisi belirsiz olsa da, içme suyunun klorlanması ve sonrasında ortaya çıkan trihalometan seviyelerinin potansiyel kanserojen olduğu ve su içme alışkanlığı ile MK gelişme riskinin ters ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca içme suyundan kaynaklanan arsenik maruziyeti de MK riskini arttırmaktadır (37, 60).

Kahvenin olası bir kanserojen olduğu öne sürülse de yapılan vaka-kontrol çalışmasında MK gelişme riskinde ılımlı bir artış bulunmuş olup bu artış sigara tüketimiyle ilişkilendirilmiştir (63).

Diyet alışkanlıklarının sınırlı bir etkisi var gibi görünmektedir, son zamanlarda flavonoidlerin koruyucu etkisi önerilmiştir ve yüksek sebze ve doymamış yağ (zeytinyağı) tüketimi ve ölçülü protein tüketimi ile karakterize edilen bir akdeniz diyeti MK riskinde bir miktar azalmayla ilişkilendirilmiştir (64, 65). Meyve tüketiminde artışın MK riskini azalttığı öne sürülmüş olsa da bugüne kadar yapılan çalışmalarda bu etkinin sadece kadınlarda önemli olduğu gösterilmiştir (66).

2.2.1.3. Patoloji: Mesane kanserinin alt tipleri incelendiğinde, bunların %90'ının ürotelyal karsinomlar olduğu görülmektedir. Diğer alt tiplere bakıldığında %5-6 oranında skuamöz karsinom, %1-2 oranında adenokarsinom, %1-2 oranında andiferansiye ve mikst tümörler karşımıza çıkmaktadır (67, 68).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2016 yılında yayınlanan mesane kanseri sınıflaması Tablo 1'de verilmiştir:

Tablo 2.1. DSÖ mesane tümörü sınıflaması

Ürotelyal Tümörler	Müllerian tip tümörler
İnfiltratif Ürotelyal Karsinom	Berrak hücreli karsinom
Nested	Endometroid karsinom
Mikrokistik	Nöroendokrin tümörler
Mikropapiller	Küçük hücreli nöroendokrin karsinom
Plazmasitoid	Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
Sarkomatoid	İyi diferansiye nöroendokrin tümör
Dev hücreli	Paraganglioma
Kötü diferansiye	Melanositik tümörler
Yağdan zengin	Malign melanom
Berrak hücreli	Nevüs
İnvaziv olmayan ürotelyal neoplazm	Melanozis
Karsinoma in situ	Mezenkimal tümörler
Non-invaziv papiller ürotelyal karsinom, düşük dereceli	Rabdomyosarkom
Non-invaziv papiller ürotelyal karsinom, yüksek dereceli	Leiomyosarkom
Düşük malign potansiyelli papiller ürotelyal karsinom	Anjiosarkom
Ürotelyal papillom	İnflamatuvar myofibroblastik tümör
Inverted ürotelyal papillom	Perivasküler epiteloïd hücreli tümör
Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon	Benign
Ürotelyal diplazi	Malign
Skumöz hücreli neoplazi	Soliter fibröz tümör
Saf skumöz hücreli karsinom	Leiomyom
Verrükoz karsinom	Hemanjiom
Skumöz hücreli papillom	Granüler hücreli tümör
Glanduler neoplazi	Nörofibrom
Adenokarsinom	Ürotelyal trakt hematopoetik ve lenfoid tümörler
Enterik	Nadir gözlenen tümörler
Musinöz	Skene, Cowper ve Littre bezlerinin karsinomları
Mikst	Diğer organlardan kaynaklı tümörlerin yayılımları ve metas- tazları
Villöz adenom	Üst üriner sistemde epitelyal tümörler
Urakal karsinom	Mesane divertikülünden kaynaklanan tümörler
	Üretranın ürotelyal tümörleri

2.2.2. Tanı Yöntemleri

Mesane kanserinin en sık belirtisi ağrısız makroskopik hematüridir. Ama bazı hastalarda izole mikroskopik hematüri (idrar analizinde 3'den fazla kırmızı kan hücresinin gözlenmesi) ile ortaya çıkabilir. İrritatif işeme semptomlarının araştırılması sırasında veya başka nedenlerle yapılan görüntülemelerde insidental olarak saptanabilir (69, 70).

Mesane kanseri prevalansı makroskopik hematüri ile başvuran hastalarda %10-20 arasında, mikroskopik hematüri ile başvuran hastalarda %3-5 arasında değişmektedir (71-73). Mikroskopik hematüri hastalarda MK insidansının çok daha düşük olduğu ve tüm mikroskopik hematüri hastaların yaklaşık %18'inin benign nedenlere sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle mikroskopik hematüri ile başvuran her hastaya ileri inceleme yapılması tartışmalıdır (69). Amerikan Üroloji Derneği (AUA)'nin hazırlamış olduğu risk sınıflaması ileri incelemenin hangi koşullarda yapılması gerektiği konusunda bilgilendirmektedir (Tablo 2 ve Tablo 3) (73).

Tablo 2.2. AUA Mikroskopik Hematüri Risk Sınıflandırma Sistemi

Düşük risk (tüm kriterler sağlanmalı)	Orta risk (kriterlerden 1 tanesini sağlamalı)	Yüksek risk (kriterlerden 1 tanesini sağlamalı)
Kadın <50 y; erkek <40 y	Kadın 50-59 y; erkek 40-59 y	Kadın ya da erkek >60 y
Sigara içmemiş ya da <10 paket yılı öyküsü	10-30 paket yılı sigara öyküsü	>30 paket yılı sigara öyküsü
Tek idrar analizinde 3-10 eritrosit	Tek idrar analizinde 11-25 eritrosit ya da tekrarlayan 3-10 eritrosit	Tek idrar analizinde >25 eritrosit
Risk faktörü olmamalı (bkz. Tablo 3)	Ek risk faktörü varlığı (bkz. Tablo 3)	Makroskopik hematüri öyküsü

Tablo 2.3. Ek risk faktörleri

Mikroskopik Hematüri Risk Sınıflandırmasına Dahil Edilen Ek Risk Faktörleri (AUA Mikroskopik hematüri Kılavuzundan uyarlanmıştır)
İrritatif alt üriner sistem semptomları
Pelvik radyoterapi öyküsü
Siklofosfamid/ifosfamid kemoterapi öyküsü
Ailede ürotelyal karsinom ya da Lynch sendromu öyküsü
Mesleki maruziyet
İdrar yollarında kronik kalıcı yabancı cisim

Düşük risk saptanan hastalara 6 ay içerisinde tekrar idrar analizi yapılarak tekrar sınıflandırılması gerekiyor. Orta risk saptanan grupta sistoskopi ve üst sistem taraması amaçlı renal ultrasonografik (USG) inceleme öneriliyor. Yüksek risk saptanan grupta sistoskopi ve hastanın mevcut durumuna göre bilgisayarlı tomografi (BT) ürografi veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ürografi planlanabilir. Eğer her ikiside kontrendike ise renal USG ve retrograd piyelografi planlanabilir. Makroskopik hematüri varlığında yüksek riskli mikroskopik hematüri gibi yaklaşım planlanabilir (73).

2.2.2.1. Sistoskopi: Fleksibl bir sistoskop kullanılarak yapılan beyaz ışık sistoskopisi mesane kanserinde altın standart tanı yöntemidir. Beyaz ışık sistoskopisinin papiller mesane tümörü saptama duyarlılığı ve özgüllüğü %62 ila %84 ve %43 ila %98 aralığındadır (69). Küçük papiller lezyonlar ve KİS için duyarlılığı azalır (74).

Dar bant görüntüleme ve mavi ışık teknolojisi endoskopik rezeksiyon sırasında mesane tümörlerini belirlemek için gelişmiş hassasiyet ve özgüllük sunar (70). Dar bant görüntüleme tümör saptama oranını artırır (hasta başına ve lezyon başına sırasıyla yaklaşık %10 ve %20). Bu durum da 3. ve 12. ayda yapılan sistoskopik incelemelerde nüks saptanma riskini azaltır (75).

2.2.2.2. Görüntüleme yöntemleri: Görüntüleme, MK'nın hem ilk teşhisinin hem de evrelemesinin önemli bir parçasıdır (69). Makroskopik hematürisi ve yüksek riskli mikroskopik hematürisi olan hastalarda üst sistem görüntüleme amacıyla BT ürografi veya MRG ürografi gibi kesitsel görüntülemeler önerilirken düşük ve orta riskli mikroskopik hematürisi olan hastalarda renal USG önerilmektedir (70).

2018 yılında prostat kanseri için geliştirilen PIRADS (prostate imaging-reporting and data system) protokolüne benzer olan VIRADS (vesical imaging-reporting and data system) protokolü geliştirildi. Genel puan 1 ile 5 arasında değişir; VIRADS 1 muskularis propria invazyonu olmadığını ve tümör infiltrasyonu olmadığını ve VIRADS 5 tümörün ekstrasvezikal yayılımını gösterir. VIRADS 1 ve 2 daha çok kasa invaze olmayan mesane kanserinin göstergesidir. Oysa VI-RADS 4 ve 5 kasa invaze hastalığı veya ekstrasvezikal yayılımı düşündürür. VIRADS 3, PIRADS 3 gibi, kas invazyonu için belirsizdir (76). Yapılan validasyon çalışmaları gösteriyor ki kasa invaze olmayan tümörler ve kasa invaze olan tümörlerde sırasıyla sensitivitesi %76 ve %95, spesifitesi ise %44 ve %93'tür (77).

FDG PET (pozitron emisyon tomografi)/BT, kasa invaze MK'nın birincil evrelemesinde ve radikal sistektomi sonrası nüksün saptanmasında giderek daha fazla kullanılmaktadır. Az sayıda çalışma neo-adjuvan, indüksiyon kemoterapisi veya immunoterapinin yanıt değerlendirmesi için FDG PET/BT kullanmıştır (78).

2.2.2.3. Sitoloji: Eksfoliyat kanser hücrelerinin idrar veya mesane yıkama örneklerinin incelenmesi sonucunda elde edilir. Yüksek dereceli (HG) ve G3 tümörlerde yüksek duyarlılığa (%84) sahip olmasına rağmen düşük dereceli (LG)/G1 tümörlerinde düşük duyarlılığa (%16) sahiptir (79,80). Karsinoma in situ tespitindeki hassasiyet %28–100'dür (81). Sitoloji, özellikle HG/G3 tümörlü hastalarda sistoskopiye ek olarak faydalıdır. Pozitif idrar sitolojisi, idrar yolunun herhangi bir yerinde bir ürotelyal karsinomu gösterebilir. Ancak negatif sitoloji, varlığını dışlamaz (80, 81).

2016'da yayınlanan Paris Sistemi olarak bilinen standartlaştırılmış bir raporlama sistemi, üriner sitoloji tanı kategorilerini şu şekilde yeniden tanımlamıştır (82):

- Yeterli tanı mümkün değil (Tanı yok);
- Ürotelyal karsinom için negatif (Negatif);
- Atipik ürotelyal hücreler (Atipi);
- HG ürotelyal karsinom için şüpheli (Şüpheli);
- HG/G3 ürotelyal karsinom (Malign).

2.2.2.4. Biyobelirteçler: Sitolojinin dezavantajlarının üstesinden gelmek için tasarlanmış, United States Food and Drug Administration (US FDA) tarafından onaylanmış birkaç idrar bazlı tümör belirteci mevcuttur (69). Bu belirteçler temel olarak RNA, proteinler, tümörle ilişkili DNA metilasyon değişiklikleri veya hücresel belirteçler gibi tümörle ilgili materyallere dayanır (83). US FDA tarafından onaylanmış biyobelirteçler Tablo 4’te verilmiştir (69).

Tablo 2.4. US FDA tarafından onaylanmış idrar biyobelirteçleri

	Sensitivite (%)	Spesifite (%)
BTA stat	57-83	60-92
BTA TRAK	66	65
Cxbladder	81	85
NMP 22 ELISA	47-100	78
NMP 22 BladderCheck	47-100	78
uCyst	50-100	69-79
UroVysion	41-70	80

BTA: bladder tumor-associated antigen; ELISA: enzim linked immunosorbent assay; NMP: nuclear matrix protein

2.2.3. Evreleme

Union International Contre le Cancer (UICC) tarafından düzenlenen TNM sınıflandırması 2017 yılında güncellendi (8. Edisyon) (Tablo 5).

Tablo 2.5. Mesane kanserinin 2017 TNM sınıflandırması

T – Primer tümör	
TX	Primer tümör değerlendirilemez
T0	Primer tümör kanıtı yok
Ta	İnvaziv olmayan papiller karsinom
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör subepitelyal bağ dokusunu invaze eder
T2	Tümör kas tabakasına invaze T2a Tümör yüzeysel kası invaze eder T2b Tümör derin kası invaze eder
T3	Tümör perivezikal dokuyu invaze eder T3a Mikroskopik olarak T3b Makroskopik olarak
T4	Tümör aşağıdakilerden herhangi birini invaze etmiş: prostat stroması, seminal veziküller, uterus, vajina, pelvik duvar, karın ön duvar T4a Tümör prostat stromasını, seminal vezikülleri, uterusu veya vajinayı invaze eder T4b Tümör pelvik duvarı veya karın ön duvarını invaze eder
N – Bölgesel lenf düğümleri	
NX	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Gerçek pelviste tek bir lenf nodunda metastaz -hipogastrik, obturator, eksternal iliak veya presakral-
N2	Gerçek pelviste çok sayıda bölgesel lenf düğümlerinde metastaz -hipogastrik, obturator, eksternal iliak,veya presakral-
N3	Ortak iliak lenf nodlarında metastaz
M – Uzak metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var M1a Bölgesel olmayan lenf düğümleri M1b Diğer uzak metastazlar

Karsinoma in situ yüzeyden kabarık olmayan, HG, invazif olmayan bir ürotelyal karsinomdur. Biyopsi yapılmadığı takdirde sistoskopi sırasında gözden kaçabilir veya inflamatuvar bir lezyon olarak yanlış yorumlanabilir. Genellikle multifokaldır ve sıklıkla mesanede izlense de aynı zamanda üst üriner sistemde ve prostatik üretrada meydana gelebilir(84). Klinik açıdan CIS şu şekilde sınıflandırılabilir:

- Primer: önceden veya eşzamanlı papiller tümörü olmayan ve önceden CIS olmayan izole CIS;
- Sekonder: Daha önce CIS olmayan bir tümörü olan hastaların takibi sırasında CIS saptanması;
- Eş zamanlı: Mesanede başka herhangi bir ürotelyal tümörün varlığında CIS.

Mesane kanseri olgularının yaklaşık olarak %70-80'ini kasa invaze olmayan mesane kanseri (KİOMK) oluşturur. Bunların yaklaşık olarak %10-20'sinde TUR ve intravezikal tedavilere rağmen progresyon olur. Kasa invaze MK daha agresif bir hastalık olup lokalize ve metastazlı hastalarda sırasıyla %60 ve %10 5 yıllık genel sağkalım oranları ile ilişkilidir. Kasa invaze MK'lı hastalarda radikal sistektomi, kemo-radyoterapi tedavileri uygulanmaktadır (85).

2.2.4. Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanseri Risk Grupları

EORTC (European Organizations for Research and Treatment of Cancer) tarafından 2006 yılında, MK hastalarında, kısa ve uzun dönem hastalığın rekürrens ve progresyonu öngörebilmek için bir risk ve skorlama sistemi yayınlandı. Skorlama sistemi (Tablo 6) tedavi edilen hastalardaki en önemli 6 klinik ve patolojik faktöre dayanmaktadır (86):

- Tümör sayısı;
- Tümör çapı;
- Nüks sayısı;
- T kategorisi;
- KİS varlığı;
- Tümör derecesi.

Tablo 2.6. EORTC risk tablosu

Faktör		Rekürrens	Progresyon
Tümör Sayısı	Tek	0	0
	2-7	3	3
	8'den fazla	6	3
Tümör Boyutu	< 3 cm	0	0
	≥ 3 cm	3	3
Nüks Sayısı	Primer	0	0
	≤ 1 nüks/yıl	2	2
	>1 nüks/yıl	4	2
T evresi	Ta	0	0
	T1	1	4
CIS varlığı	Yok	0	0
	Var	1	6
Tümör Derecesi	G1	0	0
	G2	1	0
	G3	2	5
Total Skor		0-17	0-23

CIS: karsinoma in situ

Rekürrens ve progresyon puanları hesaplandıkta sonra aşağıdaki tablolarda (Tablo 7 ve 8) 1 yıllık ve 5 yıllık takiplerde progresyon ve rekürrens oranları belirtilmiştir (86).

Tablo 2.7. EORTC rekürrens risk oranı

Rekürrens skoru	1 yıllık takipte rekürrens oranı	5 yıllık takipte rekürrens oranı
0	15%	31%
1-4	24%	46%
5-9	38%	62%
10-17	61%	78%

Tablo 2.8. EORTC progresyon risk oranı

Progresyon skoru	1 yıllık takipte progresyon oranı	5 yıllık takipte progresyon oranı
0	0.2%	0.8%
2-6	1%	6%
7-13	5%	17%
14-23	17%	45%

Avrupa Üroloji Derneği (EAU) DSÖ 2004/2016 veya DSÖ 1973 sınıflandırma sistemlerine dayalı olarak yüzeyel MK'da prognostik risk gruplarını güncelledi (Tablo 9). Bu risk tablosu oluşturulurken ek klinik risk faktörleri de dahil edildi (87):

- >70 yaş,
- Multipl papiller tümör,
- Tümör çapının 3 cm'den büyük olması.

Tablo 2.9. Avrupa Üroloji Derneği yüzeyel mesane kanseri prognostik risk sınıflaması

Risk Grupları:	
Düşük Risk	Primer, tek odak, TaT1 LG/G1, <3cm çapında, CIS yok, ≤70 yaş
	Primer, Ta LG/G1, CIS yok, bir risk faktörü varlığı
Orta Risk	CIS eşlik etmediği; düşük, yüksek ve çok yüksek risk grubuna dahil olmayan hastalar
Yüksek Risk	CIS olmayan Tüm T1 HG/G3, çok yüksek risk grubunu dışla
	CIS olan tüm hastalar, çok yüksek risk grubunu dışla
	Ta LG/G2 ya da T1 G1, CIS yok, 3 risk faktörü ile birlikte Ta HG/G3 ya da T1 LG, CIS yok, 2 risk faktörü ile birlikte T1 G2, CIS yok, 1 risk faktörü ile birlikte
Çok Yüksek Risk	Ta HG/G3, CIS mevcut, 3 risk faktörü ile birlikte T1 G2, CIS mevcut, en az 2 risk faktörü ile birlikte T1 HG/G3, CIS mevcut, en az 1 risk faktörü ile birlikte T1 HG/G3, CIS yok, 3 risk faktörü ile birlikte

LG: düşük dereceli, CIS: karsinoma in situ, HG: yüksek dereceli.

Prostatik üretrada CIS varlığı, ürotelyal karsinom alt tipleri veya lenfovasküler invazyonu olan tüm hastalar çok yüksek risk grubuna dahil edilmelidir. Nüks tümörlü hastalar, diğer prognostik faktörlerine göre orta, yüksek veya çok yüksek risk gruplarına dahil edilmelidir (86).

2.2.5 Risk Gruplarına Göre Tedavi Seçenekleri

2.2.5.1. Düşük Riskli KİOMK: Düşük riskli ve EORTC risk skoru <5 olan hasta grubunda tümöre rezeksiyonu sonrasında ilk 24 saat içerisinde uygulanan tek doz instilasyon kemoterapisinin rezidüel tümör dokuları üzerinde ablatif özelliği gösterilmiştir. Bu uygulanan doz ile hastalığın 5 yıllık takipte rekürrens oranını %46'dan %14'e kadar düşürdüğü gözlenmiştir (67, 88, 89). Bu kemoterapi tedavilerinde epirubisin ve mitomisin c'nin başarı oranları benzer olarak saptanmıştır (79).

2.2.5.2 Orta Riskli KİOMK: Bu grupta tek doz intravezikal kemoterapi instilasyonu alsın ya da almasın adjuvan olarak intravezikal kemoterapi veya Bacillus Calmette-Guerin (BCG) tedavilerinden herhangi birinin uygulanması önerilmektedir. Tavsiye edilen kemoterapi instilasyon tedavi süresi en fazla 1 yıllık uygulama olarak önerilmektedir. BCG tedavisinin ise 6 doz indüksiyon sonrasında 1 yıla tamamlanacak şekilde 3,6 ve 12. aylarda 3 haftalık idame tedavisi verilmesi önerilmektedir. Tedavi seçiminde hastaların bireysel özelliklerinin yanı sıra hastalık süreci yani rekürrens ve progresyon riski göz önüne alarak tercih edilmelidir (67).

2.2.5.3 Yüksek Riskli KİOMK: Bu hasta grubunda en fazla fayda gördüğü düşünülen tedavi modalitesi intravezikal BCG uygulamasıdır. Tedaviye operasyon sonrasında en erken 2 hafta en geç ise 6 hafta sonra başlanması önerilir. Tedavinin uygulama takvimi açısından henüz fikir birliği oluşmamakla birlikte bununla ilgili çalışmalar sürmektedir. Ancak 6 doz indüksiyon tedavisinin bu grupta yetersiz olduğu gösterilmiştir (67, 89). Progresyon ve rekürrens riski yüksek olan grupta tedavi takviminin 3 yıla tamamlanması (6 doz indüksiyon sonrasında 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36. Aylarda 3 doz idame verilmelidir.) önerilmektedir. Eğer tedavi sırasında progresyon ya da erken dönemde yüksek riskli rekürrens saptanırsa bu hasta grubuna radikal sistektomi önerilmelidir (67).

2.2.5.4 Çok Yüksek Riskli KİOMK: Bu hasta grubunda progresyon riski 2021 EAU KİOMK puanlama modeline göre %53,1 gibi yüksek bir düzeyde tespit edilmiştir. Bu hasta grubu ile en hızlı şekilde radikal sistektomi yapılması tartışılmalıdır. Eğer ki hastanın komorbiditeleri nedeniyle cerrahiyi uygulamak mümkün değil veya hasta cerrahiyi reddediyorsa o zaman intravezikal tedaviler düşünülmelidir. Bu hasta grubuna 1 ila 3 yıl boyunca tam doz intravezikal BCG tedavisi önerilmelidir (67).

2.3. TRİPTOFAN METABOLİZMASI

Triptofan ilk olarak kazein proteininden Hopkins ve Cole tarafından 1900'li yılların başlarında izole edilmiş ve kısa süre içerisinde Ellinger ve Flammed tarafından moleküler yapısı aydınlatılmıştır. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) sistemine göre 2-amino-3-(1H-indol-3-il) propiyonik asit olarak isimlendirilen TRP, apolar yan zincire sahip esansiyel bir amino asittir (90).

İnsan vücudunda TRP, protein sentezine dahil olmasının yanı sıra KYN bileşiklerinin veya serotoninin sentezlendiği iki önemli yolağın öncül bileşiği olarak görev yapmaktadır. Triptofan absorbe edildikten sonra % 90 oranında albümine bağlı olarak veya serbest formda periferel dolaşımda yer almaktadır. Kompetitif non-spesifik L-amino asit taşıyıcılarıyla serbest formda kan-beyin bariyerini geçmektedir. Hem periferel hem de santral sinir sisteminde TRP metabolizmasının majör yolağı KYN yolağıdır (91).

Dolaşımdaki TRP'nin % 95'inden fazlası, IDO1 ve TDO dahil olmak üzere TRP-KYN yolu boyunca metabolize edilir (12).

Triptofan 2,3 dioksijenaz enzimi karaciğer, kemik iliğı, bağışıklık sistemi, kas, gastrointestinal sistem, böbrek, mesane ve beyinde eksprese edilir ve ekspresyon seviyeleri sistemik TRP ve kortikosteroid seviyeleri tarafından düzenlenir (92). Ekspresyon seviyesi stres veya yiyeceğe tepki olarak değişkenlik gösterir (93).

Triptofan , IDO1 tarafından KYN, kinürenik asit ve kinolinik aside katalize edilebilir (94). Sağlıklı bir bireyde serum TRP ve KYN'nin fizyolojik düzeylerde konsantrasyonları yaklaşık olarak sırasıyla $73,0 \pm 14,9 \mu\text{mol/L}$, $1,92 \pm 0,58 \mu\text{mol/L}$,

KYN / TRP oranı ise $26,9 \pm 8,1$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ 'dür. Bu oran erkeklerde kadınlara göre %15 daha yüksek saptanmaktadır. Bunun sebebinin ise insan koriyogonadotropik hormonu (hCG) olduğu öne sürülmektedir (95). Triptofan metabolizmasında kinürenik asit seviyesinin ve metabolitlerinin depresyon, şizofreni, otoimmünite ve nörodejenerasyon gibi çeşitli patolojilerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (96).

2.4. İNDOLEAMİNE 2,3 DİOKSİJENAZ-1

İndoleamine 2,3 Dioksijenaz-1 geni, 8p11.21 kromozom bölgesinde lokalize olan 10 ekson ve 9 introndan oluşur. 9 transkript varyantına sahiptir. Kodlanan protein 403 amino asit uzunluğundadır (97).

İndoleamine 2,3 Dioksijenaz-1 enzimi, merkezi sinir sistemi hücreleri ve makrofajlar dahil olmak üzere çoğu dokuda düşük seviyelerde eksprese edilir. Ancak karaciğerde eksprese edilmez. İndoleamine 2,3 Dioksijenaz-1'in bağışıklık bölmesindeki ifadesi ve aktivitesi sıkı bir şekilde düzenlenir. Proinflamatuvar sitokin interferon gama (IFN- γ), interlökin-6 ve toll benzeri reseptör ligandları tarafından indüklenen ekspresyonu (esas olarak miyeloid hücrelerde) ile inflamasyonun hakim olduğu dokularda yüksek oranda eksprese edilir (98). İndoleamine 2,3 Dioksijenaz-1 miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücre gelişimi, patojenik neovaskülarizasyon ve immün toleransta immünolojik işlevler gerçekleştirir (99). İndoleamine 2,3 Dioksijenaz-1, normal koşullarda TRP metabolizmasında küçük bir rol oynarken, IDO1'e bağlı TRP metabolizması, inflamasyon üzerine salınan interferonlar ve diğer sitokinelere yanıt olarak güçlü bir şekilde aktive olur (100).

İndoleamin 2,3-dioksijenaz 1, TRP'nin parçalanmasında ilk ve hız sınırlayıcı enzimdir. Kinürenin yolağında TRP'nin oksidatif bozunması ile hücresel tükenme sonucunda konakta çeşitli enfeksiyöz patojenlerin büyümesini inhibe eder. Bu özelliği ile IDO1, aynı zamanda önemli bir bağışıklık kontrol enzimi olarak görev alır. Bu durum IDO1 enziminin bulaşıcı hastalıklar, fetal rejeksiyon, organ nakli, inflamasyon, otoimmün bozukluklar, kanser ve viral enfeksiyonlarda etkin rol almasına sebep olur (101).

İmmünmodölatör etkisi embriyonun maternal immün yanıtta nasıl korunduğu araştırılırken bu mekanizmada ana rolü oynayan molekül olması ile ortaya konulmuştur (102). 2003 yılında Uyttenhove ve ark. çoğu insan tümörünün, TRP degradasyonunu katalize ederek tümörleri konak immün saldırısından koruyan IDO1'i yapısız olarak eksprese ettiğini gösterdi (103).

Kanserde, IDO1 ve TDO'nun anormal aktivasyonu, antitümör bağışıklığının baskılanmasına neden olurken, otoimmünitede, IDO1 ve TDO'nun aktivasyonu veya doğal veya sentetik kinürenin yolağı metabolitlerinin sağlanması terapötik etkileri vardır (104).

IFN- γ , en güçlü IDO1 aktive edici sitokin olarak kabul edilir ve IDO1 promotör bölgesine bağlandıktan sonra çeşitli hücre tiplerinde ekspresyonu indükler. IFN- γ 'nın IDO1 aktivasyonu üzerindeki etkisi en iyi makrofajlarda ve dendritik hücrelerde karakterize edilir (105, 106).

İndoleamine 2,3 Dioksijenaz-1 dendritik hücre, makrofaj ve Treg gibi immün sistem hücrelerinden eksprese olmaktadır. İndoleamine 2,3 Dioksijenaz-1, insan tümörlerinin yaklaşık %58'inde eksprese edilir ve ekspresyonu, melanom, jinekolojik kanserler, kolon kanseri, MK ve hematolojik maligniteler dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir (107, 108). İndoleamine 2,3 Dioksijenaz-1 aktivitesi kanser invazivliği ve metastazı gibi diğer biyolojik işlevlerle ilişkilendirilmiştir. Mesane kanseri ile ilişkisi incelendiğinde kasa invaze olan tümörlerde kasa invaze olmayan tümörlere göre pozitif korelasyon göstermektedir. Bunun yanı sıra MK'nın progresyonuyla da pozitif korelasyon göstermiştir (109).

Triptofan tükenmesi, genel kontrol bastırılmayan-2 (GCN2) kinazın aktivasyonuna ve bunun sonucunda ökaryotik başlatma faktörü-2 alfa'nın (eIF2 α) fosforilasyonuna yol açarak protein sentezini bloke eder. CD8 T hücrelerinde, GCN2 yolunun aktivasyonunun, bu T hücrelerinin sitotoksik efektör fonksiyonunu bozan TCR ζ zincirinin aşağı regülasyonunun yanı sıra proliferasyonun inhibisyonuna ve anergi indüksiyonuna yol açtığı bildirilmiştir (110). Artan IDO1 aktivitesi yoluyla TRP katabolizması, anti-tümör bağışıklık tepkilerini baskılayarak kanserin ilerlemesini sağlar. Yüksek IDO1 ekspresyonunun, infiltre olan CD3 $^{+}$ T hücreleri, CD8 $^{+}$ T hücreleri,

CD57⁺ natural killer (NK) hücreleri, B hücrelerinin azalmış seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (111, 112).

Triptofan metabolitleri, aril hidrokarbon reseptörü (AHR) için ligand görevi görebilir. Bu endojen ligandlar AHR'ye bağlanır ve AHR bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını modüle edebilen bir transkripsiyon faktörü olarak görev alır. Kinürinin AHR'ye bağlanması, Th1, Th2 veya Th17 alt kümelerini etkileyebilecek Foxp3⁺ Treglerin modülasyonunu ve proliferasyonunu tetikleyerek T hücreleri için AHR'ye bağımlı farklılaşma yolunun aktivasyonuna da yol açar (13, 110, 112).

Akut böbrek allograft rejeksiyonu olan hastalar, rejeksiyon olmayanlara kıyasla daha yüksek IDO1 ifadeleri gösterdi (113). İndoleamine 2,3 Dioksijenaz-1 seviyesi, kronik böbrek hastalığı (KBH) evresinin artmasıyla arttı. İndoleamine 2,3 Dioksijenaz-1 aktivitesi, diğer aşamalara kıyasla KBH evre 4 ve KBH evre 5'te önemli ölçüde daha yüksek seviyelerle yoğunlaştırılmış bir eğilim göstermiştir (114).

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hasta Örneklerinin Toplanması

Çalışma protokolü T.C. Sağlık Bakanlığı Üniversitesi Haydarpaşa Numune SUAM Etik Kurulu tarafından 18.04.2022 tarih ve HNEAH-KAEK 2022/78 sayılı yazı ile onaylandı. Mesane kanserli hastalar ve sağlıklı kontrollerden bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alındıktan sonra, çalışma kriterleri dahilinde çalışmaya dahil edildiler. Vaka ve kontrol gruplarındaki her hastadan 10 cc kan örneği EDTA'lı tüpe alındı. Hasta kanları 4500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant (serum) kısmı alikotlanarak floresan dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-FD) için -20°'de depolanırken EDTA'lı tüpte kalan örnek DNA izolasyonu için +4°C'de saklandı. Bu kan örnekleri uygun koşullarda İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'na soğuk zincirle ulaştırıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Amonyum asetat (Sigma A-8920)
- Proteinaz K (Merck)
- Sodyum Klorid (NaCl) (Sigma, S3014)
- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma, 9884)
- Sodyum Dedodesil Sülfat (SDS) (Sigma, L4390)
- Lökosit parçalama çözeltisi (WBL)
- Etil alkol (%99) (Merck)
- Hidroklorik asit (Sigma, H1758)
- TrisBaz (BioChemika, 93362)
- Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas)
- Sodyum hidroksit (Merck C754962)
- Ultra Saf Su (Milipore) (HPLC Grade)
- Asetik asit (Merck K-04134156)
- Perklorik Asit (PCA) (Merck)

- Asetonitril (HPLC grade) (Merck)
- Etidyum bromür (Sigma E-8751)
- Agaroz (Promega MBG)
- Metanol (HPLC grade) (Merck)
- pUC8 DNA size marker (MBI Fermentas)
- Buffer (rCutsmart)
- İleri ve geri primerler
- MgCl₂
- Nükleotidler
- BciVI enzimi

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı +4°C ve -20°C
- Distile su cihazı (Millipore)
- DNA/RNA UV Cleaner Kabin (Biosan)
- Elektroforez sistemi (E-C 350 MIDICELL)
- Falkon santrifüj (Hettich)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Mikrodalga fırın (Philco)
- Orbital çalkalayıcı (Thermo Scientific)
- Otomatik pipet seti (Gilson) (Eppendorf)
- PCR cihazı (Thermal Cycler) (BioRad)
- Santrifüj (Nüve Mf 048)
- Spektrofotometre (NanoDrop)
- UV transilluminator (Kodak EL LOGIC 100 görüntüleme sistemi)
- Vorteks-Mikrospin (Biosan)
- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) shimadzu LC-20AT
- Florasan Dedektör shimadzu RF-20A (FD)
- Ultrasonik Banyo
- Otomatik Pipetler Eppendorf

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu:

Periferik kandan DNA izole edilirken tuz çöktürme metodu kullanılmış olup, amonyum asetat ve proteinaz K kullanılmıştır. Bu yöntem, hücresel proteinlerin dehidratasyon ve doymuş bir NaCl çözeltisi ile çöktürme yoluyla tuzlanmasını içerir (115).

Araştırmamızda kullanılan numunelerden steril EDTA'lı tüplere alınan 10 ml periferik kan örneği izolasyon analizi için falkon tüpüne aktarıldı. Daha sonra üzerine 1:3 oranında (30 ml) olacak şekilde eritrosit parçalama çözeltisi (Lysis Buffer) eklendi ve +4°C'de 15 dakika bekletildi. +4°C'den alınan numuneler 1500 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspanse edildikten sonra tekrar 15-20 ml eritrosit parçalama çözeltisi (Lysis Buffer) eklendi. Numuneler +4°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak süspanse edildi. Süspanse olan pellete 500 µl %10'luk SDS, 75 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9.4 ml WBL eklendi ve 56 °C su banyosunda bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon aşamasından sonra her 1 ml numuneye 0.37 ml olacak şekilde 9.5 M Amonyum asetat çözeltisi eklendi ve yavaşça karıştırıldıktan sonra 3000 rpm hızda 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir falkona aktarıldı ve üzerine 1:2 oranında %99'luk etanol eklendi ve böylece DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması için bekletildi ve biriken DNA mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik alkolde yıkandıktan sonra, Tris-EDTA (TE) çözeltisinde çözündürüldü. Elde edilen DNA'nın miktarının ve saflığının belirlenmesi için numunelerin spektrofotometrede optik dansite (OD) ölçümleri yapıldı ve DNA'lar +4°C'de saklandı. DNA örnekleri TE içerisinde 1/100 oranında sulandırıldı. DNA örneklerinin saflığı OD260/OD280 oranı kullanılarak belirlendi. 260 nm'de DNA'nın vermiş olduğu absorbans TE ile spektrofotometre sıfırlanarak ölçüldü. 260 nm'de okunan absorbans/280nm'de okunan absorbans oranından DNA saflığı saptandı. O.D.260/ O.D.280 oranı 1,7-1,8 olarak okunan DNA'lar saf olarak kabul edildi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD260/OD280 değeri yaklaşık 1,8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8'den küçük olacaktır.

OD260/OD280 değeri 2’den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelmektedir

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yöntemi:

Araştırmada gen polimorfizmi çalışmaları için polimeraz zincir reaksiyonu – restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) metodu kullanıldı. Bu metod için öncelikle, yeterli saflık ve konsantrasyonda izole edilen DNA’lardan ile belirli bir DNA bölgesinin birden çok kopyasının in vitro koşullarda çoğaltmak için kullanılan bir teknik olan PCR ile IDO1 gen bölgesi çoğaltıldı. Bu yöntem için PCR reaksiyonunun temel bileşenleri olan Taq polimeraz, su, primerler (ileri ve geri), şablon DNA, magnezyum klorür ve nükleotidler Tablo 3.1’de verilen hacimlerde reaksiyon tüpünde hazırlanarak, Tablo 3.2’deki PCR koşulları ile reaksiyon gerçekleştirildi. PCR çalışmaları için BIO-RAD T100 Termal Cyler cihazı kullanıldı.

3.2.2.1.IDO1 Gen Bölgesinin (rs10089084, G/C) PCR ile çoğaltılması:

IDO1 (rs10089084, G/C) gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan spesifik primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verilmiştir. İlgili primer dizileri internet ortamında online araçlar kullanılarak tasarlanmış ve denenmiştir.

İleri Primer 5’-ATT GGT TCT GCA GTC AAG GGT A-3’

Geri Primer 5’-CGT TTT AGA TGA TTC TGT CCC AGG-3’

Tablo 3.1. PCR reaksiyonu karışımı

	dH ₂ O	dNTP	MgCl ₂	10x Buffer	İleri Primer	Geri Primer	Taq Poli-meraz	Kalıp DNA
Miktar (µl)	16,75	1,5	0,5	2	0,5	0,5	0,25	3

Tablo 3.2. PCR Koşulları

İlk Denatürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C	45 saniye	} 35 döngü
Primerlerin bağlanması	59 °C	45 saniye	
Uzama	72°C	45 saniye	
Son uzama	72°C	5 dakika	

3.2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında IDO1 gen bölgesi ürünlerinin oluşup oluşmadığı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Bu yöntem, nükleik asit (DNA veya RNA) fragmanlarının boyutlarına göre ayrılması için kullanılan bir elektroforez şeklidir. Negatif yüklü DNA/RNA moleküllerine elektrik akımı uygulandığında, moleküller agaroz jelin gözeneklerinden jelin pozitif yüklü ucuna doğru moleküler büyüklüklerine göre göç eder. Moleküler ağırlığı düşük olan küçük parçalar daha hızlı göç ederler. Yükleme boyası ile karıştırılan numuneler, jelin bir ucuna açılmış olan kuyucuklara aktararak yerleştirilir. Daha sonra jel tankının her iki ucundaki elektrotlar aracılığıyla jelden bir elektrik akımı geçirilir. Ortaya çıkan bantlar daha sonra ultraviyole ışık kullanılarak görselleştirilir. DNA çıplak gözle görülmediğinden, jele sertleşme sırasında etidyum bromür eklenir. Bu, DNA'yı bağlar ve UV ışığı altında flüoresans oluşturarak DNA parçalarının görselleştirilmesine izin verir (116-118).

3.2.2.3. Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yöntemi

1984 yılında İngiliz bilim adamı Alec Jeffreys tarafından kalıtsal hastalıklarla ilgili araştırmalar sırasında icat edilen bir tekniktir. Organizmalar arasında genetik olarak ayırmak için DNA parçalarındaki benzersiz kalıpların analizi için kullanılır. Genetik polimorfizm, normal popülasyonun %1'inden fazlasındaki bireyler arasındaki kalıtsal genetik farklılıklar olarak tanımlanır. Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi tekniği, hem tür içi hem de türler arası varyasyonu tanımak ve incelemek için DNA dizilerindeki bu farklılıklardan yararlanır. Bu yöntem, VNTR (değişken sayıda ardışık tekrar) adı verilen ve kişiden kişiye değişen kısa diziler içeren DNA parçalarını ölçer (119).

IDO1 gen polimorfizm analizleri için PCR ürünleri BciVI enzimi ile 37 °C’de 16-18 saat inkübe edilerek ilgili enzimin kesim işlemi sonrasındaki ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelendi. Enzim kesim işlemi 3,5 µl PCR ürününe karşı 15,4 µl su, 5 µl 10x Buffer (rCutsmart), 1,1 µl kesim enzimi ile hazırlanan reaksiyon karışımı kullanıldı. Kesim işlemi sonrasında, kesim ürünleri %2,5’lik agaroz jelde 200V’da 20dk yürütüldü. Kesim ve jel elektroforezi işlemleri ardından jel UV ışık altında incelenerek Şekil 3.1’de şematize edilen kesim ürünlerinin oluşturduğu bant dizimine göre değerlendirme yapıldı.

Yürüme Yönü	Genotipler		
	GG	GC	CC
435 bp			
326 bp			
109 bp			

Şekil 3.1. IDO1 Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü

3.2.3. Yüksek. Basıncılı Sıvı Kromatografisi Analizi:

Plazma TRP ve KYN düzeylerinin analizinde kromatografik analizler için Xiang ve arkadaşlarının HPLC-FD için optimize ettikleri metoda göre Tablo 3.3’de verilen koşullara göre SHIMADZU LC-20A HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (120).

Tablo 3.3. Kromatografik analiz koşulları

Kolon	ODS kolon 5 µm 150x4.6 ID Çinko
Mobil Faz	Asetat Tamponu (15mmol/l; pH:4,0): Asetonitril (95:5)
Akış Hızı	1,5 mL/dk
Elüsyon	İzokratik
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Dedektör	Floresans 365-480 nm (Kinürenin için) 254-404 nm (Triptofan için)
Alıkonma süresi (Rt)	5.8 dk. (Kinürenin için) 13.0 dk. (Triptofan için)

Örnek Hazırlığı

Analiz zamanında örnekler kontrollü olarak çözdürülerek plazma üzerine proteinleri çöktürmek amacıyla 100 µL 0,624 mol/L PCA çözeltisi ilave edilerek vortekslendi. Bunun için 100 µl örnek üzerine aynı miktar PCA eklenerek 12.000 rpm’de 5 dakika +4 °C’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant 20µl alınarak, HPLC sistemine enjekte edilerek ölçümler yapıldı.

3.3. ARAŞTIRMANIN TİPİ:

Araştırma prospektif, olgu-kontrol çalışmasıdır.

3.4. ARAŞTIRMANIN YERİ, ZAMANI VE PLANI:

Ocak-Şubat 2022 tarihleri arasında tez önerisi hazırlandı ve sunuldu. Nisan 2022’de etik kurul onayı alındıktan sonra Mayıs 2022-Haziran 2022 tarihleri arasında T.C. SBÜ Haydarpaşa Numune SUAM Üroloji Kliniği’ne mesane kanseri tanısı ile başvuran hastalar değerlendirildi. Dahil edilme ve dışlanma kriterlerine göre 62 erkek ve 52 kadın hastadan kan örnekleri toplandı. Temmuz 2022-Ağustos 2022 tarihleri arası hastalardan alınan kan örneklerinde periferik kandan DNA izolasyonu,

PCR, RFLP ve HPLC-FD analizleri yapıldı. Eylül 2022-Ekim 2022 tarihleri arasında istatistiksel analizler tamamlandı ve tez yazım aşamasına geçildi (Tablo 10).

Tablo 3.4. Araştırma Planı

Ocak 2022- Şubat 2022	Tez önerisinin hazırlanması ve sunulması
Mart 2022- Nisan 2022	Etik kurul onayı
Mayıs 2022- Haziran 2022	Örnek toplama süreci Malzeme ve hizmet alımı
Temmuz 2022- Ağustos 2022	Periferik kandan DNA izolasyonu, PCR, RFLP ve FLD-HPLC analizleri yapılması
Ağustos 2022- Aralık 2022	İstatistiksel analizler ve tez yazım aşaması

3.5. ARAŞTIRMA EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ/ÇALIŞMA GRUPLARI:

Mayıs 2022- Haziran 2022 tarihleri arası T.C. SBÜ Haydarpaşa Numune SUAM Üroloji Kliniği'ne başvuran mesane kanseri tanısı olan hastalar değerlendirildi. Hasta grubuna dahil edilme ve dışlama kriterlerine göre MK grubuna 38 erkek ve 6 kadın hasta dahil edildi. Kontrol grubuna sağlıklı 24 erkek ve 46 kadın dahil edildi.

3.5.1. Mesane Kanseri Grubu Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

1. 18 yaşının üzerinde olmak
2. Mesane kanseri veya mesanede kitle tanısı almış olmak
3. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamış olması.

3.5.2. Mesane Kanseri Grubu Çalışmadan Dışlama Kriterleri

1. Mesane kanserine yönelik kemoterapi ya da radyoterapi almış olmak
2. Akut enfeksiyon
3. İmmün sistem yetmezliği
4. Mesane dışı malignite varlığı
5. 18 yaş altında olmak

6. Gebe olmak
7. Karaciğer yetmezliği varlığı
8. Böbrek yetmezliği varlığı (Grade 4-5)

3.6. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ

Çalışmamızda bağımlı değişken olarak mesane kanseri grubu ve sağlıklı kontrol grubu bulunmaktadır. Bağımsız değişken olarak bu grupların kan örnek analizlerinden elde edilen ölçümlerdir.

3.7. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

Hastaların demografik bilgileri hastalar çalışmaya kabul edildiğinde hastaların kendisinden alındı.

Laboratuvar analizleri İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.8. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışma verileri SPSS Version 21.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak incelenmiştir. Genotiplerin görülme frekansının gruplar arası farklılıklarının analizinde Ki Kare, Fisher's Exact Testi ve sayısal değerlendirmeler olarak Student-t ve Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. Çalışma gruplarının kendi içinde genotip dağılımlarına göre yapılan sayısal analizler Mann-Whitney U, Multivariate ve oneway ANOVA testi ile belirlenmiştir. Tüm verilerde $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3.9. ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI

Çalışma örnekleminin küçük olması ve hastalardan alınan doku örneklerinde enzim aktivitesi ile TRP ve yolağı ürünlerinin ölçümünün yapılamamasıdır.

4. BULGULAR

4.1. DEMOGRAFİK VERİLER VE PATOLOJİK BULGULAR

Çalışmaya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune SUAM Üroloji Kliniği'nde MK tanısı konulan 44 MK hastası ile bu klinikte tetkik edilen, kronik hastalık ya da malignite hikayesi bulunmayan 70 sağlıklı birey dahil edildi. Tüm bu olguların verileri kendi içinde sınıflandırılarak genotipleme, TRP ve ilgili metabolit analizleri yapılarak, istatistiksel açıdan değerlendirildi. Çalışmamıza dahil edilen MK hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna ait özellikler Tablo 4.1' de özetlendi.

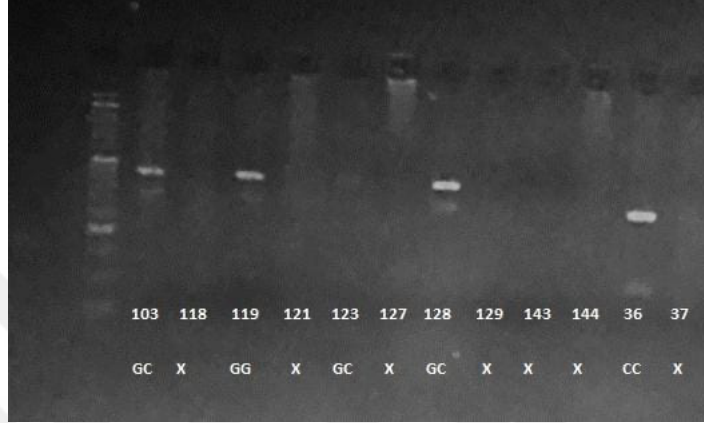
Tablo 4.1. Çalışma gruplarına ait demografik veriler

Birey sayısı		MK'lı Hastalar n (%)	Sağlıklı Kontroller n (%)	<i>p</i>
		n=44 (%)	n=70 (%)	
Yaş Ortalaması ± (SH)		66,61 +/- 9,435	60,60 +/- 7,933	0,506
Cinsiyet	Erkek	38 (%86,4)	24 (%34,3)	
	Kadın	6 (%13,6)	46 (%65,7)	
Mesanede kitle				
Var		16 (%36,4)		
Yok		28 (%63,6)		
Tümör Evresi				
Ta		30 (%68,2)		
T1		14 (%31,8)		
Tümör Derecesi				
LG		25 (%56,8)		
HG		19 (%43,2)		
Lenfovasküler İnvazyon				
Var		2 (%4,5)		
Yok		42 (%95,5)		
Karsinoma İn Situ				
Var		3 (%6,8)		
Yok		41 (%93,2)		
Nekroz				
Var		5 (%11,4)		
Yok		39 (%88,6)		
Sigara				
İçiyor		14 (%31,8)		
Bırakmış		18 (%40,9)		
İçmiyor		12 (%27,3)		
Hipertansiyon				
Var		25 (%56,8)		
Yok		19 (%43,2)		
Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı				
Var		4 (%9,1)		
Yok		40 (%90,9)		
Koroner Arter Hastalığı				
Var		9 (%20,5)		
Yok		35 (%79,5)		
Diyabetes Mellitus				
Var		15 (%34,1)		
Yok		29 (%65,9)		

n: birey sayısı, SH: standart hata, MK: mesane kanseri, HG: yüksek dereceli, LG: düşük dereceli

4.2. IDO1 RS10089084 G/C POLİMORFİZMİNE AİT BULGULAR

İndoleamine 2-3 Dioksijenaz 1 G/C PCR ürünleri %2,5'lik agaroz jelde yürütülerek elde edildi. Özgül PZR ürününe ait bant elde edildiği gözlemlendikten sonra RFLP enzimi ile kesim gerçekleştirildikten sonra GG, GC ve CC genotipleri bant dizilimlerine göre belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. IDO1 G/C PCR ürünlerinin %2,5'lik agaroz jel görüntüsü.

İndoleamine 2-3 Dioksijenaz 1 rs10089084 G/C gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde GG, GC, CC genotiplerinin hasta grubunda sırasıyla %61,4, %29,5 ve %9,1 ve sağlıklı kontrol grubunda %58,6, %35,7 ve %5,7 olarak gözlenmiş olup, hasta ve kontrol grubu genotip dağılımı açısından incelendiğinde aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,783$) (Tablo 4.2). Bu da grupların uyumlu dağıldığını bize göstermektedir.

Tablo 4.2. Mesane kanser hastalarında ve sağlıklı kontrollerde IDO1 rs10089084 G/C genotipleri

Genotip	MK'lı Hastalar n (%)	Sağlıklı Kontroller n (%)	<i>p</i>
GG (%)	27 (%61,4)	41 (%58,6)	0,783 ^a
GC (%)	13 (%29,5)	25 (%35,7)	
CC (%)	4 (%9,1)	4 (%5,7)	
GG + GC	40 (%90,4)	66 (%94,3)	,472 ^a
CC	4 (%9,6)	4 (%5,7)	
GC + CC	17 (%38,6)	29 (%41,4)	,088 ^a
GG	27 (%61,4)	41 (%58,6)	
GG + CC	31 (%70,5)	55 (%64,3)	,463 ^a
GC	13 (%29,5)	25 (%35,7)	

^a kikare (χ^2), MK: mesane kanseri.

İndoleamine 2-3 Dioksijenaz 1 rs10089084 G/C genotiplerinin mesane kanseri patolojik parametreleri ile ilişkileri değerlendirildiğinde mesanede kitle bulunması, T evresi, tümör derecesi, lenfovasküler invazyon (LVI), KİS, nekroz, tümör boyutu parametrelerinin GG, GC ve CC genotipleri arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 4.3. İndoleamine 2-3 Dioksijenaz 1 rs10089084 G/C genotiplerinin hastaların patolojik parametreleri ile karşılaştırılması

		GG	GC	CC	<i>p</i>
Mesane kitle	Var	11 (%68,8)	5 (%31,2)	0 (%0,0)	0,282 ^a
	Yok	16 (%57,1)	8 (%28,6)	4 (%14,3)	
T evresi	Ta	18 (%60,0)	9 (%30,0)	3 (%10,0)	0,941 ^a
	T1	9 (%64,3)	4 (%28,6)	1 (%7,1)	
Tümör derecesi	LG	12 (%63,2)	5 (%26,3)	2 (%10,5)	0,900 ^a
	HG	15 (%60,0)	8 (%32,0)	2 (%8)	
LVI	Var	2 (%100,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0,517 ^a
	Yok	25 (%59,5)	13 (%31,0)	4 (%9,5)	
CIS	Var	2 (%66,7)	1 (%33,3)	0 (%0,0)	0,767 ^a
	Yok	26 (%61,9)	12 (%28,6)	4 (%9,5)	
Nekroz	Var	4 (%80,0)	1 (%20,0)	0 (%0,0)	0,605 ^a
	Yok	23 (%58,9)	12 (30,8)	4 (%10,3)	
Tümör boyutu	< 3 cm	16 (%57,1)	9 (%32,1)	3 (%10,7)	0,773 ^a
	≥ 3 cm	11 (%68,8)	4 (%25,0)	1 (%6,2)	

^a kıkare (χ^2), LVI: lenfovasküler invazyon, CIS: karsinoma in situ, LG: düşük dereceli, HG: yüksek dereceli.

İndoleamine 2-3 Dioksijenaz 1 rs10089084 G/C genotiplerinin mesane kanseri olan grubun komorbidite verileri ile ilişkileri değerlendirildiğinde genotip grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo4.4).

Tablo 4.4. İndoleamine 2-3 Dioksijenaz 1 rs10089084 G/C genotiplerinin hastaların komorbidite verileri ile karşılaştırılması

		GG	GC	CC	<i>p</i>
HT	Var	16 (%64,0)	8 (%32,0)	1 (%4,0)	0,400 ^a
	Yok	11 (%57,9)	5 (%26,3)	3 (%15,8)	
KAH	Var	3 (%33,3)	5 (%55,6)	1 (%11,1)	0,129 ^a
	Yok	24 (%68,6)	8 (%22,8)	3 (%8,6)	
KOAH	Var	3 (%75,0)	1 (%25,0)	0 (%0,0)	0,754 ^a
	Yok	24 (%60,0)	12 (%30,0)	4 (%10,0)	
DM	Var	9 (%60,0)	4 (%26,7)	2 (%13,3)	0,771 ^a
	Yok	18 (%62,1)	9 (%31,0)	2 (%6,9)	

^a kıkare (χ^2), HT: Hipertansiyon, KAH: Koroner Arter Hastalığı, KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı, DM: Diyabetes Mellitus.

4.3. PLAZMA TRİPTOFAN VE KİNÜRENİN DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mesane kanserli grup ile sağlıklı kontrollerin TRP ve KYN düzeyleri ile IDO enzim aktivasyonunu gösteren KYN/TRP oranları değerlendirildi. Yapılan çalışmalarda 44 hastanın genotipi çalışılmasına rağmen 22 hastanın metabolit sonuçlara değerlendirmeye uygun bulunmuş olup plazma TRP ve KYN düzeylerinin yorumlanmasında 22 hastanın istatistiksel analizi yapılabilir.

Yapılan istatistiksel analizde KYN düzeyinin tüm hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p=0,001$). Triptofan düzeylerine bakıldığında tüm hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre TRP düzeylerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,582$). IDO enzim aktivitesi değerlendirildiğinde MK'lı hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı derece yüksek tespit edildi ($p=0,03$) (Tablo 4.5).

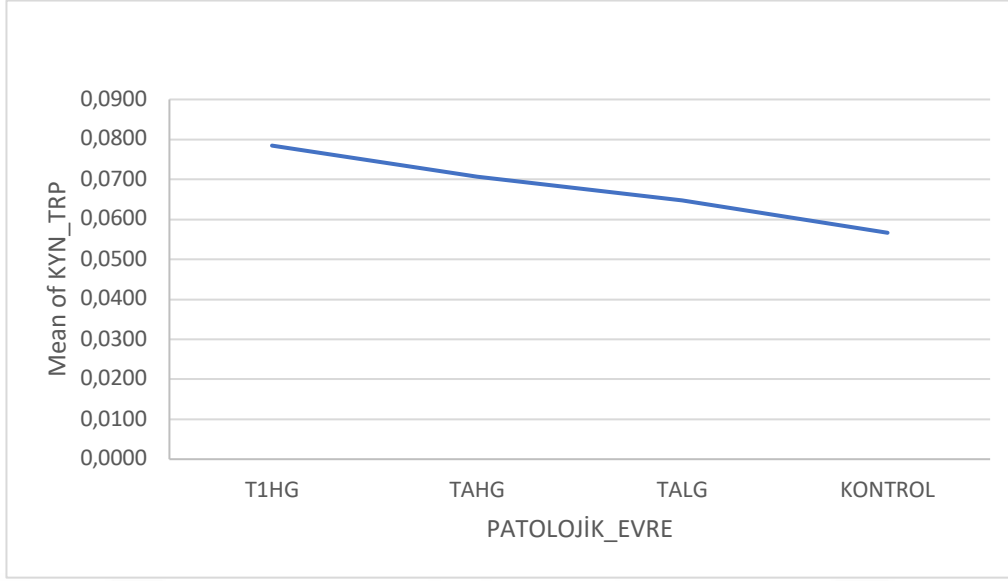
Patolojik evrelemede TaLG, TaHG ve T1HG gruplarının ayrı ayrı sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında KYN düzeyleri anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p=0,001$) (Tablo 4.5). Yine bu gruplarla sağlıklı kontrollerin TRP düzeylerinin değerlendirilmesinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. ($p=0,318$, $p=0,893$, $p=0,685$) (Tablo 4.5).

Patolojik evreleme ile IDO enzim aktivitesinin ilişkisine bakıldığında TaLG gurubuyla sağlıklı kontroller arasında yapılan değerlendirmede TaLG grubunda artmış IDO enzim aktivitesi saptanmış olmasına rağmen anlamlı fark saptanmadı ($p=0,373$). TaHG grubu ile sağlıklı kontroller arasında yapılan değerlendirmede IDO enzim aktivitesindeki yüksekliğin istatistiksel anlamlı fark yaratmadığı tespit edildi ($p=0,168$). T1HG grubu ile sağlıklı kontroller arasında yapılan değerlendirmede IDO enzim aktivitesindeki yüksekliğin istatistiksel anlamlılığa fark tespit edildi (0,06) (Tablo 4.5) (Şekil 4.2).

Tablo 4.5. Mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollerde plazma KYN, TRP ve KYN/TRP düzeyleri

		MK'lı Hastalar	Sağlıklı Kontroller	<i>p</i>
Kinürenin	TaLG (n=11)	1,792455±0,0809659	1,426208±0,1022052	0,001 ^a
	TaHG (n=5)	1,918000±0,1096836		0,001 ^a
	T1HG (n=6)	1,740167±0,0531692		0,001 ^a
	Toplam (n=22)	1,806727±0,1020136		0,001 ^a
Triptofan	TaLG (n=11)	29,432091±7,7383218	25,925792±4,4858164	0,318 ^a
	TaHG (n=5)	27,859600±5,3487016		0,893 ^a
	T1HG (n=6)	23,113667±4,7878470		0,685 ^a
	Toplam (n=22)	27,351500±6,8470770		0,582 ^a
KYN/TRP	TaLG (n=11)	0,64725±0,0164927	0,056647±0,0107412	0,373 ^a
	TaHG (n=5)	0,070730±0,0126045		0,168 ^a
	T1HG (n=6)	0,078456±0,0187505		0,06 ^a
	Toplam (n=22)	0,0698346±0,01669140		0,003 ^a

^a Mann Whitney U, MK: mesane kanseri, KYN: kinürenin, TRP: triptofan.



Şekil 4.2. Patolojik evre ile KYN/TRP oranlarının ilişkisi

Mesane kanseri grubunda patolojik evrelemeye göre TaLG, TaHG ve T1HG gruplarında KYN, TRP ve KYN/TRP düzeylerinin birbirleri arasında değerlendirilmesi yapıldı. TaHG ile TaLG arasında yapılan değerlendirme sonucunda KYN düzeyi yüksekliği TaHG grubunda istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,019$). Bu iki grup arasında TRP düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,777$). Bu iki grup arasında IDO enzim aktivitesi değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,510$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. TaLG ve TaHG grupları KYN/TRP düzeyleri

	TaLG (n=11)	TaHG (n=5)	<i>p</i>
Kinürenin	1,792455±0,0809659	1,918000±0,1096836	0,019 ^a
Triptofan	29,432091±7,7383218	27,859600±5,3487016	0,777 ^a
KYN/TRP	0,064725 ±0,0164927	0,070730±0,0126045	0,510 ^a

^a Mann-Whitney U, KYN: kinürenin, TRP: triptofan.

TaLG ve T1HG grupları arasında yapılan değerlendirme sonucunda KYN ve TRP düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamış olup p değerleri sırasıyla 0,256, 0,149 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında IDO enzim aktivitesi değerlendirildiğinde T1HG grubundaki yükseklik istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0,078$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. TaLG ve T1HG grupları KYN/TRP düzeyleri

	TaLG (n=11)	T1HG (n=6)	<i>p</i>
Kinürenin	1,792455±0,0809659	1,740167±0,0531692	0,256 ^a
Triptofan	29,432091±7,7383218	23,113667±4,7878470	0,149 ^a
KYN/TRP	0,064725 ±0,0164927	0,078456±0,0187505	0,078 ^a

^a Mann-Whitney U, KYN: kinürenin, TRP: triptofan.

TaHG ve T1HG grupları arasında yapılan değerlendirme sonucunda TaHG grubunun KYN düzeyi T1HG grubuna göre istatistiksel anlamlı fark tespit edildi ($p=0,009$). Bu iki grup arasında TRP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,177$). Bu iki grup arasında IDO enzim aktivitesi değerlendirildiğinde her iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,662$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. TaHG ve T1HG grupları KYN/TRP düzeyleri

	TaHG (n=5)	T1HG (n=6)	<i>p</i>
Kinürenin	1,918000±0,1096836	1,740167±0,0531692	0,009 ^a
Triptofan	27,859600±5,3487016	23,113667±4,7878470	0,177 ^a
KYN/TRP	0,070730±0,0126045	0,078456±0,0187505	0,662 ^a

^aMann-Whitney U, KYN: kinürenin, TRP: triptofan.

Mesane kanserinin patolojik verileri ile KYN, TRP ve KYN/TRP düzeylerinin değerlendirilmesinde CIS grubunda tüm hasta grubunda CIS saptanmaması nedeniyle istatistiksel değerlendirme yapılamadı. Mesanede kitle mevcudiyeti, tümör derecesi, LVİ ve tümör boyutu gruplarında metabolik düzeyler arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. T evrelemesinde Ta grubunda T1 grubuna göre hem KYN hem de TRP düzeylerinde istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0,059$, $p=0,009$). IDO enzim aktivite düzeyleri değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı. Nekroz varlığına bakıldığında KYN düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmazken TRP düzeyi düşüklüğü ve IDO enzim aktivitesindeki yükseklik nekroz varlığında yokluğuna göre her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı tespit edildi ($p=0,009$, $p=0,009$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Patolojik parametreler ile TRP/KYN düzeylerinin karşılaştırılması

		Kinürenin	Triptofan	KYN/TRP
Mesanede Kitle	Var (n=7)	1,782286±0,0540238	26,236143±6,7203124	0,0718580±0,01833166
	Yok (n=15)	1,818133±0,1179884	27,87200±7,0750275	0,0688903±0,01645845
p		0,680 ^a	0,731 ^a	0,783 ^a
T evresi	Ta (n=16)	1,831687±0,1057851	28,940688±6,9366211	0,0666016±0,01523059
	T1 (n=6)	1,740167±0,0531692	23,113667±4,7878470	0,0784558±0,01875049
p		0,059 ^a	0,059 ^a	0,203 ^a
Tümör Derecesi	LG (n=8)	1,814000±0,0813774	30,387750±8,3586148	0,0637849±0,01736862
	HG (n=14)	1,802571±0,1148649	25,616500±5,4035101	0,0732915±0,01588151
p		0,616 ^a	0,212 ^a	0,267 ^a
LVİ	Var (n=1)	1,76100	17,95400	0,098084
	Yok (n=21)	1,808905±0,1040076	27,799000±6,6783731	0,0684893±0,01583450
p		0,182 ^a	0,818 ^a	0,182 ^a
Nekroz	Var (n=2)	1,795000±0,0480833	17,75000±0,2884996	0,1011621±0,00435315
	Yok (n=20)	1,807900±0,1066050	28,311650±6,4139369	0,0667018±0,01390303
p		0,952 ^a	0,009 ^a	0,009 ^a
Tümör Boyutu	< 3 cm (n=14)	1,817857±0,1117420	27,925071±6,6141425	0,0683340±0,01523699
	≥ 3 cm (n=8)	1,787250±0,0857334	26,347750±7,5890560	0,0724606±0,01980553
p		0,402 ^a	0,482 ^a	0,764 ^a

^a Mann-Whitney U, LVİ: lenfovaküler invazyon, KYN: kinürenin, TRP: triptofan , LG: düşük dereceli, HG: yüksek dereceli.

Mesane kanseri olan hastaların komorbidite verileri ile TRP ve KYN düzeyleri ile ilişkileri değerlendirildi. Hipertansiyon (HT) hastalığı ile TRP ve KYN düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamış olup p değerleri sırasıyla 0,126, 0,393 olarak tespit edildi. Yine bu grupta IDO enzim aktivitesi değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (p=0,209) (Tablo 4.10).

Diyabetes mellitus (DM) varlığı/yokluğu ile KYN düzeyleri arasında değerlendirme yapıldığında TRP ve KYN düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark sap-

tanmamış olup p değerleri sırasıyla 0,144, 0,096 olarak tespit edildi. DM varlığı/yokluğu ile IDO enzim aktivitesi değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (p=0,186) (Tablo 4.10).

Koroner arter hastalığı (KAH) varlığı/yokluğu ile TRP ve KYN düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamış olup p değerleri sırasıyla 0,545, 1,000 olarak tespit edildi. Yine bu grupta IDO enzim aktivitesi değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (p=0,818) (Tablo 4.10).

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) varlığı/yokluğu ile KYN düzeyleri arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0,160). KOAH varlığında TRP düzeyi istatistiksel anlamlı fark tespit edildi (p=0,040). IDO enzim aktivitesi belirteci olan KYN/TRP oranı değerlendirildiğinde KOAH varlığında istatistiksel anlamlı fark tespit edildi (p=0,021) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. TRP/KYN düzeylerinin hastaların komorbidite verileri ile karşılaştırılması

		Kinürenin	Triptofan	KYN/TRP
HT	Var (n=13)	1,777923±0,0797543	28,584923±7,5389462	0,0661095±0,01686425
	Yok (n=9)	1,848333±0,1203370	25,569889±5,6364734	0,0752152±0,01579904
p		0,126 ^a	0,393 ^a	0,209 ^a
DM	Var (n=9)	1,768333±0,0616928	24,396333±3,9442270	0,0741680±0,01211486
	Yok (n=13)	1,833308±0,1174886	29,397385±7,7838822	0,0668345±0,01912784
p		0,144 ^a	0,096 ^a	0,186 ^a
KAH	Var (n=1)	1,706000	26,89000	0,0634437
	Yok (n=21)	1,811524±0,1019591	27,373476±7,0153710	0,0701389±0,01704094
p		0,545 ^a	1,000 ^a	0,818 ^a
KOA	Var (n=3)	1,742667±0,0740090	35,835333±6,2951404	0,0496596±0,00887311
	Yok (n=19)	1,816842±0,1036373	26,011947±6,0334910	0,0730201±0,01541881
p		0,160 ^a	0,040 ^a	0,021 ^a

^a Mann-Whitney U. HT: Hipertansiyon, KAH: Koroner Arter Hastalığı, KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı, DM: Diyabetes Mellitus, KYN: kinürenin, TRP: triptofan.

G ve C alelleri incelendiğinde aynı alele sahip kontrol grupları ile KYN ve TRP düzeyleri değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda G aleli taşıyan MK'lı bireylerde KYN düzeyinin yüksekliği G aleli taşıyan sağlıklı kontrollerden istatistiksel anlamlılığı ileri düzeyde farklı saptandı ($p=0,0001$). G aleli taşıyan MK'lı bireylerle TRP düzeyinin G aleli taşıyan sağlıklı kontrollerden istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,546$). Yine bu grupta KYN/TRP oranları arasında istatistiksel anlamlı fark hasta grubunda yüksek olacak şekilde tespit edildi ($p=0,04$) (Tablo 4.11). C aleli taşıyan MK'lı bireylerde KYN düzeyinin yüksekliği C aleli taşıyan sağlıklı kontrollerden istatistiksel anlamlılığı ileri düzeyde farklı bulundu ($p=0,0001$). C aleli taşıyan MK'lı bireylerle TRP düzeyinin C aleli taşıyan sağlıklı kontrollerden istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=1,00$). Yine bu grupta KYN/TRP oranları arasında istatistiksel anlamlı fark hasta grubunda yüksek olacak şekilde tespit edildi ($p=0,013$) (Tablo 4.12).

Tablo 4.11. G aleli taşıyan MK'lı ve sağlıklı kontrollerin TRP/KYN düzeylerinin karşılaştırılması

	G aleli MK (n=20)	G aleli Sağlıklı Kontroller (n=22)	p
Kinürenin	1,78985±0,80071	1,42386±0,106151	0,0001 ^a
Triptofan	27,26625±7,121598	25,63041±4,557672	0,546 ^a
KYN/TRP	0,069779±0,0175176	0,057267±0,0110179	0,04 ^a

^a Mann-Whitney U, MK: mesane kanseri, KYN: kinürenin, TRP: triptofan.

Tablo 4.12. C aleli taşıyan MK'lı ve sağlıklı kontrollerin TRP/KYN düzeylerinin karşılaştırılması

	C aleli MK (n=10)	C aleli Sağlıklı Kontroller (n=9)	p
Kinürenin	1,80180±0,122851	1,43100±0,076855	0,0001 ^a
Triptofan	26,45360±5,246283	26,47022±3,877785	1,00 ^a
KYN/TRP	0,071065±0,0135992	0,056188±0,0101983	0,013 ^a

^a Mann-Whitney U, MK: mesane kanseri, KYN: kinürenin, TRP: triptofan.

G aleli taşıyan MK'lı bireylerin patolojik bulguları ile KYN ve TRP düzeyleri değerlendirildi. Çalışmamızda bu gruba dahil olan bireyler KİS saptanmadığı için istatistiksel analiz yapılamadı. Diğer patolojik parametreler ile yapılan istatistiksel analizde G aleli taşıyan MK'lı bireylerde mesanede nekroz varlığında saptanan TRP düzeyi nekroz saptanmayan bireylere göre istatistiksel anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0,011$). Yine nekroz mevcudiyetinin değerlendirildiği grupta nekroz varlığındaIDO enzim aktivitesi göstergesi olan KYN/TRP oranı istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi ($p=0,012$). Diğer parametrelerde yapılan analizde istatistiksel anlamlı sonuç saptanmadı (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. G aleli taşıyan MK'lı bireylerin patolojik parametreleri ile KYN/TRP düzeylerinin karşılaştırılması

		Kinürenin	Triptofan	KYN/TRP
Mesanede kitle	Var (n=7)	1,78229±0,054024	26,23614±6,720312	0,0718580±0,01833166
	Yok (n=13)	1,79392±0,092956	27,82092±7,534493	0,0686599±0,01771910
p		0,766 ^a	0,648 ^a	0,926 ^b
Tümör derecesi	LG (n=7)	1,80957±0,086850	31,14357±8,728060	0,0623950±0,01827334
	HG (n=13)	1,77923±0,077659	25,17846±5,359192	0,0737554±0,01643097
p		0,536 ^a	0,135 ^a	0,453 ^b
LVİ	Var (n=1)	1,76100	17,95400	0,098084
	Yok (n=19)	1,79137±0,081969	27,75637±6,961577	0,068920±0,0166452
p		0,722 ^a	0,187 ^a	0,228 ^b
Nekroz	Var (n=2)	1,79500±0,048083	17,75000±0,288500	0,101162±0,0043532
	Yok (n=18)	1,78928±0,083823	28,32361±6,696358	0,066292±0,0145982
p		0,758 ^a	0,011 ^a	0,012 ^b
Tümör Boyutu	< 3 cm (n=12)	1,79158±0,079929	27,87858±7,066059	0,067992±0,0164835
	≥ 3 cm (n=8)	1,78725±0,085733	26,34775±7,589056	0,072461±0,0198055
p		0,909 ^a	0,650 ^a	0,854 ^b

^a Mann-Whitney U ve ^b oneway ANOVA, LVİ: lenfovasküler invazyon, KYN: kinürenin, TRP: triptofan. LG: düşük dereceli, HG: yüksek dereceli.

C aleli taşıyan MK'lı bireylerin patolojik bulguları ile KYN ve TRP düzeyleri değerlendirildi. Çalışmamızda bu gruba dahil olan bireyler LVİ, CIS ve nekroz saptanmadığı için istatistiksel analiz yapılamadı. Diğer patolojik parametler ile KYN ve TRP düzeyleri arasında yapılan istatistiksel analizde anlamlı fark saptanmadı. Benzer şekilde KYN/TRP oranları arasında da istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. C aleli taşıyan MK'lı bireylerin patolojik parametreleri ile KYN/TRP düzeylerinin karşılaştırılması

		Kinürenin	Triptofan	KYN/TRP
Mesane de kitle	Var (n=2)	1,76450±0,060104	21,37500±4,468915	0,084094±0,0147698
	Yok (n=8)	1,81113±0,135615	27,72325±4,829370	0,066855±0,0109426
p		1,00 ^a	0,178 ^a	0,220 ^b
Tümör derecesi	LG (n=3)	1,79133±0,062979	22,61567±3,821434	0,080567±0,0120986
	HG (n=7)	1,80629±0,145733	28,09843±5,088831	0,065904±0,0114565
p		0,872 ^a	0,137 ^a	0,459 ^c
Tümör Boyutu	< 3 cm (n=8)	1,80825±0,138031	26,11925±5,470121	0,071572±0,0136694
	≥ 3 cm (n=2)	1,77600±0,028284	27,79100±5,812418	0,065226±0,0126240
p		0,761 ^a	0,711 ^a	0,831 ^c

^a Mann-Whitney, ^b Multivariate, ^c oneway ANOVA, LG: düşük dereceli, HG: yüksek dereceli.

5. TARTIŞMA

Mesane kanseri, dünya çapında erkek popülasyonunda en sık teşhis edilen yedinci kanser iken, her iki cinsiyet dikkate alındığında en sık teşhis edilen onuncu kanserdir. Dünya çapında yaşa standardize edilmiş insidans oranı (100000 kişi/yıl) erkeklerde 9.5 ve kadınlarda 2.4'tür (1). Etiyopatogenezinde birçok sebep olduğu bilinmekle beraber karsinogenez mekanizmasının daha detaylı ortaya konabilmesi için birçok bilimsel çalışma yapılmaktadır. Bu bilimsel çalışmalar ışığında KT, RT gibi konvansiyonel tedavi yöntemleri yerine kişiye özgü tedavi modaliteleri geliştirilmesinin, tedavi başarısının artmasını sağlamak amaçlanmaktadır.

Konak immün sisteminden tümör kaçışı bir "tolerans" durumu yaratır ve kanserin ilerlemesi için çok önemli bir mekanizmadır. Ancak bunun altta yatan hücresel ve moleküler temeli tam olarak anlaşılamamıştır (111). Sonraki çalışmalar IDO1 'in, T hücrelerinin KYN ve TRP yoksunluğu varlığına duyarlılığı nedeniyle konakçı immün supresyonuna aracılık ettiğini ve böylece immün kaçışa yol açtığını göstermiştir (102). Triptofanın lokal olarak azalması ve metabolitlerindeki lokal artış, T hücrelerinin büyümesinin durmasına ve TRP eksikliğine son derece duyarlı olan NK hücrelerinin apoptozuna neden olur (121). Ayrıca TRP türevi katabolit KYN, NK hücreleri üzerinde spesifik tetikleyici reseptörlerin ekspresyonunu inhibe eder ve NK hücresi fonksiyonunu düzenler (122). Melanom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, renal hücreli karsinom, mesane kanseri ve rahim ağzı kanseri hücrelerinin yapısal olarak IDO1 eksprese ettiği gösterilmiştir (103).

Mesane kanseri etyopatogenezinde tek nükleotid polimorfizminin (SNP) yerinin olduğu düşünülmektedir. Bu SNP genotipik varyantların kansere duyarlılığı bireyselleştirdiği ve proteinlerin fonksiyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. Tümör duyarlılığını bireyselleştiren bu SNP'lerin mekanizmalarının tespit edilmesi, diğer kanser türlerinin gelişim mekanizmalarının belirlenmesinde yüksek öneme sahiptir. Bu SNP'ler gelecekte umut vaad eden potansiyel tanı ve tedavi edici biyobelirteçler olarak kabul edilmektedir.

Çalışmamızda immüntolerans üzerinde etkisi gösterilen IDO1 enziminin rs10089084 G/C gen polimorfizminin mesane kanserinin etyopatogenizindeki yerini

ortaya koymayı ve histopatoloji ile ilişkisini açıklamayı amaçladık. Hastaların ve sağlıklı kontrollerin demografik verileri analiz edildiğinde iki grup arasında yaş farkında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,506$). Bu durum grupların yaş açısından homojen dağılımını göstermektedir. Hasta grubunun %86,4'ü erkek iken %13,4'ü kadınlardan oluşmaktadır.

Hastaların ve sağlıklı kontrol grubunun GG, GC, CC genotiplerindeki dağılımları analiz edildiğinde bu üç grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu da gruplar arasındaki homojen dağılımı göstermektedir.

Hasta grubunda genotipleme ile patolojik verilerin ilişkisi araştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Literatürde bu genotipleme ile kanser ilişkisini araştıran çalışma saptanmadı. Genotiplerle hasta grubunun komorbiditeleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Literatüre bakıldığında mevcut genotiplerle HT, DM, KAH ve KOAH ile ilişkili çalışma olmadığı gözlemlendi. Ancak Wigner ve arkadaşlarının inme ile IDO1 gen polimorfizmlerinin ilişkisini araştırdığı bir çalışmada 107 rs10089084 G/C gen polimorfizimli hasta incelenmiş olup bunların 12'sinde GG genotipi, 55'inde GC genotipi ve 40'ında CC genotipi saptanmıştır. Bu genotiplerden GG'de artmış inme riski ortaya konulurken CC genotipinde azalmış inme riski gözlenmiş ve GC genotipinde istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır (123). Başka bir çalışmada da Oertelt-Prigione ve arkadaşları IDO enzim aktivitesindeki azalma ile primer biliyer siroz arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (124).

Bu çalışmada IDO1 rs10089084 G/C gen polimorfizminin gözlemlendiği MK'lı hastaların sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırılmasında KYN seviyelerinin istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi. Mesane kanserli hastalar patolojik evrelerine (TaLG, TaHG, T1HG) göre ayrıldığında sağlıklı kontrol grubuna göre KYN seviyelerinin istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi. G aleli bulunan MK'lı grup ile G aleli bulunan sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında MK grubunda KYN ve IDO enzim aktivitesi düzeylerinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Yine C aleli bulunan MK'lı grup ile C aleli bulunan sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında MK grubunda KYN ve IDO enzim aktivitesi düzeylerinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. G aleli taşıyan MK'lı grubun TRP düzeyi sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamış olup

literatürün aksine TRP düzeyleri yüksek saptanmıştır. C aleli taşıyan MK'lı grubun TRP düzeyi sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Gamadedara ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada prostat kanseri ve MK tanısı olan hastalarla sağlıklı hastalar karşılaştırıldığında KYN seviyelerinde yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmış (125). Lee ve arkadaşlarında yapmış olduğu 14 mesane kanserli, 22 sağlıklı kontrolün dahil edildiği çalışmada KYN seviyelerindeki yükseklik istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (10). Gailani ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da KYN seviyesinin MK'lı hastalara göre istatistiksel anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiştir (11).

Bu çalışmada IDO1 rs10089084 G/C gen polimorfizminin gözlemlendiği MK'lı hastaların sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırılmasında TRP seviyelerinin istatistiksel anlamlı düzeyde fark olmadığı gözlenmiştir. Çalışmamızda mesane kanserli olgularda TRP seviyesinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Mesane kanserli hastalar patolojik evrelerine (TaLG, TaHG, T1HG) göre ayrıldığında sağlıklı kontrol grubuna göre TRP seviyelerinin istatistiksel anlamlı fark olmadığı gözlemlendi. Lee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada MK'lı hastalarda plazma TRP düzeyi sağlıklı kontrollere göre istatistiksel anlamlı düzeyde düşük sonuçlanmıştır (10).

KYN/TRP oranı IDO1 enzim aktivitesini göstermektedir (126). Mesane kanserli hasta grubu ile sağlıklı kontrollerin IDO1 enzim aktivitesinde MK grubunda istatistiksel anlamlı yükseklik saptanmıştır. Yine T1HG grubu ile sağlıklı kontrol grubunun IDO enzim aktivitesinde T1HG grubunda istatistiksel anlamlılığa yakın düzeyde yükseklik saptanmıştır ($p=0,06$). TaHG grubunda ve TaLG grubunda ise sağlıklı kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada IDO enzim aktivitesinde yükseklik olmasına rağmen istatistiksel düzeyde anlamlı fark saptanmamıştır. Yine Lee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da benzer şekilde MK'lı grupta sağlıklı gruba göre IDO enzim aktivitesinde istatistiksel anlamlı yükseklik saptanmıştır (10). TaLG ve TaHG gruplarında saptanamayan bu farklılık örneklem evreninin genişletilmesiyle tespit edileceği düşünülmektedir.

Mesane kanseri tanısı olan grubun patolojik verileri incelendiğinde mesanede kitle varlığı, yokluğu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. G

aleli taşıyan grupta da benzer şekilde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Yine C aleli taşıyan grupta da istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Mesane kanseri hasta grubunda T evresi ile KYN ve TRP düzeyleri incelendiğinde her iki grupta da T1 evresinde Ta evresine göre istatistiksel anlamlılığa yakın yükseklik izlendi ($p=0,059$, $p=0,059$). IDO1 enzim aktivitesine bakıldığında T1 evresi ile Ta evresi arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Tümör derecesi ile KYN, TRP ve IDO enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında tüm mesane kanseri grubunda, G alel grubunda ve C alel grubunda istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. LVİ varlığının değerlendirilmesinde tüm grupta varlığı ile yokluğu arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. G alel grubunda yapılan değerlendirmede yine istatistiksel anlamlı fark saptanmazken C alel grubunda LVİ varlığı tespit edilemediği için istatistiksel analiz yapılamadı. Nekroz varlığının değerlendirilmesinde tüm grupta KYN düzeyleri arasında farklılık yokken nekroz varlığında TRP düzey düşüklüğü ve artış IDO enzim aktivitesi istatistiksel anlamlı olarak saptanmıştır ($p=0,009$, $p=0,009$). G alel grubunda da nekroz varlığı değerlendirilmesinde KYN düzeyleri arasında farklılık saptanmazken TRP düzey düşüklüğü ve IDO enzim aktivitesi artışında istatistiksel anlamlılığa yakın fark saptanmamıştır ($p=0,011$, $p=0,012$). C alel grubunda nekroz varlığı saptanmadığı için bu grupta istatistiksel analiz yapılamamıştır. Tümör boyutu değerlendirildiğinde hem tüm grupta hem de G ve C alel gruplarında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Bu konuda literatürde Lee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma mevcut. Bu çalışmada da sadece tümörün invazivliği, tümörün derecesi ve tümör evresi tartışılmıştır. Her üç parametrede istatistiksel anlamlı olarak tespit edilmiştir (10). Çalışmamızda sadece yüzeysel tümörler çalışıldığı için değerlendirme yapılamamıştır. T evresinde KYN düzeylerinde körele sonuçlar elde edilirken TRP düzeylerinde literatürün aksi yönünde sonuçlar saptanmıştır. Diğer parametrelerle ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır.

Hasta grubunun komorbidite verileri ile KYN, TRP ve IDO enzim aktivitelelerinin değerlendirilmesi yapıldığında DM varlığında KYN düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark yaratmayan düzey düşüklüğü saptanmıştır. Triptofan düzeylerine bakıldığında DM varlığında TRP düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark yaratmayan düzey düşüklüğü saptanmıştır. IDO enzim aktivitesine bakıldığında DM varlığı

ğında IDO enzim aktivitesinde istatistikse anlamlı fark yaratmayan yükseklik saptanmıştır. Literatürde Oxenkrug ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TRP düzeyinde gruplar arasında farklılık saptanmamıştır. Yine aynı çalışmada DM varlığında KYN düzeyindeki yükseklik ve IDO enzim aktivitesindeki yükseklik sağlıklı gruba göre istatistiksel anlamlı saptanmıştır (127).

Gaspar ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada KAH olanlarda artmış serum KYN düzeyi ve IDO enzim aktivitesi tespit edilirken serum TRP düzeylerinin sağlıklı gruba göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir (128). Çalışmamızda KAH grubunda TRP, KYN ve IDO enzim aktivite düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı.

Mesane kanseri grubunda KOAH varlığında KYN düzeyi düşüklüğü istatistiksel anlamlı olarak saptanmadı. KOAH varlığında TRP yüksekliği KOAH olmayan gruba göre istatistiksel anlamlı saptanmıştır. Yine IDO enzim aktivitesi düzeyi KOAH olmayan grupta olan gruba göre istatistiksel anlamlı olacak düzeyde yüksek saptanmıştır. Gosker ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada KOAH grubunda sağlıklı topluma göre KYN düzeylerinde istatistiksel anlamlı yükseklik saptandı (129). Zinnellu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IDO enzim aktivitesi göstergesi olan KYN/TRP oranı düzeyleri KOAH grubunda istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (130). Kim ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da KOAH grubunda TRP düzeyi düşüklüğü ve KYN düzeyi yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır (131).

Çalışmamızda HT olan grupta KYN düzeyi ve IDO enzim aktivitesi düşüklüğü saptanmıştır. Ancak bu sonuçlar istatistiksel anlamlı fark yaratmamıştır. Yine HT olan grupta TRP yüksekliği saptanmıştır. Ancak bu sonuçta istatistiksel anlamlı fark yaratmamıştır. Kozhevnikova ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada HT tanısı olan hastalarda KYN ve IDO enzim aktivitesi düzeylerinde yükseklik saptanırken HT olmayan hasta grubunda TRP düzeyinde artış saptanmıştır (132).

Çalışmamızın örneklem evreni küçük bir gruptan oluşmaktaydı. Örneklem evreninin büyütülmesi çalışmanın istatistiksel anlamlılığını güçlendirmesi açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda doku ve idrar örneklerinin çalışılmamış olmasının

diğer bir limitasyonu olduğunu düşünmekteyiz. Daha geniş örneklem evrenli bir grup ele alınacak şekilde, idrar ve doku örneklerinin de dahil edildiğı çalışmalarda istatistiksel anlamlılığın güçleneceğini düşünmekteyiz.



6. SONUÇLAR

Çalışmamız Türk popülasyonunda IDO1 enzimi rs10089084 G/C gen polimorfizmine sahip mesane kanserli hastalarda sağlıklı topluma göre artmış enzim aktivitesini gösteren ilk çalışmadır. Mesane kanseri tanı ve prognozunu belirlemede kullanılabilecek bir biyobelirteç olduğunu gösterebilmek için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.



7. KAYNAKLAR

1. IARC and C. Today. Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages, 2021. 2022; Available from: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>.
2. van Osch, F.H., et al., Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies. *International journal of epidemiology*, 2016. 45(3): p. 857-870.
3. Reulen, R.C., et al., A meta-analysis on the association between bladder cancer and occupation. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 2008. 42(sup218): p. 64-78.
4. Zhang, W., et al., MicroRNA-153 decreases tryptophan catabolism and inhibits angiogenesis in bladder cancer by targeting indoleamine 2, 3-dioxygenase 1. *Frontiers in oncology*, 2019. 9: p. 619.
5. Alexandroff, A.B., et al., BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *The Lancet*, 1999. 353(9165): p. 1689-1694.
6. Witjes, J.A. and K. Hendricksen, Intravesical pharmacotherapy for non-muscle-invasive bladder cancer: a critical analysis of currently available drugs, treatment schedules, and long-term results. *European urology*, 2008. 53(1): p. 45-52.
7. Alfred Witjes, J., et al., Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*, 2017. 71(3): p. 462-475.
8. Liu, M., et al., Tumor-suppressing effects of microRNA-612 in bladder cancer cells by targeting malic enzyme 1 expression. *International journal of oncology*, 2018. 52(6): p. 1923-1933.
9. Huang, B., et al., Suppression of LETM1 by siRNA inhibits cell proliferation and invasion of bladder cancer cells. *Oncology Reports*, 2017. 38(5): p. 2935-2940.
10. Lee, S.H., et al., Tryptophan-kynurenine ratio as a biomarker of bladder cancer. *BJU Int*, 2021. 127(4): p. 445-453.
11. Gailani, S., et al., Studies on tryptophan metabolism in patients with bladder cancer. *Cancer Research*, 1973. 33(5): p. 1071-1077.
12. Debnath, S., et al., Tryptophan metabolism in patients with chronic kidney disease secondary to type 2 diabetes: relationship to inflammatory markers. *International journal of tryptophan research*, 2017. 10: p. 1178646917694600.
13. Opitz, C.A., et al., An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 2011. 478(7368): p. 197-203.
14. Loras, A., et al., Bladder cancer recurrence surveillance by urine metabolomics analysis. *Scientific reports*, 2018. 8(1): p. 1-10.
15. Partin, A.W., Section C Lower Urinary Tract Conditions, *Campbell Walsh Wein Handbook of Urology*. 12th ed. 2021, Elsevier: Amsterdam. p. 2368.

16. Shermadou, E.S., S. Rahman, and S.W. Leslie. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Bladder. 2022 July 25, 2022 [cited 2022; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531465/>.
17. Mobley, T.L., et al., Innervation of the human urinary bladder. Surg Forum, 1966. 17: p. 505-6.
18. Barnard, R.J., J.S. Dixon, and J.A. Gosling, Myopathy of detrusor smooth muscle. Br J Urol, 1987. 59(6): p. 595-6.
19. J, G., Gross anatomy of the lower urinary tract. Incontinence. 1999, Plymouth, UK: Health Publications. 23-56.
20. Pradidarcheep, W., et al., Anatomy and histology of the lower urinary tract. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 117-48.
21. Partin, A.W., Lower Urinary Tract Conditions, Campbell Walsh Wein Handbook of Urology. 12th ed. . 2021, Elsevier: Amsterdam. p. 13878-13879.
22. Ravery, V., D.K. Chopin, and C.C. Abbou, [Surgical anatomy of the lymphatic drainage of the bladder]. Ann Urol (Paris), 1993. 27(1): p. 9-11.
23. Chancellor, M.B. and N. Yoshimura, Part V: Physiology and pharmacology of the bladder and urethra., Campbell's Urology, W. PC, et al., Editors. 2002, WB Saunders: Philadelphia. p. 831-886.
24. SR, B., O. N, and J. R. Histology, Bladder. 2022 Feb 17 [cited 2022; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540963/>.
25. Fry, C.H., et al., Influence of age and bladder dysfunction on the contractile properties of isolated human detrusor smooth muscle. BJU Int, 2011. 108(2 Pt 2): p. E91-6.
26. Khandelwal, P., S.N. Abraham, and G. Apodaca, Cell biology and physiology of the uroepithelium. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. 297(6): p. F1477-501.
27. Walz, T., et al., Towards the molecular architecture of the asymmetric unit membrane of the mammalian urinary bladder epithelium: a closed "twisted ribbon" structure. J Mol Biol, 1995. 248(5): p. 887-900.
28. RM, H. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. 1965 30 Nisan 2019; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5859020>.
29. Dixon, J.S. and J.A. Gosling, Histology and fine structure of the muscularis mucosae of the human urinary bladder. J Anat, 1983. 136(Pt 2): p. 265-71.
30. Paner, G.P., et al., Further characterization of the muscle layers and lamina propria of the urinary bladder by systematic histologic mapping: implications for pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. Am J Surg Pathol, 2007. 31(9): p. 1420-9.
31. Paner, G.P., et al., Diagnostic utility of antibody to smoothelin in the distinction of muscularis propria from muscularis mucosae of the urinary bladder: a potential ancillary tool in the pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. Am J Surg Pathol, 2009. 33(1): p. 91-8.

32. Aitken, K.J. and D.J. Bagli, The bladder extracellular matrix. Part I: architecture, development and disease. *Nat Rev Urol*, 2009. 6(11): p. 596-611.
33. Baykara, M., Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı, Temel Üroloji, K. Anafarta, N. Arıkan, and Y. Bedük, Editors. 2011, Güneş Tıp Kitapevi: Ankara. p. 7-10.
34. Andersson, K.E. and K.D. McCloskey, Lamina propria: the functional center of the bladder? *Neurourol Urodyn*, 2014. 33(1): p. 9-16.
35. Smet, P.J., et al., Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience*, 1996. 71(2): p. 337-48.
36. IARC, C.T. Estimated number of new cases in 2020, Turkey, both sexes, all ages. 2022; Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-factsheets.pdf>.
37. Burger, M., et al., Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, 2013. 63(2): p. 234-41.
38. Cassell, A., et al., Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: A Review of the Current Trend in Africa. *World J Oncol*, 2019. 10(3): p. 123-131.
39. Teoh, J.Y., et al., Global Trends of Bladder Cancer Incidence and Mortality, and Their Associations with Tobacco Use and Gross Domestic Product Per Capita. *Eur Urol*, 2020. 78(6): p. 893-906.
40. Comperat, E., et al., Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virchows Arch*, 2015. 466(5): p. 589-94.
41. Richters, A., K.K.H. Aben, and L. Kiemeny, The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol*, 2020. 38(8): p. 1895-1904.
42. Shariat, S.F., et al., The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int*, 2010. 105(3): p. 300-8.
43. Czene, K., P. Lichtenstein, and K. Hemminki, Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer*, 2002. 99(2): p. 260-6.
44. Zeegers, M.P., et al., The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol*, 2004. 21(6): p. 392-401.
45. Freedman, N.D., et al., Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*, 2011. 306(7): p. 737-45.
46. Zheng, Y.L., et al., Urinary bladder cancer risk factors in Egypt: a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012. 21(3): p. 537-46.
47. Samanic, C., et al., Smoking and bladder cancer in Spain: effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke, and gender. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. 15(7): p. 1348-54.

48. Cumberbatch, M.G., et al., The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol*, 2016. 70(3): p. 458-66.
49. Case, R.A., et al., Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine. *Br J Ind Med*, 1954. 11(2): p. 75-104.
50. Zeegers, M.P., et al., Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands. *Occup Environ Med*, 2001. 58(9): p. 590-6.
51. Burns, P.B. and G.M. Swanson, Risk of urinary bladder cancer among blacks and whites: the role of cigarette use and occupation. *Cancer Causes Control*, 1991. 2(6): p. 371-9.
52. Bonassi, S., et al., Bladder cancer and occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Cancer*, 1989. 44(4): p. 648-51.
53. Siemiatycki, J., et al., Occupational risk factors for bladder cancer: results from a case-control study in Montreal, Quebec, Canada. *Am J Epidemiol*, 1994. 140(12): p. 1061-80.
54. Guey, L.T., et al., Genetic susceptibility to distinct bladder cancer subphenotypes. *Eur Urol*, 2010. 57(2): p. 283-92.
55. Kiemeny, L.A., et al., A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet*, 2010. 42(5): p. 415-9.
56. Egbers, L., et al., The prognostic value of family history among patients with urinary bladder cancer. *Int J Cancer*, 2015. 136(5): p. 1117-24.
57. Corral, R., et al., Comprehensive analyses of DNA repair pathways, smoking and bladder cancer risk in Los Angeles and Shanghai. *Int J Cancer*, 2014. 135(2): p. 335-47.
58. Figueroa, J.D., et al., Identification of a novel susceptibility locus at 13q34 and refinement of the 20p12.2 region as a multi-signal locus associated with bladder cancer risk in individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet*, 2016. 25(6): p. 1203-14.
59. Martin, C., et al., Familial Cancer Clustering in Urothelial Cancer: A Population-Based Case-Control Study. *J Natl Cancer Inst*, 2018. 110(5): p. 527-533.
60. Steinmaus, C., et al., Increased lung and bladder cancer incidence in adults after in utero and early-life arsenic exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014. 23(8): p. 1529-38.
61. Tuccori, M., et al., Pioglitazone use and risk of bladder cancer: population based cohort study. *BMJ*, 2016. 352: p. i1541.
62. Sievert, K.D., et al., Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol*, 2009. 27(3): p. 295-300.
63. Villanueva, C.M., et al., Coffee consumption, genetic susceptibility and bladder cancer risk. *Cancer Causes Control*, 2009. 20(1): p. 121-7.
64. Rossi, M., et al., Flavonoids and bladder cancer risk. *Cancer Causes Control*, 2019. 30(5): p. 527-535.

65. Witlox, W.J.A., et al., An inverse association between the Mediterranean diet and bladder cancer risk: a pooled analysis of 13 cohort studies. *Eur J Nutr*, 2020. 59(1): p. 287-296.
66. Jochems, S.H.J., et al., Fruit consumption and the risk of bladder cancer: A pooled analysis by the Bladder Cancer Epidemiology and Nutritional Determinants Study. *Int J Cancer*, 2020. 147(8): p. 2091-2100.
67. Babjuk, M., et al., European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. *Eur Urol*, 2019. 76(5): p. 639-657.
68. Comperat, E., et al., A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat Rev Urol*, 2018. 15(3): p. 143-154.
69. Ahmadi, H., V. Duddalwar, and S. Daneshmand, Diagnosis and Staging of Bladder Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2021. 35(3): p. 531-541.
70. Lenis, A.T., et al., Bladder Cancer: A Review. *JAMA*, 2020. 324(19): p. 1980-1991.
71. Edwards, T.J., et al., A prospective analysis of the diagnostic yield resulting from the attendance of 4020 patients at a protocol-driven haematuria clinic. *BJU Int*, 2006. 97(2): p. 301-5; discussion 305.
72. Khadra, M.H., et al., A prospective analysis of 1,930 patients with hematuria to evaluate current diagnostic practice. *J Urol*, 2000. 163(2): p. 524-7.
73. Grossfeld, G.D., et al., Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy--part I: definition, detection, prevalence, and etiology. *Urology*, 2001. 57(4): p. 599-603.
74. Jocham, D., H. Stepp, and R. Waidehlich, Photodynamic diagnosis in urology: state-of-the-art. *Eur Urol*, 2008. 53(6): p. 1138-48.
75. Xiong, Y., et al., A meta-analysis of narrow band imaging for the diagnosis and therapeutic outcome of non-muscle invasive bladder cancer. *PLoS One*, 2017. 12(2): p. e0170819.
76. Panebianco, V., et al., Multiparametric Magnetic Resonance Imaging for Bladder Cancer: Development of VI-RADS (Vesical Imaging-Reporting And Data System). *Eur Urol*, 2018. 74(3): p. 294-306.
77. Pecoraro, M., et al., Overview of VI-RADS in Bladder Cancer. *AJR Am J Roentgenol*, 2020. 214(6): p. 1259-1268.
78. Bouchelouche, K., PET/CT in Bladder Cancer: An Update. *Semin Nucl Med*, 2022. 52(4): p. 475-485.
79. Sylvester, R.J., et al., Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol*, 2016. 69(2): p. 231-44.
80. Yafi, F.A., et al., Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*, 2015. 33(2): p. 66 e25-31.

81. Tetu, B., Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*, 2009. 22 Suppl 2: p. S53-9.
82. Barkan, G.A., et al., The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Adv Anat Pathol*, 2016. 23(4): p. 193-201.
83. Xylinas, E., et al., Urine markers for detection and surveillance of bladder cancer. *Urol Oncol*, 2014. 32(3): p. 222-9.
84. Andersson, M., et al., The diagnostic challenge of suspicious or positive malignant urine cytology findings when cystoscopy findings are normal: an outpatient blue-light flexible cystoscopy may solve the problem. *Scand J Urol*, 2021. 55(4): p. 263-267.
85. Kamoun, A., et al., A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*, 2020. 77(4): p. 420-433.
86. Sylvester, R.J., et al., Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, 2006. 49(3): p. 466-5; discussion 475-7.
87. Sylvester, R.J., et al., European Association of Urology (EAU) Prognostic Factor Risk Groups for Non-muscle-invasive Bladder Cancer (NMIBC) Incorporating the WHO 2004/2016 and WHO 1973 Classification Systems for Grade: An Update from the EAU NMIBC Guidelines Panel. *Eur Urol*, 2021. 79(4): p. 480-488.
88. Oosterlinck, W., et al., A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol*, 1993. 149(4): p. 749-52.
89. Malmstrom, P.U., et al., An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*, 2009. 56(2): p. 247-56.
90. Richard, D.M., et al., L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res*, 2009. 2: p. 45-60.
91. Chen, Y. and G.J. Guillemin, Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int J Tryptophan Res*, 2009. 2: p. 1-19.
92. Uhlen, M., et al., Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 2015. 347(6220): p. 1260419.
93. Lanz, T.V., et al., Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) deficiency is associated with subclinical neuroprotection in a mouse model of multiple sclerosis. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 41271.
94. Badawy, A.A., Targeting tryptophan availability to tumors: the answer to immune escape? *Immunol Cell Biol*, 2018. 96(10): p. 1026-1034.
95. Schrocksnadel, K., et al., Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin Chim Acta*, 2006. 364(1-2): p. 82-90.

96. Schwarcz, R. and T.W. Stone, The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology*, 2017. 112(Pt B): p. 237-247.
97. Torok, N., et al., Single Nucleotide Polymorphisms of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Influenced the Age Onset of Parkinson's Disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2022. 27(9): p. 265.
98. Yoshida, R., et al., Interferon: a mediator of indoleamine 2,3-dioxygenase induction by lipopolysaccharide, poly(I) X poly(C), and pokeweed mitogen in mouse lung. *Arch Biochem Biophys*, 1986. 249(2): p. 596-604.
99. Vogel, C.F., et al., Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 375(3): p. 331-5.
100. Yeung, A.W., et al., Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. *Clin Sci (Lond)*, 2015. 129(7): p. 601-72.
101. Munn, D.H. and A.L. Mellor, Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol*, 2013. 34(3): p. 137-43.
102. Munn, D.H., et al., Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 1998. 281(5380): p. 1191-3.
103. Uyttenhove, C., et al., Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, 2003. 9(10): p. 1269-74.
104. Opitz, C.A., et al., Tryptophan degradation in autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci*, 2007. 64(19-20): p. 2542-63.
105. Curran, T.A., et al., IDO expressing fibroblasts promote the expansion of antigen specific regulatory T cells. *Immunobiology*, 2014. 219(1): p. 17-24.
106. Takamatsu, M., et al., IDO1 plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice. *J Immunol*, 2013. 191(6): p. 3057-64.
107. Prendergast, G.C., et al., Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Its Therapeutic Inhibition in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018. 336: p. 175-203.
108. Platten, M., et al., Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 673.
109. Yang, C., et al., Expression and function analysis of indoleamine 2 and 3-dioxygenase in bladder urothelial carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(2): p. 1768-75.
110. Fallarino, F., et al., The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol*, 2006. 176(11): p. 6752-61.
111. Ino, K., et al., Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(8): p. 2310-7.
112. Lavoue, V., et al., Immunity of human epithelial ovarian carcinoma: the paradigm of immune suppression in cancer. *J Transl Med*, 2013. 11: p. 147.

113. Brandacher, G., et al., Non-invasive monitoring of kidney allograft rejection through IDO metabolism evaluation. *Kidney Int*, 2007. 71(1): p. 60-7.
114. Pan, B., et al., Correlation of Indoleamine-2,3-Dioxygenase and Chronic Kidney Disease: A Pilot Study. *J Immunol Res*, 2021. 2021: p. 8132569.
115. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988. 16(3): p. 1215.
116. Aaij, C. and P. Borst, The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1972. 269(2): p. 192-200.
117. Krizek, D.M. and M.E. Rick, Agarose gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Cell Biol*, 2002. Chapter 6: p. Unit 6 7.
118. Lee, P.Y., et al., Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*, 2012(62).
119. Saiki, R.K., et al., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985. 230(4732): p. 1350-4.
120. Xiang, Z.Y., et al., Simultaneous determination of serum tryptophan metabolites in patients with systemic lupus erythematosus by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Clin Chem Lab Med*, 2010. 48(4): p. 513-7.
121. Frumento, G., et al., Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*, 2002. 196(4): p. 459-68.
122. Della Chiesa, M., et al., The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood*, 2006. 108(13): p. 4118-25.
123. Wigner, P., et al., Variation of Genes Encoding Tryptophan Catabolites Pathway Enzymes in Stroke. *J Clin Med*, 2019. 8(12).
124. Oertelt-Prigione, S., et al., Impaired indoleamine 2,3-dioxygenase production contributes to the development of autoimmunity in primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity*, 2008. 41(1): p. 92-9.
125. Gamagedara, S., et al., Validation study of urinary metabolites as potential biomarkers for prostate cancer detection. *Bioanalysis*, 2012. 4(10): p. 1175-83.
126. Maneechotesuwan, K., et al., Decreased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and IL-10/IL-17A ratio in patients with COPD. *Thorax*, 2013. 68(4): p. 330-7.
127. Oxenkrug, G.F., Increased Plasma Levels of Xanthurenic and Kynurenic Acids in Type 2 Diabetes. *Mol Neurobiol*, 2015. 52(2): p. 805-10.
128. Gaspar, R., et al., Kynurenine Pathway Metabolites as Potential Clinical Biomarkers in Coronary Artery Disease. *Front Immunol*, 2021. 12: p. 768560.
129. Gosker, H.R., et al., Impaired Skeletal Muscle Kynurenine Metabolism in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Med*, 2019. 8(7).

130. Zinellu, A., et al., Systemic transsulfuration pathway thiol concentrations in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur J Clin Invest*, 2020: p. e13267.
131. Kim, J., et al., Metabolomics Reveals Dysregulated Sphingolipid and Amino Acid Metabolism Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2022. 17: p. 2343-2353.
132. Kozhevnikova, M.V., et al., Comparative analysis of tryptophan and downstream metabolites of the kynurenine and serotonin pathways in patients with arterial hypertension and coronary artery disease. *Kardiologiia*, 2022. 62(11): p. 40-48.

