

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

**MESANE KANSERİNDE ANDROJEN RESEPTÖRÜ VE AR-V7
EKSPRESYONUNUN TANISAL VE PROGNOSTİK DEĞERİ**

ALPER EGE SARIKAYA
ORCID: 0000-0001-7247-1416

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

İZMİR

TEMMUZ 2022

TEZ KODU: 10484766

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

**MESANE KANSERİNDE ANDROJEN RESEPTÖRÜ VE AR-V7
EKSPRESYONUNUN TANISAL VE PROGNOSTİK DEĞERİ**

ALPER EGE SARIKAYA

ORCID: 0000-0001-7247-1416

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: PROF.DR. AHMET ADİL ESEN

ORCID:0000-0002-6253-6711

**Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)
tarafından 217S075 proje numarası ile desteklenmiştir**

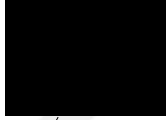
İZMİR

TEMMUZ 2022

ETİK BEYAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “MESANE KANSERİNDE ANDROJEN RESEPTÖRÜ VE AR-V7 EKSPRESYONUNUN TANISAL VE PROGNOSTİK DEĞERİ” başlıklı Tıpta Uzmanlık tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza



Alper Ege Sarıkaya

20.07.2022

TEŞEKKÜR

“Akademi” kavramının her geçen gün günlük pratik içerisinde yerinin azaldığı bir çağda bilim ve akademi kavramlarını kemiklerime dek hissetmemi sağlayan, tezimin her aşamasında yanımda olan, bir şeyin gerçekleştirilmesi için aşılması gereken tek engelin yalnızca doğru düşünebilmek olduğunu gösteren ve bu süreçte gece gündüz demeden benimle birlikte saatlerini harcayan değerli hocam Prof. Dr. A. Adil Esen’e, çalışma hayatı içerisinde karşılaştığım zorlukları rahatlıkla, çekinmeden anlatabildiğim ve bunun karşılığında büyük bir anlayış ve özveri ile bu sorunların çözülmesini sağlayan aynı zamanda ideal hasta-hekim ilişkisine tanık olmamı sağlayan Prof. Dr. İlhan Çelebi’ye, her zaman olan sıcakkanlılığı ve esprileriyle kliniği evim olarak benimsememi sağlayan Prof. Dr. M. Uğur Mungan’a, her fırsatta bize bir şeyler öğretmeye çalışan ve her zaman güncel olan Prof. Dr. Güven Aslan’a, asistanlığın ilk yılından beri bize güvenen ve güven duygusunu hissettiren Prof. Dr. Aykut Kefi’ye, çalışkanlığı, nazikliği, mütevazılığı ve başarılarıyla bizlere umut ve örnek olan Prof. Dr. Ömer Demir’e, yıllar süren oldukça yoğun ve uzun çalışma saatlerinde çalışma azmi ve isteğinin hiç eksilmemesiyle hayranlık duyduğum, ürolojide A’dan Z’ye her şeyi danıştığım ve yoğunluğuna rağmen her zaman sabırla eğitimimizin ve işleyişimizin devamını sağlayan değerli hocam Doç.Dr Ozan Bozkurt’a, birlikte çalışmaya başlamamızla beraber kliniğimizin akademik olarak dev bir adım atmasını sağlayan ve bizi bu konuda her zaman eğiten sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Volkan Şen’e teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında büyük katkıları olan Uzm. Dr. H. Alperen Yıldız, Uzm. Dr. M. Doğan Değer, Prof. Dr. Yeşim Tunçok, Prof. Dr. Gül Ergör, Prof. Dr. Nuran Esen, her zaman her şeyi bildiğine emin olduğum Dr. Canet İncir, Dr. M. Selçuk Özer ve Sedef Özdemir’e teşekkür ederim. Tez konumu benimsememi sağlayan ve bu konuda her görüşmemizde bana yeni ufuklar açan Dr.Peyda Korhan’a ve Prof.Dr.Neşe Atabey’e ayrıca teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince iyi kötü birçok unutulmayacak anı biriktirdiğimiz, her birini dostum olarak gördüğüm asistan arkadaşlarıma, poliklinik, servis, ameliyathanelerde görevli tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği andan beri bana sonsuz moral ve mutluluk veren, her alanda daha iyi olmam için çabalayan , hep bir parçamış gibi hissettiğim ve her zaman yanımda olmasını

istediğim, sevgisini hep hissettđim, en değerli varlığım, eşim Beste Dila Eren Sarıkaya'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugün olduğum kişi yapan, güler yüzlülüğünü, insanlara gösterdiği saygı ve sevgiyi, hayata karşı bakış açısını her zaman övünerek örnek aldığım, her başarımda benden katbekat daha fazla emeği olan her zaman gururlandırmak istediğim seveli annem Gülay Sarıkaya'ya, her geçen gün daha da bilge olduğuna inandığım, karakteri, ideolojisi ve dünya görüşü ile bana hem iyi insanlığı hem de iyi bir hekim olmayı ve doktorluk ahlakını birinci elden öğreten babam şaban Sarıkaya'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Mesane Kanseri	3
2.2 Androjen Reseptörü	17
2.3 Androjen Reseptörü ve Mesane Kanseri İlişkisi	24
2.4 mRNA ve Protein Ekspresyonu Arasındaki İlişki	27
3.GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1 Gen Transkripsiyonlarındaki Değişimin qRT-PCR Yöntemi ile İncelenmesi, Primer Seçimi ve Tasarımı	34
3.2 Gen Ekspresyonlarındaki Değişimin Western Blot Yöntemi İle İncelenmesi - Protein Ekspresyonu Değerlendirilmesi	39
3.3 İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1 mRNA Seviyesinde Analiz	51
4.2 Protein Seviyesinde Analiz	56
5.TARTIŞMA	64
6.KAYNAKLAR	71

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. 2017 TNM mesane kanseri patolojik evrelemesi.....	15
Tablo 2. Araştırma planı.....	31
Tablo 3. Kullanılan primerlerin ve sekans bilgileri.....	34
Tablo 4. İzole edilen total RNA'ların konsantrasyonları ve 260/280 oranları	36
Tablo 5. cDNA sentezinde kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları.....	37
Tablo 6. qRT-PCR reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları	38
Tablo 7. Kullanılan primerlerin optimum çalışma koşulları	38
Tablo 8. Hasta gönüllerin çalışmaya alınma anında mesane kanseriyle ilgili veriler	46
Tablo 9. Mesane kanseri klinik ve histopatolojik özelliklerinin AR-FL ve AR-V7 mRNA ve protein ekspresyonları düzeyinde incelenmesi	48
Tablo 10. Çalışmaya katılan tüm bireylerin AR parametrelerinin kantitatif verileri	50
Tablo 11. AR-FL ve AR-V7 protein ve mRNA ekspresyon düzeylerinin mesane kanseri ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel analizi.....	53
Tablo 12. Kanser hastalarının tümör dokularının AR ekspresyonlarında sağlıklı grubun dokuların ortalamalarına göre meydana gelen değişimler	63
Tablo 13. Mesane kanserinde meydana gelen değişiklikler.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. AR transkripsiyon ve translasyonu	20
Şekil 2. AR-FL ve AR-V7 transkript ve protein.....	22
Şekil 3. Genotip-Transkripsiyon-Translasyon ve fenotip basamaklarının düzenleyicileri	28
Şekil 4. Mesane kanseri grubu AR-FL mRNA ekspresyonları	51
Şekil 5. Kontrol grubu AR-FL mRNA ekspresyonları	52
Şekil 6. AR-FL mRNA seviyelerinin iki grup arasında karşılaştırılması	52
Şekil 7. Mesane kanseri AR-V7 mRNA ekspresyonları.....	54
Şekil 8. Kontrol grubu AR-V7 mRNA ekspresyonları.....	54
Şekil 9. AR-V7 mRNA seviyelerinin iki grup arasında karşılaştırılması.....	55
Şekil 10. Mesane kanseri grubunun AR-FL ve AR-V7 ile kalneksin proteini düzeylerinin western blot analizi	56
Şekil 11. Kontrol grubu mesane doku örneklerinde Western Blot yöntemiyle AR ve AR-V7 protein düzeylerinin belirlenmesi.....	57
Şekil 12. AR-FL protein ekspresyonlarının seviyeleri	58
Şekil 13. AR-FL protein seviyelerinin iki grup arasında karşılaştırılması	59
Şekil 14. AR-V7 protein ekspresyonlarının seviyeleri	60
Şekil 15. AR-V7 protein seviyelerinin iki grup arasında karşılaştırılması	61
Şekil 16. AR-FL/AR-V7 protein oranının iki grup arasında karşılaştırılması.....	61
Şekil 17. AR-FL/AR-V7 mRNA oranının iki grup arasında karşılaştırılması.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AF	Aktivasyon Fonksiyonu
AR	Androjen Reseptörü
AR-FL	Androjen Reseptörü Full-Length (Tam Uzunlukta)
AR-V	Androjen Reseptörü Splice Varyant
ARE	Androjen Response Element (Androjen Yanıt Elemanı)
ARKO	Androjen Reseptörü Knocked-Out (Androjen Reseptörü Etkisiz)
BCa	Bladder Cancer (Mesane Kanseri)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BPH	Benign Prostat Hiperplazisi
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CE	Cryptic Exon (Kesilmiş Ekson)
DBD	DNA Binding Domain (DNA Bağlayıcı Bölge)
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
GAPDH	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan İmmün-Yetmezlik Virüsü)
HPV	Human Papilloma Virüs
HR	Hence Region (Menteşe Bölgesi)
HSV	Human Simplex Virus
İHC	İmmünohistokimyasal
İYE	İdrar Yolu Enfeksiyonu
KDPCa	Kastrasyona Dirençli Prostat Kanseri
KİOMK	Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanseri
KİS	Karsinoma İn Situ
LBD	Ligand Binding Domain (Ligand Bağlayıcı Bölge)
TUR	Trans Üretral Rezeksiyon

MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NAT	N-Asetil Transferaz
NES	Nükleer Eksport Sinyali
NSAİİ	Non-Steroid Anti-İnflamatuvar İlaç
NTD	N-Terminal Domain (N-Terminal Bölge)
PCa	Prostat Kanseri
RB	Retinoblastom
RR	Rölatif Risk
RT-PCR	Real-Time Polimerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
TİTCK	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
TNM	Tümör, Nod, Metastaz
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UICC	Union for International Cancer Control (Dünya Kanseri Kontrol Örgütü)
USG	Ultrasonografi
WB	Western Blot

MESANE KANSERİNDE ANDROJEN RESEPTÖRÜ VE AR-V7 EKSPRESYONUNUN TANISAL VE PROGNOSTİK DEĞERİ

Uzmanlık Tezi

Alper Ege SARIKAYA

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Üroloji Anabilim Dalı

ÖZET

Androjen reseptör (AR) yolağının erkek ürogenital sisteminin büyüme ve gelişiminde önemli rolü bulunmaktadır. AR yolağı prostat, meme gibi organların tümörögenezinde rol oynamaktadır. Mesane kanseri erkeklerde kadınlardan yaklaşık 3 kat sık görülmektedir ve bu çevresel risk faktörleriyle açıklanamamaktadır. Bu durum AR yolağının mesane kanserinde etkili olabileceği hipotezini doğurmuş ve çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültürü ve hayvan deneylerinde AR yolağının mesane kanseri gelişimi üzerindeki etkisi net şekilde gösterilmiştir ancak klinik çalışmalar bu konuda bir fikir birliğine ulaşamamıştır. Bu konuyu ele alan klinik çalışmaların tamamında geleneksel AR (AR-FL) proteini immünohistokimyasal (IHC) yöntemle ölçülmüş ve çalışmalarda farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Protein ölçümünde western blot (WB) yöntemi, IHC'ye göre daha duyarlı olup IHC'nin aksine kantitatif veriler sunabilmektedir. Ayrıca mesane kanseri gelişiminde bu yolaktaki değişiklikleri hem protein hem mRNA düzeyinde değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır.

AR splice varyant – 7 (AR-V7) en sık ele alınmış AR varyantıdır ve prostat kanserinde rolü olduğu bilinmektedir. Buna rağmen AR-FL, AR-V7 dönüşümü mekanizması aydınlatılamamıştır. AR-V7 mesane kanseri ilişkisini ele alan bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda 23 kasa invaze olmayan mesane kanseri dokusu ve 12 sağlıklı bireyin mesane dokusunda; AR-FL proteini, AR-FL mRNA'sı, AR-V7 proteini ve AR-V7 mRNA seviyeleri kantitatif şekilde ölçüldü ve iki grup arasında kıyaslandı. Mesane kanseri olan grupta AR-FL proteini ve AR-V7 mRNA'sı anlamlı şekilde yüksek bulunurken AR-FL mRNA'sı ve AR-V7 proteini düşük bulundu ($p<0,05$).

Tümörögeneze sebep olduğu bilinen AR-FL proteininin mesane kanserinde yüksek saptanması mesane kanserinde AR yolağının rolünün olabileceğini desteklemektedir. AR-FL proteininin regülasyon kaybı sonucu yükselmesi AR-FL mRNA'sının feed-back ile baskılanmasına sebep olmuş olabilir. AR-V7 mesane dokusunda ilk kez gösterilmiştir. Çalışmamız, mesane kanseri AR yolağı ilişkisinde yeni ve değerli bulgulara ulaşmıştır. AR yolağının mesane kanserindeki rolünün netleştirilmesi amacıyla yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler: androjen reseptörü, AR-V7, mesane kanseri, western blot

Tezin sayfa adedi: 86

Danışman: Prof. Dr. Ahmet.Adil Esen

İNGİLİZCE ÖZET

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUE OF ANDROGEN RECEPTOR AND AR-V7 EXPRESSION IN BLADDER CANCER

ABSTRACT

Androgen receptor (AR) pathway has an important role in the growth and development of the male urogenital system. AR pathway also plays a role in the tumorigenesis of several cancers such as prostate and breast cancer. Bladder cancer occurs approximately 3 times more frequently in men than in women, and this male dominance cannot be explained by environmental risk factors. This situation gave rise to the hypothesis that the AR pathway may also have a role in bladder cancer and various studies regarding AR involvement in bladder cancer have been performed.

The effect of AR pathway on bladder cancer development has been clearly demonstrated in pre-clinical cell culture and animal experiments, but clinical studies is yet to have a consensus. In all relevant clinical studies, traditional AR (AR-FL) protein was measured by immunohistochemical (IHC) method and conflicting results were obtained. For protein measurement, Western Blot (WB) method is more sensitive than IHC and unlike IHC, WB can provide quantitative data. In addition, no study has evaluated the alterations in AR pathway in bladder cancer at both protein and mRNA levels.

AR splice variant – 7 (AR-V7) is the most frequently discussed AR variant and is proven to have a role in prostate cancer. However, the mechanism of AR-FL to AR-V7 transformation has not been clearly understood. There is no study addressing the relationship between AR-V7 bladder cancer up to date.

In our study, 23 non-muscle invasive bladder cancer patients' tissues and bladder tissue of 12 healthy individuals were examined. The levels of AR-FL protein, AR-FL mRNA, AR-V7 protein and AR-V7 mRNA were quantitatively measured and compared between the two groups. While AR-FL protein and AR-V7 mRNA were found to be significantly higher in bladder cancer group, AR-FL mRNA and AR-V7 protein were found to be lower ($p<0.05$).

The increase of AR-FL protein, which is known to cause tumorigenesis, in bladder cancer supports the role of AR pathway in bladder cancer. The increase of AR-FL protein, as a result of disruption of the regulatory mechanisms, may have caused suppression of AR-FL mRNA by negative feedback. AR-V7 has been demonstrated for the first time in bladder tissue. Our study reached new and valuable findings in the relationship between bladder cancer and AR pathway. This study will shed light on the studies that aim to clarify the role of the AR pathway in bladder cancer.

Keywords: androgen receptor, AR-V7, bladder cancer, western blot

Page Numbet: 86

Advisor: Prof. Dr. Ahmet.Adil Esen

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri dünya üzerinde en sık görülen 11. kanserdir ve erkeklerde kadınlara oranla yaklaşık 3 ile 4 kat daha sık görülmektedir (1). Mesane kanserinin erkek egemen bir hastalık olması önceki dönemlerde sigara ve endüstriyel maruziyet gibi çeşitli faktörlere bağlanmış olsa da güncel çalışmalar bu risk faktörlerinin cinsiyet farklılığını açıklayamadığını göstermiştir (2). Cinsiyet farklılığını açıklamak için araştırmacılar; karaciğer, meme prostat gibi organların tümörögenезinde rolü olduğu gösterilmiş olan androjen reseptörlerinin (AR) mesane kanseri patogeneğinde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Günümüzde dek yapılan pre-klinik çalışmalarda AR'nin mesane kanseri üzerindeki etkisine dair kuvvetli kanıtlar bulunmaktadır (3,4). Ancak mesane kanseri hastalarının üzerinde yapılan klinik çalışmalarda AR'nin rolü hakkında çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (5–12). Bu çalışmalarda AR protein ölçümlerinin immünohistokimyasal boyama (İHC) ile gerçekleştirilmesinin, çelişkinin ortaya çıkmasındaki en önemli faktörlerden olduğu düşünülmektedir (8). Buna karşın AR'nin mesane kanserinde rol oynayabileceğinin yanı sıra tedavi ve tedavi duyarlılığında da etkisi olabileceğini savunan çalışmalar mevcuttur (13–17). Dahası mesane kanserinde AR yolağını hem mRNA hem protein düzeyinde aynı anda kıyaslayan bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Geleneksel tam uzunlukta AR proteininin (AR-FL) çeşitli bölgelerden kesilmesi sonucu AR splice varyantlar oluşmaktadır (AR-V). Günümüzde 20'den fazla AR-V tanımlanmıştır ve AR-V'lerin çeşitli organ tümörögenезlerinde rolü olduğu gösterilmiştir (18–21). Günümüzde üzerinde en çok araştırılma yapılan ve en çok bilgiye sahip olunan AR-V, AR-V7'dir ve ürogenital sistemin başka bir organı olan prostat kanserinde davranış ve tedavi yanıtı üzerindeki rolü kanıtlanmıştır (21–23). Buna karşın mesane dokusunda AR-V'ler ile yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır ve günümüze dek yapılan çalışmalarda mesane dokusunda AR-V7 varlığı henüz gösterilmemiştir.

Bu çalışmanın amacı AR yolağının mesane kanseri üzerindeki etkisini incelemektir. Bu amaçla 23 mesane kanseri ve 12 sağıklı mesane dokusunda, geleneksel AR (AR-FL) ve AR-V7 düzeyleri hem mRNA hem de protein seviyesinde analiz edilmesi ve karşılaştırılması planlanmıştır. Literatürde ilk kez mesane kanseri ve sağıklı doku arasında AR yolağının hem mRNA hem protein düzeyinde ölçülerek kıyaslanması planlanmıştır ve yine ilk kez AR-FL protein düzeyi ölçümünde İHC yerine daha duyarlı ve semi-kantitatif sonuç verebilen western blot (WB) yöntemi tercih edilmiştir. Prostat kanserindeki rolü her geçen gün daha iyi anlaşılan AR-V7'nin varlığı ise mesane dokusunda ilk kez bu çalışmada ele alınmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda elde edilecek veriler AR yolağının mesane kanseri tümörogenezindeki rolünün daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. AR yolağının mesane kanserindeki davranışının netleştirilmesi mesane kanseri tedavisinde AR hedefli algoritmaların gündeme gelmesini sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Mesane Kanseri

2.1.1 Epidemiyoloji

Mesane kanseri yıllık yaklaşık 573.000 vaka ile dünya genelinde insidansı en yüksek 11. kanser ve aynı zamanda ürogenital sistemin en sık görülen ikinci kanseridir. Yalnızca erkek popülasyonunda ise yıllık yaklaşık 440.000 vaka ile yedinci en sık görülen kanserdir (1). Mortalite açısından 2020 yılında her iki cinsiyette yıllık yaklaşık 212.000 ölüm ile kansere bağlı ölümlerde on üçüncü sırada yer almaktadır. Dünya üzerinde insidans hızı toplamda 100.000’de 5,6 ve erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla 100.000’de 9,5 ve 2,4’tür. Mortalite hızı dünya genelinde 100.000’de 1.9’dur (1). Amerika verilerine göre hastaların %90’ı tanı anında 55 yaş üstündedir ve ortalama tanı yaşı 73’tür (24).

Mesane kanseri ülkemizde yıllık yaklaşık 12.000 vaka ile en sık görülen yedinci, erkek popülasyonunda ise yıllık yaklaşık 10.400 vaka ile en sık görülen dördüncü kanserdir (1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre ülkemiz için toplam insidans hızı 100.000’de 11.9 iken bu hız erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla 100.000’de 22.9 ve 3.1 olarak bildirilmiştir. Yaşa göre standardize edilmiş mortalite hızı ülkemizde 100.000’de 3.3 olarak hesaplanmıştır. Türkiye genelinde yıllık yaklaşık 3.700 ölüm ile en çok ölüme neden olan onuncu kanserdir (1).

Ürotelyal mesane kanseri en sık görülen mesane kanseri alt tipidir ve toplam vakaların yaklaşık %90’ını oluşturur. Ürotelyal mesane kanseri gelişmiş ülkelerde daha sık görülür ve kimyasal maruziyet ve tütün kullanımı ile ilişkisi bilinmektedir. Skuamöz hücreli mesane kanseri ise tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %5’ini oluşturur, şistozomiyazis ile ilişkisi bilinmektedir ve Afrika’da daha sık görülür. Kalan %5’lik kesimde ise adenokarsinom, sarkomlar ve diğer organ metastazları bulunmaktadır(25).

2.1.2 Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Sigara ve Tütün

DSÖ verilerine göre dünya üzerinde yaklaşık 1.3 milyar tütün tüketicisi bulunmaktadır ve tütün ürünleri yılda yaklaşık 8 milyon kişinin ölümüne sebep olmaktadır (26). Sigara ve tütün ürünleri mesane kanserinin bilinen en önemli risk faktörüdür ve tüm ürotelyal kanserlerin yaklaşık %30 ile 40'ından mesane kanserinin ise yaklaşık yarısından sorumludur (27,28). Sigaranın erkeklerde görülen mesane kanseri vakalarının %50-65'inden, kadınlardaki vakaların ise %20-30'undan sorumlu olduğu saptanmıştır (29,30). Tütün tüketimi olan bireyler mesane kanseri açısından iki ila üç kat daha yüksek risk altındadır (27). Mesane kanseri ile en çok ilişkilendirilen tütün ürünü sigara olsa da pipo ve puro gibi tütün ürünlerinin içiciliğinin de mesane kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (28). Nitrozaminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, bifeniller ve arilaminler sigara içerisinde var olan ve idrarda yüksek konsantrasyonda bulunan kanserojenlerdir ve bu kanserojenler mesane kanseri sigara ilişkisinden başlıca sorumludur (28). Sigarada bulunan kanserojenlerin metabolizmasında rol oynayan genlerin polimorfizmi nedeniyle sigara içen bazı bireylerin mesane kanserine daha duyarlı olduğu saptanmıştır. N-asetil transferaz basamağında rol oynayan NAT1 ve NAT 2 genlerindeki polimorfizme göre mesane kanserinde sigara duyarlılığının arttığı görülmüştür (31). 2011 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 280.000'den fazla erkek ve 180.000'den fazla kadın ile yapılan bir çalışmada aktif sigara içicisi olmanın mesane kanseri riskini yaklaşık dört kat, eski sigara içicisi olmanın ise yaklaşık iki kat arttırdığı görülmüştür. Hiç sigara içmeyen grup içinde erkeklerde mesane kanserinin kadınlardan 4 kat daha sık görüldüğü saptanmıştır (29). Sigara alışkanlığının bırakılmasıyla birlikte, geçen zaman ile doğru orantılı olarak mesane kanseri riskinin azaldığı ancak sigara alışkanlığının bırakılmasının üzerinden 10 seneden fazla zaman geçse de rölatif riskin hiç içmeyenlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (29). Kişinin kendisi sigara içmese bile pasif içiciliğinin mesane kanseri riskini %22 oranında arttırdığı gösterilmiştir (32).

Kullanımı gün geçtikçe artan elektronik sigaranın uzun dönemde mesane kanseri üzerindeki etkileri net olarak bilinmemektedir. 2020 yılında yapılan bir derlemede mesane için kanserojen olduğu bilinen 3-hidroksifluran, 1-hidroksipiren, 2 naftilamin ve o-toludine gibi birçok kanserojen maddenin elektronik sigara kullananların idrarında kullanmayanlara göre artmış miktarda bulunduğu belirtilmiştir (33).

Cinsiyet

Mesane kanserlerinin yaklaşık dörtte üçü erkeklerde görülmektedir (27). Erkeklerde ve kadınlarda insidans hızı sırasıyla 100.000'de 9,5 ve 2,4'tür (1). Erkeklerde daha sık görülüyor olmasını açıklamak üzere kurulmuş birkaç hipotez mevcuttur. Öncelikle tütün tüketiminin ve kimyasal maruziyetin global olarak erkeklerde daha yüksek olmasının nedenlerden biri olabileceği düşünülmüştür. Ancak 1990 yılında yapılan bir çalışmada sigara ve kimyasal maruziyet geçirilmiş idrar yolu enfeksiyonu öyküsü gibi faktörler eşitlenirse dahi erkeklerde mesane kanserinin kadınlardan daha sık görüldüğü gösterilmiştir (34). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada ise sigara içmeyen grupta dahil erkeklerin mesane kanserine yakalanma riskinin kadınlardan 4,3 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (29). Daha sonra yapılan bir meta-analizde ise sigara tüketiminin mesane kanserinin erkeklerde daha sık görülmesini kısmi olarak açıklayabildiği ve erkek üstünlüğü ile ilgili başka faktörlerin de sorumlu olabileceği söylenmiştir (35). Başka bir hipotezde ise kadın ve erkeklerde karsinojen maddelerin hücre metabolizmasının farklı olduğu ve bu nedenle iki cinsiyet arasında ürotelyumun karsinojen maruziyetinin farklı olabileceğinden bahsedilmiştir (36,37). Hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada insanlar için mesane kanserojeni olduğu bilinen ve tütün ürünleri ve diğer kaynaklarda bulunan 4-Aminobifenile eşit miktarda maruziyet sonrası erkek farelerde %20 oranında mesane kanseri saptanmış ve dişi farelerin hiç birinde mesane kanseri gözlenmemiştir (38). Kanserijen maddenin metaboliti erkek farelerin mesanesinde dişi farelere oranla 2-3 kat daha fazla bulunurken dişi farelerin karaciğerinde erkeklere oranla 2-3 kat daha fazla bulunmuş ve dişi farelerde karaciğer kanseri daha sık gözlenmiştir (38). Yine

karsinojen metabolizmasında rol oynayan UDP glukuronozil transferaz ekspresyonlarının dişi ve erkek farelerde farklı olduğu gösterilmiştir (39). Başka bir çalışmada mesane rotelyum kanserojen maruziyetinin glutatyon S transferaz enziminin aktivitesi ile değişebileceği ele alınmış, yapılan çalışmada glutatyon S transferaz M1 (GSTM1) fonksiyone olmayan kadınlarda mesane kanseri riskinin daha yüksek olduğu saptanırken erkeklerde böyle bir fark bulunamamıştır. Ayrıca bu fark sigara içen kadınlarda içmeyen kadınlara kıyasla daha bariz olarak saptanmıştır (40).

Karsinojen maruziyeti dengelendikten sonra bile cinsiyet farklılığının devam etmesi nedeniyle hormonal akslar ve seks steroidlerinin mesane kanseri üzerindeki etkisi bir hipotez olarak ortaya atılmıştır. Kadınlarda yapılan çalışmalarda post-menopozal kadınların mesane kanseri açısından daha yüksek riskli olarak saptanması (41) ve geç menarş, parite, ve östrojen ve progestin tedavisi gibi faktörlerin düşük mesane kanseri riski ile ilişkili bulunması (42) seks hormonlarının etkisini destekler niteliktedir.

Kadınlarda mesane kanseri daha az görülmesine karşı kadınlarda görülen mesane kanseri tanı anında daha büyük, daha çoklu olma eğiliminde ve daha ileri evrede olduğu bilinmektedir (27,43). Ayrıca kadınlarda trans-üretral rezeksiyon (TUR) sonrası intravezikal tedavi alma oranının 5 kat daha yüksek saptanmıştır (43). Radikal sistektomi sonrası kadınlarda kanser-spesifik mortalite oranının erkeklerden 1.8 kat daha yüksek olduğu görülmüştür (44). Kadınlarda kötü prognozun sebebinin hematüri semptomunun erkekler için daha uyarıcı bir semptom olması ve kadınlarda hematürinin kişinin kendisi veya klinisyen tarafından idrar yolu enfeksiyonu ile ilişkilendirilerek tanıda gecikmeye yol aması olabileceği fikri ortaya atılmıştır (45). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada hematüri ile başvuru anı ve mesane kanseri tanısı alma arasında geçen süre incelenmiş ve ortalama süre kadınlarda belirgin olarak daha yüksek saptanmıştır. Ayrıca altı aydan fazla gecikmiş tanı alanların oranı kadın popülasyonda belirgin olarak daha yüksek saptanmıştır (45). Yine aynı çalışmada daha çok kadının idrar yolu enfeksiyonu tanısı aldığı ve daha az oranda kadın için görüntüleme tetkiklerine başvurulduğu gösterilmiştir (45). Kadınlarda tanıdaki gecikmenin daha kötü prognoza yol açabileceği aşıkardır. Ancak Mungan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kadınların tanı anında daha ileri evrede olduğu bulgusunu yinelemiş, ancak kadınlar ve erkekler aynı evrede olacak şekilde

ayarlandığında bile kadınların yaşam beklentisinin daha düşük olduğunu saptamıştır (46). Scosyrev ve arkadaşları de yaptıkları çalışmada benzer bulgulara ulaşmışlardır (47). 8000'den fazla radikal sistektomi olgusunda kansere özgü mortaliteyi araştıran bir çalışmada da kadın cinsiyetin tek başına kansere özgü mortalite için bağımsız risk faktörü olduğu gösterilmiştir (48). Bu çalışmada da patolojik evre, lenfovasküler invazyon veya lenf nodu pozitifliğinin cinsiyetler arasındaki farkı açıklayamayacağı belirtilmiş ve bu farkın hasta bakımı ve/veya mesane kanserinin biyolojisinden kaynaklanabileceği vurgulanmıştır (48). Başka bir çalışmada ise mesane kanserinin yaşam süresinin kısalması üzerindeki etkisi incelenmiş, mesane kanseri nedeniyle erkeklerin beklenen yaşam süresinin ortalama %26'sını kadınların ise ortalama %36'sını kaybettikleri gözlenmiştir (49). Buna karşın Mitra ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 414 kadın ile 1166 eşleştirilmemiş erkek ve 414 eşleştirilmiş (tümör, tedavi ve yaş özellikleri bakımından kadın grup ile benzer) erkek mesane kanseri ile kıyaslamış, eşleştirilmemiş erkeklere oranla kadınlarda rekürrensiz sağ kalım ve genel sağ kalım daha düşük, kansere özgü mortalite ise daha yüksek bulunmuştur. Ancak eşleştirilmiş örnekler analiz edildiğinde kadınlar ve erkekler arasında rekürrensiz sağ kalım, genel sağ kalım ve kansere özgü mortalite arasında fark bulunmamıştır (50).

Genetik

Amerika Birleşik Devletleri verilerine göre mesane kanserinin en sık görüldüğü ırk beyaz ırktır. Beyaz ırkta mesane kanseri insidansı siyah ırka göre 1,5, Hispaniklere göre ise iki kat daha yüksek olarak bulunmuştur (27). Siyah ırkta daha nadir görülmesine rağmen siyah ırkta kasa invaze mesane tümörü görülme ihtimali daha yüksek olarak gözlenmiştir (47).

Birinci derece akrabalarında mesane kanseri olan kişilerin mesane kanserine yakalanma ihtimalleri iki kat daha fazladır (51). Mesane kanserinin herediter özelliği ile ilgili ilk bilgi 1957 yılında tek yumurta ikizlerinin her ikisinde de mesane kanseri görülmesi ile ortaya atılmıştır (52). Daha sonra Fraumeni ve arkadaşları mesane kanseri olan ve beş çocuk sahibi bir babanın kendisi gibi sigara içen üç oğlunda mesane

kanseri gözlemlendiğini bildirmişlerdir (53). Buna karşın 1950’li yıllarda yaptığı bir çalışmada Morganti ve arkadaşları 160 mesane kanseri aile öyküsü olan birey ile 160 sağlıklı kontrol grubu arasında mesane kanseri gelişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadıklarını bildirmişlerdir. 2008 yılında Mueller ve arkadaşları Fraumeninin ailesini tekrar ele almış ve mesane kanseri açısından yüksek riskli genler açısından taramış ancak herhangi bir pozitif sonuç bulamamıştır (54). İsveçte yapılan beş milyondan fazla kişinin ele alındığı bir çalışmada ebeveynlerinden birinde mesane kanseri olması durumunda mesane kanseri riskinin 1,5 kat arttığı ve etkilenen bir kardeşin de eşlik etmesi durumunda bu riskin 3,3 kat arttığı gözlenmiştir (55).

Mesane kanseri ile en yakın ilişkilendirilmiş genetik mekanizmalar N-asetiltransferaz 2 (NAT2) ve glutatyon S-transferaz (GSTM1) delesyonlarıdır (40). Her iki gen de sigarada da bulunan aromatik aminlerin metabolizasyonundan sorumludur (27,56). 2005 yılında yapılan bir çalışmada NAT2 yavaş asetilleyen grupta ve GSTM1 delesyonlu grupta mesane kanseri riskinin artmış olduğu ve bu genlerin mesane kanseri olgularının yaklaşık %30’undan sorumlu olabileceğini bildirilmiştir (56). Bu genlerin yanında mesane kanseri riskini arttırdığı bilinen başka genler de mevcuttur ve bu genler ile mesane kanseri davranışı ilişkisi ayrıca incelenmiştir (57,58). Bununla birlikte Lynch sendromu, Muir-torre sendromu, Li-Fraumeni sendromu gibi sendromlarda da mesane kanseri riskinin artmıştır (59,60). Genetik olarak ise PTEN, RB1 ve p53 gibi yolaklardaki değişiklikler nedeniyle mesane kanseri riskinin bazı bireylerde arttığı bilinmektedir (60,61).

Kimyasal Maruziyeti

Mesane kanseri olgularının %5-10 kadarından kimyasal maruziyetin sorumlu olduğu bilinmektedir (27,62). Erkeklerin mesleki kimyasal maruziyeti daha fazladır ve mesleksi maruziyetin erkeklerdeki mesane kanserinin %7.1’inden sorumlu olduğu gösterilmiştir (63).

2015 yılında yapılan ve 30 milyondan fazla kişinin analiz edildiği bir derlemede mesane kanseri açısından rölatif riski en yüksek olan meslekler sırasıyla ; tütün işçiliği

(RR:1,72), boya işçiliği (RR:1,58), baca süpürenler (RR:1,53), hemşirelik (RR:1,49), kauçuk işçileri (RR:1,49), garsonlar (RR:1,43), alüminyum işçileri (RR:1,41), kuaförler (RR:1,32), tesisatçılar (RR:1,2) olarak bildirilmiştir (62). Mortalite için ise en yüksek riskli gruplar sırasıyla kimyasal ve boya işçileri olarak belirtilmiştir (62). Tütün işçileri, boya işçileri, baca süpürenler, hemşireler, kauçuk işçileri, garsonlar, petrol işçileri, ayakkabı ve deri işçileri, alüminyum işçileri, kuaförler, denizciler, matbaacılar ve tesisatçıların aromatik amin ve polisiklik aromatik hidrokarbon maruziyeti nedeniyle mesane kanseri açısından istatistiksel olarak belirgin şekilde %20'nin üzerinde daha yüksek risk taşıdığı gösterilmiştir (62). Ayrıca tarım işçileri, orman işçileri, bahçıvanlar, öğretmenler, din ve kanun adamlarının mesleksen açıdan mesane kanseri açısından azalmış risk taşıdığı görülmüştür (62). 2000 yılında Kanada'da yapılan bir çalışmada ise erkekler için kuaförlük, madencilik, metal işçiliği ve teknisyenliğinin mesane kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (64).

Savaşlarda kullanılan ve karsinojen özellik taşıyan portakal gazı ile ilgili Vietnam gazileri üzerinde yapılan incelemeler sonucunda mesane kanserinden ölüm ile portakal gazı maruziyeti arasında ilişki olabileceği gösterilmiştir (65). Potansiyel bir kanserojen olan tetrakloroetilen kuru temizlemede yaygın şekilde kullanılmaktadır ve kuru temizleme çalışanlarında mesane kanseri riskinin artmış olduğu gösterilmiştir (66). 2016 yılında Çin Halk Cumhuriyeti'nde yapılan bir meta-analizde ise pestisit maruziyetinin mesane kanseri riskini belirgin şekilde arttırdığı gösterilmiştir (67). İçme suyunda bulunan yüksek doz (300–500 µg/l) arsenik ile mesane kanseri riski arasında belirgin ilişki olduğu gösterilmiştir (68). Türkiye birçok ülke ile birlikte bu konuda katı kısıtlamalar getirmiş ve içme suyunda bulunan arsenik miktarını 10 µg/L değerinin altına indirmiştir (69). İzmir için 2008 yılının verilerine göre içme suyundaki arsenik oranının en yüksek olduğu semt 13,5 µg/L ile Buca'dır ve tüm semtlerde içme suyu arsenik oranı istenilen düşük seviyelerdedir (70). İçme suyundaki düşük doz arsenik ile mesane kanseri riski arasında istatistiksel olarak belirgin ilişki saptanmamış olsa da sigara içenlerde riski arttırabileceğini belirten yayınlar mevcuttur (71,72). Düşük doz arseniğin mesane kanseri açısından risk taşıyıp taşımadığının belirlenmesi için düşük doz arsenik ve diğer karsinojenlerin ilişkisinin netleştirilmesi gerekmektedir (71–73). Dizel dumanı maruziyetinin de mesane kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (74). Mesane kanseri açısından riskli olduğu bilinen meslek

dallarının incelendiği başka bir çalışmada ise ileri evre ve derece mesane kanseri ile dizel dumanı maruziyeti arasında belirgin ilişki bulunmuş ve garajda çalışan, gaz doldurulması/havalandırılması/yerleştirilmesi ve kaynakçılık gibi işleri yapan kişilerin progresyon riskinin ve radikal tedaviye ihtiyaç duyma olasılığının daha yüksek olduğu saptanmıştır (75).

Beslenme ve İlaç Kullanımı

Mesane kanseri beslenme alışkanlığı ilişkisi diğer birçok kanserde olduğu gibi birçok araştırmanın odak noktası olmuştur (27). Sıvı tüketiminin fazla olmasının mesane kanseri riskini azaltabileceği yönünde tartışmalı fikirler olsa da yapılan bir meta-analizde tüketilen sıvı miktarının mesane kanseri riskini etkilemediği belirtilmiştir (76). Yaklaşık 250.000 kişi ile yapılan bu çalışmada ayrıca meşrubat tüketimi ve mesane kanseri arasında zayıf bir ilişki bulunurken; çay, kahve, bitki çayı, süt, su, tatlandırıcı kullanımı ile mesane kanseri riski arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (76). Başka meta-analizlerde de benzer şekilde çay tüketimi (77) ve toplam sıvı tüketimi ile mesane kanseri arasında bir ilişki saptanmamıştır (78). Alkol tüketimini ele alan bir meta-analizde ise orta-ağır alkol tüketiminin mesane kanseri riskini genel olarak arttırmadığı ancak bazı alt gruplarda ağır alkol tüketiminin (<30gr/gün) mesane kanseri riskini arttırdığı belirtilmiştir (79).

Yao ve arkadaşları mesane kanseri ve sebze-meyve tüketimi ilişkisini incelemiş ve bunun sonucunda meyve, sebze, turpgiller, sarı-turuncu sebzeler, turunçgiller ve kombine meyve sebze tüketimindeki artışın mesane kanseri riskini belirgin olarak düşürdüğünü saptamışlardır (80). Turpgiller ve sarı-turuncu sebzelerdeki koruyuculuğun en belirgin düşük dozlardaki artışlarda saptandığını göstermişlerdir. Turpgillerin tüketiminde 90g/gün değerinin koruyucu etkideki artış için üst sınır olduğunu ve daha fazla tüketilmesinin fazladan koruyuculuk sağlamayacağını belirtirken sarı-turuncu meyvelerde ise 20g/gün üzerindeki artışta risk düşüşünün çok daha yavaş olduğunu göstermişlerdir (80). Yine de bu bulguların onaylanması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Balık tüketimi ile ilgili yapılan kısıtlı sayıda çalışmanın ele alınabildiği bir meta-analizde balık tüketimi ile mesane kanseri riski arasında anlamlı fark saptanmamıştır (81). Kırmızı et tüketimi ve mesane kanseri ilişkisi de birçok çalışmanın konusu olmuştur. Yapılan meta-analizlerde kırmızı et tüketimi ile mesane kanseri arasında direkt ilişki bulunmamış olsa da işlenmiş kırmızı et tüketiminin artması ile mesane kanseri riski arasında belirgin bir ilişki saptanmıştır (82,83). İşlenmiş kırmızı et tüketiminde her 50 gr/hafta artış için mesane kanseri riskinin %20 arttığı belirtilmiştir (82,83). Crippa ve arkadaşları yaptıkları meta-analizde vaka-kontrol çalışmaları ele alındığında toplam kırmızı et tüketiminin de mesane kanseri riskini arttırdığı ancak prospektif çalışmalarda bu ilişkinin gösterilemediği belirtilmiştir (82). Li ve arkadaşlarının meta-analizde ise yumurta tüketimi ile mesane kanseri riski arasında ilişki saptanmamıştır (84).

Fiziksel aktivite yapmanın mesane kanseri riskini azalttığı raporlanmıştır (63,85). Yapılan meta-analizlerde obezitenin artmış mesane kanseri riski, artmış progresyon ve rekürrens riski ve artmış mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (63,86,87). İş stresi, anksiyete bozukluğu ve uyku süresinin az olması gibi durumların da mesane kanseri riskini arttırdığı belirtilmiştir (88–90).

Birkaç çalışmada A, D ve E vitaminlerinin yüksek olmasının mesane kanseri riskini azalttığı ve bu vitaminlerin eksikliğinin mesane kanseri riskini arttığı belirtilmiştir (91–94). Vitamin K2'nin ise mesane kanseri hücre kültürlerinde apoptozü indükleyerek antitümöral etki sağladığı gösterilmiştir (95). Vitamin C ve E'nin mesane kanseri ile ilişkisini inceleyen başka bir meta-analizde E vitamini ile mesane kanseri riski arasında ters ilişki saptanmıştır ancak C vitamini ve mesane kanseri riski arasında ilişki bulunamamıştır (96). C vitamini ve mesane kanseri riski açısından farklı sonuçları içeren çalışmalar olsa da C vitaminin mesane kanseri tedavisinde kullanılabileceği hücre kültüründe gösterilmiştir (63,97). Ayrıca selenyum ve folat tüketiminin mesane kanseri riskini düşürdüğü gösterilmiştir (98,99). Myung ve arkadaşları bazı antioksidanların kullanımının mesane kanseri riskini arttırdığını göstermiştir (100).

Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan bir PPAR γ (peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör γ) agonisti olan pioglitazone kullanımı ile mesane kanseri

gelişimi arasında doz ve süre bağımlı istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (101). Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde kullanılan aspirin, statin ve kalsiyum kanal blokörleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise bu ilaçların mesane kanseri riskini arttırmadıkları, kalsiyum kanal blokörlerinin ise potansiyel bir önleyici etkisi olabileceği belirtilmiştir (102). Yine benzer şekilde steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçlar (NSAİİ) ile mesane kanseri riskinin incelendiği bir meta-analizde bu grup ilaçların mesane kanseri riskini arttırmadığı gösterilmiş ve sigara içmeyenlerde aspirin harici NSAİİ'lerin azalmış mesane kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (103).

Atom bombası maruziyeti olanlarda ürotelyal karsinomun daha sık görülmesiyle birlikte radyasyonun mesane kanseri ile ilişkisi araştırılmış ve 1 gray radyasyon maruziyetinin %60 artmış atfedilebilir risk ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (27). Pelvik organ malignitelerinde kullanılan radyoterapi sonrası 15-30 yıllık latent periyodu takiben mesane kanseri gelişebileceği bilinmektedir (27). Prostat kanserine yönelik radyoterapi sonrası mesane kanseri riskinin 1,5-2 kat artmış olduğu belirtilmiştir (104). Çeşitli maligniteler ve romatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ajan olan siklofosfamidin ise mesane kanseri riskini yaklaşık beş kat arttırdığı bildirilmiştir (105,106).

Enfeksiyonlar ve Diğer Tıbbi Durumlar

Rekürren idrar yolu enfeksiyonu öyküsünün mesane kanseri riskini arttırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir (27). Mesane kanseri enfeksiyon ilişkisinin en açık örneği şistozomiyazistir ve Schistosoma haematobium mesane kanseri ilişkisi ilk kez 1911 yılında ortaya konulmuştur (107). En sık Kuzey Afrika'da görülen ve skuamoz hücreli mesane kanseri ile ilişkili olan şistozomiyazisin yumurta birikimine bağlı inflamasyon ve immünolojik yanıt aracılığı ile mesane kanserine yol açtığı gösterilmiştir (108). Birkaç çalışmada mesane kanseri riski ve üriner sistem enfeksiyonu öyküsü arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır (109,110). Buna karşın daha sonraki meta-analizlerde idrar yolu enfeksiyonu (İYE) ve sistit öyküsünün mesane kanseri riskini arttırdığına yönelik bulgular saptanmıştır (111–113).

Vermeulen ve arkadaşlarının çalışmasında İYE ve mesane kanseri arasında pozitif ilişki bulunmasına rağmen, İYE sayısının 5'in altında olan ve antibiyoterapi ile tedavi öyküsü olan bazı alt gruplarda mesane kanseri riskinin azalmış olduğu görülmüştür (111). Bu konuyu ele alan bir sistematik derleme ve meta-analizde İYE ve mesane kanseri arasında ilişki bulunmasına karşın 2000 yılında önce yapılan ve bias riski yüksek olan çalışmalar dışarıda tutulduğunda mesane kanseri riski ile İYE arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (113). Başka bir çalışmada ise İYE öyküsünün mesane kanseri riskini azalttığına yönelik ters bir ilişki saptanmıştır (114).

Human papilloma virüs mesane kanseri ilişkisini inceleyen bir meta-analizde 18 çalışma ele alınmış ancak anlamlı herhangi bir ilişki saptanamamıştır (115). Mesane kanseri riski açısından ele alınan bir başka virüs ise BK virüstür ve yapılan çalışmalarda BK virüs mesane kanseri ilişkisi gösterilmiştir (116,117). Başka bir çalışmada ise mesane kanseri riski ile bakteriyel enfeksiyonlar, HPV, BK virüs, HIV, HSV enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (118).

Üriner mikrobiyota mesane kanseri ilişkisi son yıllarda artan bir ilgi ile ele alınan bir konudur. Yapılan çalışmalarda mesane kanseri olan kişilerde sağlıklı popülasyona göre bazı bakteri türlerinde ve bakteri çeşitliliğinde değişiklik saptanmıştır (119–121). Xu ve arkadaşları mesane kanseri hastalarının idrar mikrobiyotasında sağlıklı bireylerin idrarına göre Pseudomonas ve Anaerococcus bakterilerinin daha baskın olduğunu ve Streptococcus'un daha düşük olduğunu göstermiştir (121). Ancak mikrobiyota ve mesane kanseri ilişkisinde net bir sebep sonuç ilişkisi kurulabilmesi için gelecek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kalıcı üretral kateter kullanımının spinal kord hasarı olmayan hastalarda dahil mesane kanseri riskini arttırdığı ve bu riskin 60 yaş altındaki bireylerde daha yüksek oranda arttığı gösterilmiştir (122). Patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte spinal kord hasarı ile mesane kanseri riski arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir (123–126). Bir çalışmada spinal kord hasarı olan hastalarda artmış kanser riskinin yalnızca kateter kullanımı ile açıklanamayacağı gösterilmiştir (126). Ayrıca spinal kord hastalarında mesane kanserinin tanı anında daha ileri evre olduğu, daha agresif ve daha mortal seyrettiği gözlemlenmiştir (124,125).

Üriner sistem taşı ile mesane kanseri riskinin araştırıldığı bir meta-analizde üriner sistem taş hastalığı olanlarda mesane kanseri riskinin 1.87 kat daha fazla olduğu ve kanser riskinin mesane taşı olanlarda böbrek taş olanlara kıyasla daha yüksek olduğu (2.17'ye karşın 1.38 kat) gösterilmiştir (127). Mesane ekstrofisi olan olgularda mesane kanseri riskinin artmış olduğu ve olguların %90'ının mesane adenokarsinomu olduğu belirtilmiştir (27,128). Spina bifida olgularında da mesane kanseri riskinin yüksek olduğu, kanserin daha erken yaşta görüldüğü, daha agresif ve mortal seyrettiği gösterilmiştir (129). Konjenital mesane anomalisi olan hasta grubunda; tıbbi gelişmeler ve artan bakım imkanları sonucu yaşam sürelerinin uzaması ile beraber malignite riskinin daha da önem kazanacağı vurgulanmıştır (27).

2.1.3 Tanı ve Evreleme

Mesane kanserinde en sık görülen semptom ağrısız, pıhtılı, makroskopik hematüridir (130). Mesane kanseri tanısı sistoskopi esnasında cold-cup biyopsi veya transüretral rezeksiyon (TUR) ile alınan dokunun patolojik incelenmesi ile konur. İdrar sitolojisi karsinoma in situ (KİS) veya özellikle yüksek dereceli karsinom varlığında tanıya yardımcı olur (131,132). Rezeksiyon esnasında tümörün yeri, boyutu, sayısı, görünüm özellikleri ve mukozal anomaliler not edilmelidir (131).

Mesane kanseri mesane lümenini oluşturan ürotelyal hücrelerin kanseridir. Histopatolojik olarak %75'i pür ürotelyal karsinomdur, %25'inde ise varyant histoloji bulunur ve bu durum hastalığın yönetimini güçleştirir (133). Mesane kanseri TNM evrelemesi 2009 yılında UICC (The Union for International Cancer Control) tarafından onaylanmış ve 2017 yılında güncellenmiştir (Tablo 1), (132). Mesane kanseri duvar invazyonunun derecesine göre; kasa invaze olan (T2-4) ve olmayan (Ta,Tis,T1) olarak iki gruba ayrılır ve hastaların %70-80'i tanı anında kasa invaze olmayan mesane kanseri (KIOMK) evresindedir (134). Mesane kanseri aynı zamanda DSÖ'nün (Dünya Sağlık Örgütü) tanımladığı histomorfolojik özelliklere göre düşük ve yüksek dereceli olarak iki ayrı gruba ayrılmaktadır. KIOMK grubu hastalar; duvar invazyonu evresi, patolojik derece, hastanın yaşı, tümörün boyutu ve sayısı, varyant

histoloji ve lenfovasküler invazyon varlığına göre hastalık nüks ve progresyonu (kas invazyonu gelişimi) için risk gruplarına ayrılırlar.

Tablo 1. 2017 TNM mesane kanseri patolojik evrelemesi

T-Primer Tümör	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre dair kanıt yok
Ta	İnvaziv olmayan papiller karsinom
Tis	Karsinoma in situ
T1	Subepitelyal bağ dokuya invaze tümör
T2	Kasa invaze tümör
T2a	Süperfisiyal kasa invaze tümör (iç yarısı)
T2b	Derin kasa invaze tümör (dış yarısı)
T3	Perivezikal dokuya invaze tümör
T3a	Mikroskopik
T3b	Makroskopik (ekstravezikal kitle)
T4	Prostatik stroma, seminal vezikül, uterus, vajen, pelvik duvar veya abdominal duvar invazyonu
T4a	Prostatik stroma, seminal vezikül, uterus veya vajen invazyonu
T4b	Pelvik duvar veya abdominal duvar invazyonu
N- Bölgesel Lenf Düğümleri	
NX	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf düğümü metastazı yok
N1	Gerçek pelvis içi (hipogastrik, obturator, eksternal iliak veya presakral) bir lenf düğümü
N2	Gerçek pelvis içi birden çok lenf düğümü
N3	Common iliak lenf düğümlerinde metastaz
M- Uzak Metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1a	Bölgesel olmayan lenf düğümü metastazı
M1b	Diğer uzak metastazlar

Hematürinin ilk değerlendirilmesinde genelde bilgisayarlı tomografi (BT) veya abdominopelvik ultrasonografi'ye (usg) başvurulur. Ancak USG'nin duyarlılığı düşüktür ve ürotelyal lezyonları atlayabilir. Kontrastsız-kontrastlı ve geç faz çekimleri içeren multifazik BT ürografi mesane kanserinde en yüksek duyarlılık (%92) ve özgüllüğe (%95) sahiptir. Kontrastlı BT'nin kontrendike olduğu durumlarda MRG-ürografi ve ultrasonografiye başvurulabilir (134). Metastatik hastalıktan şüpheleniliyorsa akciğer grafisi ve abdominopelvik kesitsel görüntüleme mutlaka yapılmalıdır (135).

2.1.4 Tedavi

KİOMK grubu hastalarda tedavinin amacı hastalığın tekrarlamasını ve kasa invaze evreye progresyonunu engellemektir. Bu amaçlar hastalara risk gruplarına göre çeşitli tedaviler verilir ve hastalar yine risk gruplarına göre belirli aralıklarla sistoskopi ile kontrol edilir, gereklilik durumunda TUR yapılır.

Düşük-risk grubundaki KİOMK hastalarında tedavi TUR sonrası erken dönemde (ilk 24 saat) tek doz intravezikal kemoterapi uygulamasıdır. Literatürde bu şekilde uygulanan Mitomisin C, Epirubicin, Piraribusin ve Gemsitabinin etkinliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (136,137). Düşük-orta risk grubundaki seçilmiş hasta gruplarında tekrarlayan intravezikal kemoterapi instilasyonlarının fayda gösterdiği bilinmektedir (132).

Orta ve yüksek-risk grubundaki KİOMK hastalarında ise önerilen tedavi TUR sonrası intravezikal BCG (Bacillus Calmette-Guérin) immünoterapisidir (138). Morales tarafından tanımlanan tedavi planlaması revize edilerek günümüzde kullanılmaktadır. 6 kür indüksiyon BCG sonrası hastanın klinik ve patolojik özelliklerinde göre 1-3 yıl kadar devam edecek 3'er kürlük BCG idame tedavisi verilmektedir (132,138). BCG'nin başarısız olduğu durumlarda ise mortalite ve morbiditesi yüksek bir operasyon olan radikal sistektomi önerilmektedir (27). Altın standart tedavi yöntemi olmakla beraber BCG immünoterapisi sonrası hastalığın rekürrens oranı %40, progresyon oranı ise %10'u bulabilmektedir (139,140). BCG

başarısızlığını öngörmeye kullanılabilecek genetik, moleküler adaylar veya üriner sitokinler incelenmiş olsa da klinik kullanımda etkisi olabilecek bir biyobelirteç henüz bulunmamaktadır (141). Yapılan bazı çalışmalarda çeşitli nedenlerden dolayı anti-androjen tedavi alan KİOMK hastalarında düşük rekürrens ve progresyon oranı ve artmış tedavi yanıtı gözlemlenmiştir (16,17,142).

Kasa invaze mesane kanserinde ise metastaz riski artmıştır ve hastaların tedavisi metastaz durumuna göre belirlenir. Lokalize hastalık varlığında radikal sistektomi veya neoadjuvan sistemik kemoterapi sonrası radikal sistektomi altın standarttır. Radikal sistektominin uygun olmadığı hasta grubunda sistemik kemoterapi, radyoterapi ve aralıklı TUR'lerden oluşan trimodal tedavi modaliteleri hastaya önerilebilir. Metastaz varlığında ise sistemik kemoterapi, immünoterapi ve palyasyon amaçlı müdahaleler tedaviyi oluşturur (27).

Hem kasa invaze olmayan hem de kasa invaze olan mesane kanserinde tedavi yanıtlarını arttırmak için yeni jenerasyon ilaç (pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, enfortumab, TLD1433, Toca511, BC-819, COXEN, vb.) içeren birçok çalışma mevcuttur (143,144).

2.2 Androjen Reseptörü

Androjenler erkek ürogenital sstem gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Erkeklerin ana steroidi androjenlerdir ve embriyogenez sırasında erkek fenotipin oluşmasında ve pubertede seksüel maturasyonun sağlanmasında önemli rol oynarlar (145). Androjenler etkilerini hücre çekirdek reseptörü ailesinin ailesinin özelleşmiş bir reseptör olan ligand bağımlı androjen reseptörü (AR) aracılığıyla gerçekleştirirler (145,146). Bu ailenin içinde diğer steroid hormonlarının reseptörleri, retinoid reseptörleri, tiroid reseptörleri ve artan sayıda yetim reseptör bulunmaktadır (147,148). Erkeklerdeki temel androjenler olan testosteron ve daha potent metaboliti dihidrotestosteron farklı etkilerini aynı AR üzerinden gerçekleştirmektedir, bu durumun liganda özgü bir transkripsiyon aracı faktörü bulunması sayesinde olduğu düşünülmektedir (146). AR uyarılması erkek üreme sistemi ve erkek fenotipin

oluşması ve devamına katkıda bulunurken kas ve kemik, nöral sistem, immün sistem, kardiyovasküler sistem ve hematopoetik sistem gibi diğer yapıların da gelişimini sağlar (145,149).

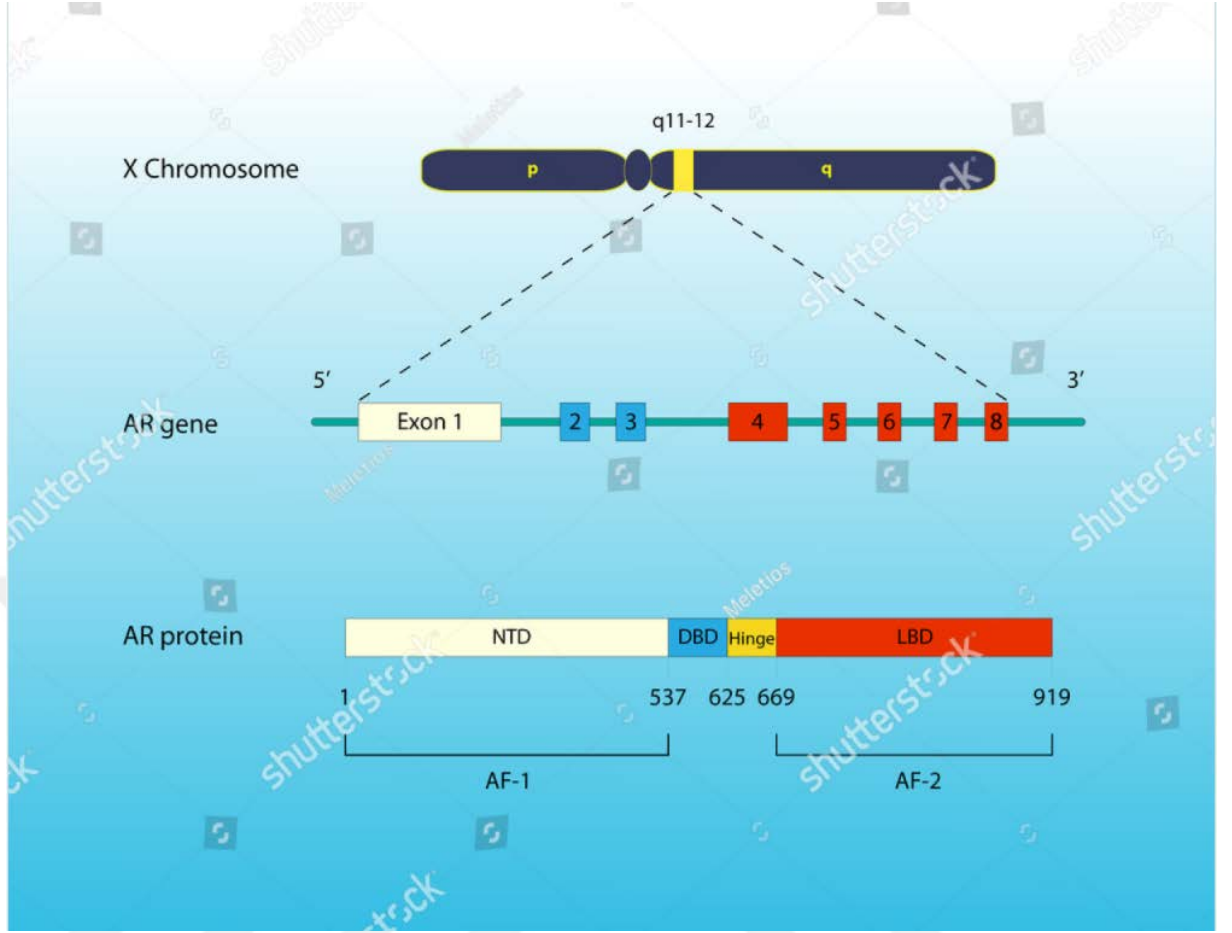
Ligand ile indüklenebilen bir transkripsiyon faktörü olarak davranan AR inaktif haldeyken hücre sitoplazmasında ısı şok proteinlerine ve şaperon proteinlere bağlı olarak bulunur (145). AR fonksiyonel bölgelere sahip bir modüler proteindir. Bu bölgeler; N-terminal regülatuar bölge (NTD) , DNA bağlanma bölgesi (DBD), küçük menteşe bölgesi ve C-terminal ligand bağlanma bölgesidir (LBD) (145). Birçok izoformu bulunmaktadır ve en dolu ve uzun versiyonu 920 aminoasitten oluşmaktadır (149). NTD bölgesinde iki bağımsız aktivasyon bölgesi bulunmaktadır, bunlar aktivasyon fonksiyonu-1 (AF-1) ve aktivasyon fonksiyonu-5 (AF-5) bölgeleridir (149). AR'nin transkripsiyonel aktivasyonunun gerçekleşmesi için bu iki bölge gereklidir (150). Buna ek olarak ko-regülatuar bağlanma noktaları, fosforilasyon bölgelerinin büyük bir kısmı ve NTD ve LBD etkileşiminde rol oynayan önemli ara bölgeler NTD üzerinde bulunmaktadır ve transkripsiyon aktivasyonunun gerçekleşebilmesi için neredeyse tüm NTD gereklidir (149). Bu durum NTD'ye yönelik özellikle AF-1'i hedefleyen küçük inhibitör moleküllerin AR aktivitesinin engelleme potansiyeli olduğunu düşündürmektedir (149). Androjen bağlanması ile birlikte AR'de bir takım yapısal değişiklikler meydana gelir ve AR ısı şok proteininden ayrılır ve dimerizasyon, fosforilasyon gibi bir takım işlemlerden geçer (151). Daha sonra AR hücre çekirdeğine ilerler. DNA'da androjen reseptörü elemanları (ARE'ler) tarafından tanınırlar. ARE'ler tarafından tanınmada DBD bölgesi önemli rol oynar (149). DBD bölgesinin yüzeyinde bir inhibitör bölgesi bulunduğu bilinmektedir ancak AR, glukokortikoid reseptörleri, mineralokortikoid reseptörlerinin sekanslarının benzerliği %70 oranındadır. Bu durum da AR DBD'ye yönelik bir spesifik inhibitör geliştirilmesini zorlaştırmaktadır (151,152). Menteşe bölgesi ise çekirdek bölgesi olmanın yanı sıra DNA bağlanması, koaktivatör/korepressör çağırılması ve intramoleküler etkileşimde önemli rol oynar. Ayrıca asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlar için önemli bir hedef bölgedir (149). LBD bölgesine agonist bir ligandın bağlanması sonucu AF2 bölgesi indüklenir. Bu bölge koaktivatör çağırılması ve AR aktivitesinin yükseltilmesi açısından önemlidir (149). DBD ve LBD bölgelerinin ligand, DNA ve kofaktör bağlanma

yüzeylerinin X-ray kristal yapıları bilinmektedir ve bu durum androjenlerin LBD bağlanma noktalarının ve koordinasyonlarının iyi karakterize edilebilmesini sağlamaktadır. Tanımlanan bu bölge enzalutamid gibi anti-androjen bileşenlerin en iyi anlaşılmış hedef noktasıdır (152). DNA bağlanmasının ardından koaktivatörlerin de devreye girmesiyle histon asetilasyonu ile kromatin remodelizasyonu gerçekleşir. Böylece diğer transkripsiyon faktörlerinin de promotor bölgeye bağlanması sağlanır. Sonuç olarak RNA polimeraz 2 aracılığı ile transkripsiyon hızı artar (146).

AR'leri etkisinin büyük bir kısmı AREler aracılığı ile gerçekleşiyor olsa da androjenler indirekt yollar ile ARE aracılığı olmadan da çeşitli genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Androjenler indirekt etkilerini, sekonder transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon veya aktivasyonu, büyüme faktörlerinin otokrin veya parakrin etki ile üretimi veya diğer hormonların ekspresyonlarının değişimi ile sağlamaktadır (145). Androjen reseptörünün düzgün bir şekilde çalışması; büyüme, gelişme ve insan vücudunun sağlığını sürdürmesi açısından önemli genlerin ekspresyonlarının düzgün olmasını sağlar (149).

AR geni X kromozomunun q11-12 bölgesinde bulunur ve geleneksel transkripsiyon sürecinde 8 ekson bir arada birleştirilerek tam uzunlukta – geleneksel - (full-length) AR (AR-FL) sentezlenir (153). İlk iki eksondan sonra farklı kriptik eksonların (CE) birleştirilmesi ile AR-FL nin düşük molekül ağırlıklı izoformları sentezlenir. Bu izoformlara “Androjen Reseptörü Splice Varyant” denmektedir ve günümüzde tanımlanan 30'dan fazla varyant bulunmaktadır (153).

AR-FL'nin NTD bölgesi ekson 1 tarafından kodlanmaktadır, proteinin %60'ını oluşturur ve ligand bağımsız olan aktivasyon fonksiyonu 1 (AF-1)'i bulundurur. DBD bölgesi ekson 2 ve 3 tarafından kodlanmaktadır. HR bölgesi ekson 4'ün bir kısmı tarafından kodlanmaktadır. Ligand bağımlı olan AF-2 ise LBD bölgesinde bulunmaktadır ve ekson 4-8 arasındaki eksonlar tarafından kodlanır (154). Ayrıca AR'nin nükleer lokalizasyonunu belirleyen nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ekson 3 ve 4 tarafından kodlanır, ekson 5 ve 6 tarafından ise ligandla düzenlenen nükleer eksport sinyali (NES) kodlanmaktadır, HSP bağlantı bölgesi ise ekson 5 tarafından kodlanmaktadır (Şekil 1) (154).



Şekil 1. AR transkripsiyon ve translasyonu

Androjen reseptörlerinin ekspresyonu ve sinyalinin kardiyovasküler hastalıklar, prostat kanseri, meme kanseri, Kennedy sendromu, spinal bulbar musküler atrofi, over kanseri, pankreas kanseri, böbrek kanseri, mesane kanseri, akciğer kanseri ve karaciğer kanseri gibi hastalıklarla ilişkisi bilinmektedir (145,146,149).

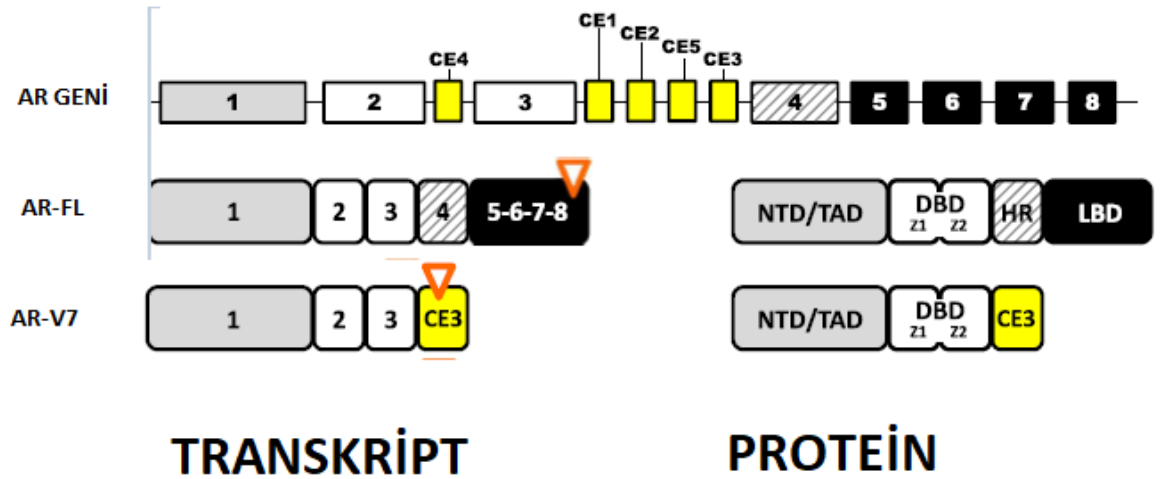
Androjen reseptörlerinin en iyi ilişkilendirildiği hastalıklardan biri erkeklerde kanser ilişkili ölümlerin beş en sık sebebinden biri olan prostat kanseridir (PCa) (149). Androjen deprivasyon tedavisine (medikal veya cerrahi) PCa tedavisinde sıklıkla başvurulmaktadır. Ancak zaman içerisinde hastaların kastrasyonu sağlanmış olmasına rağmen hastalığın progresyon göstermesi ile hastalık kastrasyona dirençli prostat kanserine (KDPCa) dönüşmektedir (155). 20 yıl öncesine kadar KDPCa, hatalı şekilde, hormon-refrakter veya androjen bağımsız olarak tanımlanmaktaydı. Ancak yapılan çalışmalar ile bu grup hastalarda AR ekspresyonunun, mutasyon veya alternatif ligandlar nedeniyle, daha yüksek olması sonucu hormon dirençli hastalık

geliştiği (156–158) ve AR aktivitesinin daha etkin şekilde durdurulmasıyla yalnızca erken evre değil geç evre KDPCa’nın da tedavi edilebileceği gösterildi (149). LBD bölgesine yönelik birinci jenerasyon anti-androjenler flutamid, nilutamid ve bikalutamid prostat kanseri tedavisinde kullanılmaktadır ancak düşük AR afinitesi sebebiyle lüteinizan hormon-salgılatıcı hormon (LHRH) agonisti ile birlikte kullanılırlar. Ne yazık ki belirli bir süre kullanım sonrası dirençli mutasyon gelişimine sebep olabilirler ve dahası mutasyona uğramış AR için parsiyel veya mikst agonist gibi davranabilirler (149). Bu gibi durumlarda ikinci jenerasyon anti-androjen olan enzalutamid daha etkilidir ancak izin verilen 160 mg/gün dozajında enzalutamid tam antagonizasyonu sağlayamadığından ve daha yüksek dozlarda verilmesi yorgunluk veya nöbet geçirmeye sebep olabileceğinden enzalutamid de mükemmel bir ilaç değildir, ayrıca enzalutamide dirençli mutasyonlar da meydana gelmektedir (159,160). Abirateron ise CYP17 inhibisyonu aracılığı ile testis, sürrenal bez ve tümörde androjen sentezini durdurur. Cerrahi kastrasyon veya LHRH agonisti ile birlikte kullanıldığında serum testosteron seviyelerini 20/50 ng/dL’den 1-2 ng/dL’ye çekerek bir süper-kastrasyon yaratır. Ayrıca tümör içindeki testosteron sentezini de azaltır ve AR inhibisyonuna yol açar (161). Ancak enzalutamid gibi abiraterona da direnç AR bağımlı veya AR bağımsız yolaklar aracılığı ile gelişebilmektedir. Daha potent ve daha yüksek afiniteye sahip üçüncü kuşak LBD bölgesini hedefleyen anti-androjenler gelişim aşamasında olsa da bu ilaçlar da zamanla birlikte LBD mutasyonları karşısında etkisiz kalabilirler. Ayrıca bu yeni ilaçların da AR splice varyantlarına karşı etkinlikleri bilinmemektedir (161). Bu sorunların üstesinden gelebilmek adına AR’nin NTD ve DBD bölgelerini hedefleyen yeni ajanlar geliştirilme aşamasındadır (149,161).

2.2.1 Androjen Reseptörü Splice Varyant 7 (AR-V7)

AR-FL’nin çeşitli kısımlarının kesilmesi ile ortaya çıkan ve aktif olan 30’dan fazla “AR-Splice Varyant” (AR-V) bulunmaktadır (153). Prostat kanseri örneklerinde de , LBD bölgesinin çeşitli kısımlarını taşımayan 20’den fazla AR-V’nin varlığı bilinmektedir (162). AR-V7 (Eski adı ile AR3) şimdiye kadar en çok üzerinde

durulmuş olan AR-V'dir. Bunun başlıca nedeni rölatif bolluğu, saptanma sıklığı ve KDPCa'da oynadığı rolden kaynaklanmaktadır (163). AR-V7, NTD ve DBD bölgelerine sahipken AR-FL'nin aksine LBD bölgesi taşımamaktadır, bu nedenle de ligand bağımsız şekilde DNA'ya bağlanıp transkripsiyonu başlatabilmektedir (21). AR-V7 mRNA ekson 1-3 ve kesilmiş ekson 3 (CE-3)'ten oluşmaktadır ve bu genin ürünü NTD ve DBD bölgelerini ve CE-3 tarafından kodlanan eşsiz bir C-terminal peptit sekansını içermektedir, bu sekansın NLS aktivitesi predominant nükleer lokalizasyon ile AR-V7'nin yapısal aktivitesini desteklemektedir (Şekil 2). AR-V'lerin sentezlerinin pre-mRNA seviyesinde alternatif splicing sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. AR-V7 sentezinde, splicing faktörlerden SRSF1, U2AF65 ve hnRNPA1'in çeşitli basamaklarda rol oynamaktadır (154).



DBD: DNA Bağlayıcı Bölge **NTD:** N-Terminal Bölge **HR:** Menteşe Bölgesi
CE: Kesilmiş Ekson (KE) **LBD:** Ligand Bağlayıcı Bölge

Şekil 2. AR-FL ve AR-V7 transkript ve protein

Primer prostat kanserinde AR-V7 nadiren eksprese edilmektedir, ancak androjen deprivasyon tedavisi uygulanan hastalarda saptanma oranı daha yüksektir ve ikinci basamak androjen supresyon tedavisi sonucu ekspresyonu daha da artmaktadır (163). AR-V7'nin abirateron ve enzalutamid tedavilerine direnci ön görmede biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini gösteren yayınlar mevcuttur (22,23,164). AR-

V'lerin kesik uçları son yıllarda farklı ajanların bağlanabileceği yeni bir hedef olarak görülmektedir ve bu hedefe yönelik ilaç çalışmaları gerçekleştirilmektedir (153).

AR-V'lerin tümör hücresi proliferasyonunun kompleks düzenleyici mekanizmalarında kritik rol oynadığı bilinmektedir (165). AR-FL ve AR-V'lerin nükleusa girmesi için dimerize olmaları gerekir. AR-V'ler hem homodimerizasyonla hem de androjen yokluğunda AR-FL ile heterodimerizasyon gerçekleştirerek nükleusa gidip aktivite gösterirler (166). AR-V'lerin farklı varyantları heterodimerizasyon oluşturarak birbiri üzerinde sinerjistik veya inhibitör etki gösterebilirler. Primer hormona duyarlı prostat kanserinde AR-V7'nin etkisinin AR-V1 ile birleştiği zaman inhibe olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada AR-V1'in AR-FL'yi aktive ettiği de belirtilmiştir (166).

BPH ve primer prostat kanserinde AR-FL ve AR-V'lerin (AR-V1, AR-V4 ve AR-V7) hem mRNA seviyelerinin hem de İHC ile protein seviyelerinin (AR-FL ve yalnızca AR-V7) kıyaslandığı bir çalışmada AR-FL mRNA ekspresyonları iki grup arasında benzer bulunmuştur. AR-V4 mRNA ekspresyonu BPH grubunda daha yüksek oranda saptanırken AR-V1 ve AR-V7 mRNA ekspresyonu prostat kanseri olan grupta daha yüksek saptanmıştır. Protein seviyesinde ise nükleusta ölçülen AR-FL benign prostat dokusunda daha yüksek olarak saptanmış, AR-V7 proteininin istatistiksel olarak belirgin olmasa da benign dokuda daha yüksek oranda olduğu gösterilmiş ve çalışmanın sonunda AR-V'lerin rolünün daha iyi anlaşılması için gelecek çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (165).

AR-V'lerin en sık araştırıldığı ve en yakından ilişkilendirildikleri kanser de AR'de olduğu gibi, prostat kanseridir ancak meme kanseri ve hepatosellüler karsinom ile AR-V'ler arasında ilişki olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (19,20). Literatürde AR-V'ler ile mesane kanseri ilişkisini inceleyen sadece bir çalışma vardır. AR-V19 varyantının mesane kanser dokusunda bulunduğu gösterilmiş ve AR ve AR-V yolağının inhibisyonunun mesane kanseri tedavisinde rol oynayabileceği belirtilmiştir (167). Henüz mesane kanseri ve sağlıklı doku arasında AR-V'lerin düzeylerinin kıyaslandığı bir çalışma mevcut değildir.

2.3 Androjen Reseptörü ve Mesane Kanseri İlişkisi

Mesane kanserinin erkek cinsiyet baskın bir kanser olması ve diğer organların büyüme ve tümörögenezinde AR'nin rolü olduğunun bilinmesi mesane kanserinde de AR'nin rol oynayabileceği hipotezini doğrumuştur. Mesane kanserinin erkeklerde kadınlara oranla yaklaşık üç kat daha fazla görülmesinin sebebi geçtiğimiz dekatlarda sigara ve endüstriyel karsinojen maruziyeti ile ilişkili olarak değerlendirilse de son yıllarda bu risk faktörleri eşitlendiğinde bile cinsiyet farklılığının devam ettiği gösterilmiştir (2,168).

Preklinik çalışmalarda; fareler üzerinde N-butil-N-(4-hidroksibutill) nitrözamin (BBN) ile indüklenen mesane kanseri gelişimi ile AR ilişkisi incelenmiştir (3). Fareler kadın-erkek, kastre-normal ve ARKO (AR tamamen etkisiz hale getirilmiş) ve yabanıl tip fareler olarak gruplara ayrılmış ve BBN'ye maruz bırakılmıştır. Çalışmanın sonunda kastre farelerde, yabanıl farelere oranlar mesane kanseri görülme oranı yarıya düşerken ARKO farelerin hiçbirinde mesane kanseri gelişmediği gösterilmiş ve BBN indüklü mesane kanserinde AR'nin rolü ortaya konmuştur. Seks hormon reseptörleri ile mesane kanserinin incelendiği başka bir çalışmada hücre kültüründe seks hormon reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri ile mesane karsinogenezi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (5).

AR'nin mesane kanseri üzerindeki etkisini değerlendirmek için bazı çalışmalarda mesane kanseri olan ve aynı zamanda prostat kanseri nedeniyle ADT alan hastalar incelenmiş ve ADT alan grupta mesane kanseri insidans, progresyonu ve rekürrensının daha düşük olduğu gösterilmiştir (16,17). Yine 72 binden fazla bireyin ele alındığı gözlemsel çalışmada ise 5 alfa redüktaz inhibitörü olan finasterid kullanımının mesane kanseri insidansını düşürdüğü gösterilmiştir (142).

Klinik çalışmalarda ise AR'nin mesane kanserindeki rolü ve prognoza olan etkisinin sonuçları tartışmalıdır. İHC ile yapılan çalışmaların bir kısmında sağlıklı dokuda mesane kanserinden daha fazla AR pozitifliği saptanırken (5,6,169) bazı çalışmalarda mesane kanserinde AR pozitifliği daha yüksek bulunmuştur (9,10,170).

Boorjan ve arkadaşları İHC ile yaptıkları çalışmada AR proteininin mesane kanseri dokusunda komşu sağlıklı dokuya oranla daha düşük oranda saptadıklarını belirtmiştir ayrıca AR ekspresyonunun patolojik tümör evresi ile ters orantılı olduğunu belirtmiştir (169). Miyamoto ve arkadaşları AR ve östrojen reseptörü (ÖR) ekspresyonlarını mesane kanseri ve non-neoplastik dokuda IHC kullanarak kıyaslamış, kanserli dokuda belirgin olarak AR ekspresyonu kaybı olduğu ve yüksek dereceli/invaziv olgularda düşük dereceli/invaziv olmayan olgulara göre belirgin şekilde AR ekspresyonu kaybı olduğunu gözlemlemiştir, ancak AR ekspresyonu ile rekürrenssiz veya progresyonsuz sağ kalım ilişkisini ortaya koyacak veri saptamamıştır (5). Yine başka bir çalışmada radikal sistektomi materyalindeki karsinom ve benign ürotelyum dokuları AR ve AR'nin ko-regülatör proteinlerinin (JMJD2A ve LSD1) ekspresyonları IHC ve real-time PCR (RT-PCR) tekniği ile incelenmiş, malign dokuların %50'sinde benign dokuların ise %16'sında AR ekspresyonu kaybı olduğu gözlenmiş ve AR ekspresyonu kaybının invaziv tümör ile ilişkili olduğu saptanmıştır (6). Ayrıca JMJD2A proteini ekspresyonu da malign dokuda daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür (6). Ancak bu çalışmalara karşın IHC boyama ile yapılan ve biri ülkemizden olan üç farklı çalışmada mesane kanseri dokusunda AR pozitifliği saptanırken normal dokuda AR pozitifliği %0 olarak saptanmıştır (9,10,170). Tuygun ve arkadaşları yaptıkları çalışmada mesane kanseri olan hastalarda sağlıklı hastalardan aldıkları benign ürotelyum örneklerini AR ve ÖR ekspresyonu açısından IHC kullanarak kıyaslamış ve sağlıklı popülasyonda AR ekspresyonu pozitifliğini %0 olarak saptamış, buna rağmen malign dokuda tümör evresi ve derecesi arttıkça AR ekspresyonu pozitifliğinin düştüğünü gözlemlemiş ve AR ile rekürrenssiz ve progresyonsuz sağ kalım arasında fark saptamamıştır (9).

Miyamoto, Kauffman, Nam ve Tuygun İHC ile yaptıkları çalışmalar sonucunda mesane kanserinde tümör evresi ve derecesi ilerledikçe AR pozitifliğinin azaldığını göstermişlerdir (6,9,171). Buna karşın Mir ve arkadaşları 472 mesane kanseri ile iki farklı merkezde yaptıkları İHC çalışmasında AR pozitifliğini %10-15 oranında saptarken, AR pozitifliği ile rekürrens, ölüm, tümör evresi ve derecesi arasında ilişki saptamamışlardır (7).

Yonekura ve arkadaşları ise yaptıkları IHC çalışmasının sonucunda AR ekspresyonu negatifliğinin ilk ve çoklu rekürrens için bağımsız bir risk faktörü

olabileceğini göstermiş ve sonuç olarak AR ekspresyonu negatif olgularda daha yakın izlem gerekebileceğinden bahsettiler (12).

İHC çalışmaları üzerinde yapılan bir derlemede yüksek dereceli tümörlerde düşük dereceli tümörlere göre AR'nin down-regüle olduğu ve AR pozitif grupta rekürrens daha düşük olduğu görülmüştür (4,171). Aynı derlemede non-neoplastik dokuda AR pozitifliği %58-86 oranında saptanırken transizyonel hücreli karsinomda AR pozitifliği %13-55 olarak saptanmıştır.

11 İHC çalışmasının ele alındığı güncel bir derlemede ise AR pozitifliği ile tümör evresi, derecesi ve progresyon arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken AR ekspresyonunun kaybının artmış rekürrens ile ilişkili olduğu saptanmıştır ve AR'nin mesane kanseri davranışını öngörmeye bir marker olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (8). Bu derlemedeki ele alınan çalışmalarda IHC ile ölçüldüğü zaman mesane kanserinde AR pozitifliğinin %8,7 ile %75 arasında değiştiği görülmüştür ve literatürdeki çelişkili sonuçların nedeninin yöntemsel olabileceği vurgulanmıştır. Derlemenin sonucu olarak; AR ekspresyonu ve rekürrenssiz sağ kalım arasında bulunan direkt kolerasyonun, mesane kanseri davranışında AR ekspresyonunun potansiyel bir belirteç olarak işaret edebileceği belirtilmiştir (8).

AR protein verisi eldesinde yapılan çalışmalarda genelde IHC kullanılmakla birlikte son yıllarda yapılan daha az sayıda çalışmada Western Blot yönteminin kullanıldığı görülmektedir. Bu iki yöntemin kıyaslamasına bakıldığında IHC basit, ucuz ve protein eldesi kolay bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Ancak İHC nin dezavantajları semikantitatif olması, gözlemciye dayalı olması, standardize bir cut-off değerinin olmaması, antikör epitop ve antijen eldesindeki farklılıklar, ve laboratuvar kaynaklı farklılıklar olarak sıralanabilir (8,172). Ayrıca İHC yönteminin nükleer AR ekspresyonunun yalnızca % 5.7 sini, nükleer + sitoplazmik AR ekspresyonunun ise yalnızca % 26.3'ünü saptayabildiği gösterilmiştir (172). Buna karşın çalışmamızda protein verisi eldesinde kullanılan Western blot yöntemi, tekrarlanabilir, spesifik epitoplara sahip, düşük miktardaki proteini bile saptayabilen ve yüksek kantitatif sensitiviteye sahip bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.

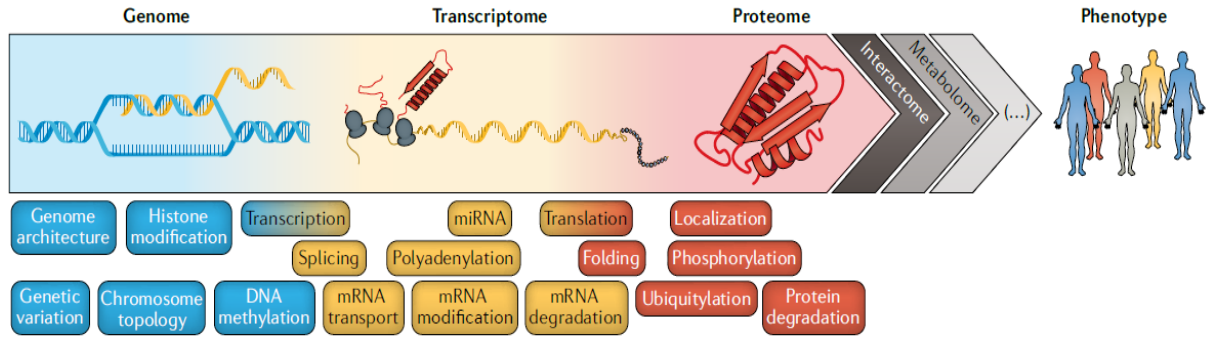
AR mRNA ekspresyonunu ele alan iki farklı real-time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile yapılan çalışmada ise AR mRNA ekspresyonu

yüksekliğinin iyi prognoz ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (11,172). Az sayıda çalışma olsa da qRT-PCR ile yapılan çalışmalar tutarlıdır ve bu yöntem mRNA seviyesi ölçümünde altın standarttır. Çalışmamızda mesane kanseri ve sağlıklı dokuda AR-FL ve AR-V7 mRNA seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile ölçülmüştür.

AR sinyal yolağının mesane kanserinde üzerinde etkisi olduğu bilinmekle birlikte tedavi direnci ile ilişkili olduğunu belirten yayınlar da mevcuttur (13,173). Mesane kanserinde direkt AR yolağını hedef alan yeni ilaçlar geliştirilme aşamasındadır ve klinik çalışmalar sürmektedir (174).

2.4 mRNA ve Protein Ekspresyonu Arasındaki İlişki

Gen kavramının ortaya çıkması ile birlikte bir organizmanın genetik bilgisinin o organizmanın fenotipini belirlemesi ve bu yolağın netleştirilmesi oldukça ilgi çekici bir konu olmuştur. Gen ekspresyonu birçok noktada regülasyonu olan oldukça karışık bir süreçtir. DNA kalıbından RNA sentezlenmesine transkripsiyon denir. Transkripsiyon faktörleri, epigenetik markerlar ve kromatin topolojisi transkripsiyonu kontrol ederken RNA- bağlayıcı proteinler ve kodlanmayan RNA'lar mRNA oluşum sürecini kontrol etmektedir. Transkripsiyonda oluşan mRNA kodu ile aminoasit ve protein sentezine ise translasyon denir. Protein translasyonu da birçok faktörle kontrol edilmektedir, protein yıkımında ise insan sağlığının devamı için ubiquitin-proteozom sistemi ve otofaji kritik düzenleyici roller oynar. Son olarak proteinlerin post-translasyonal modifikasyonu ve diğer proteinler ile etkileşimi ile birlikte fenotip oluşur (Şekil 3) (175).



Şekil 3. Genotip-Transkripsiyon-Translasyon ve fenotip basamaklarının düzenleyicileri

Birçok çalışmada, kolaylık sağlanması için, gen ekspresyonu kavramı o genin ürettiği gözlemlenebilir bir ürünün - genelde mRNA - ekspresyonu ile eş anlamlı kullanılmaktadır (176). Aslında ne mRNA ne de proteinler “eksprese” edilen kavramlardır, ancak ve ancak genlerin fenotipe yansımaları yolunun aydınlatılmasında bilgi edinmek için faydalı ara maddelerdir (175). Her ne kadar mRNA ekspresyonu protein sentezi için ilk ana basamaklardan olsa da mRNA ve protein seviyeleri her zaman korelasyon göstermemektedir (175). Bu korelasyon kaybı protein sentezi veya degradasyonundaki yollardan birinde yaşanan problem sonucu meydana gelebilir ve son ürün olan proteinlerin onkogenik olması durumunda bu durum kanser ile sonuçlanabilir (177). Günümüzde bu yolların daha iyi anlaşılması için; kromatin sekanslama teknikleri (ChIq-Seq, ATAC-seq) ile genom hakkında, RNA sekanslama ile transkriptom ve spektrometrik analizler ile proteom hakkında detaylı veri elde etmek mümkündür (178,179).

Özet olarak mRNA ilgili proteinin üretimi için olmazsa olmazdır ancak mRNA seviyesi ve protein seviyesi her zaman korelasyon göstermemektedir. mRNA’nın kendisi de işleme ve fonksiyon gösterme sürecindeki regülatör mekanizmaların bozulması (miRNA, poliadenilasyon, splicing, modifikasyon, degradasyon) ile onkogenik hale gelebilir (175,180) ve bunun sonucunda mRNA seviyesi düşük de olsa sentezi yüksek seviyede uyarabilir. Dahası protein translasyonundaki regülasyon sisteminde (fosforilasyon, ubiquinizasyon, degradasyon) meydana gelen bozukluklar da protein sentez ve aktivasyonunda artışa sebep olabilir. Son ürün olan proteinlerin negatif feed-back mekanizması ile kendi mRNA ekspresyonlarını baskıladığı

bilinmektedir (181). Prostat kanserinde AR proteini lizin-spesifik demetilaz aracılığı ile kendi gen ekspresyonunu baskılamaktadır (182).

Güncel bir çalışmada kastrasyon dirençli prostat kanseri hastalarında androjen deprivasyonu sonrası AR-FL ve AR-V'lerin mRNA ve protein seviyeleri sırasıyla qRT-PCR ve western blot yöntemleri ile incelenmiştir. Androjen deprivasyon tedavisi (ADT) sonrası, AR-FL'nin AR geni üzerindeki negatif feed-back ile baskılayıcı etkisinin ortadan kalktığı ve bunun sonucunda hem AR-FL hem de AR-V mRNA'larının koordine şekilde arttığı, alternatif splicing ile geleneksel splicingin korele olduğu (RNA sekanslama), gösterilmiştir. Ancak, protein düzeyinde AR-V'nin AR-FL'ye oranında belirgin şekilde artış gözlenmiştir. Bunun nedeninin; ADT'nin AR-FL degradasyonunu sağlarken AR-V degradasyonunu sağlamaması ve AR-V 7 translasyonunun daha yüksek etkinlikte ve daha hızlı gerçekleşmesi olduğu gösterilmiştir (181).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma; TÜBİTAK 1003 217S075 proje numaralı bir Faz 2 klinik ilaç çalışmasının kolu olarak yürütülmüş kesitsel bir çalışmadır. Faz 2 klinik ilaç çalışması ve kesitsel çalışma için, Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay (381-SBKA EK 2017/09-03) ve Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK)’dan izin (93189304-514.02.01-E.110805, 17-AKD-71) alındı. Protokol değişiklikleri ve ek iş paketleri (iş paketi 5 ve ek iş paketi 8) için TÜBİTAK ve Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan onay, Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu’ndan (TİTCK) gerekli izinler alındı.

Çalışmanın hedef popülasyonu mesane kanseri grubu için primer ve kasa invaze olmayan orta veya yüksek riskli mesane kanseri olan gönüllü bireyler; kontrol grubu için ise mesane kanseri olmayan ve sistoskopi endikasyonu olan gönüllü bireyler olarak tanımlandı.

TÜBİTAK 127S075 numaralı “Orta ve Yüksek Riskli Yüzeyel Mesane Kanseriinde Bacillus Calmette Guerin (BCG) İmmünoterapisi Eklenen 5-Alfa Redüktaz İnhibitörü Dutasteridin Nüksü ve Progresyonu Önlemedeki Etkililiği ve Güvenliliğinin Araştırılması: Tek Kollu, Faz 2 Klinik Araştırma” projesi kapsamında, çalışmaya dahil olma kriterlerini karşılayan 23 mesane kanseri hastası bilgilendirilmiş gönüllü olur formları (BGOF) imzalatılarak dahil edildi.

Kontrol grubu hastaları için; Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (381-SBKA EK 2020/06-17) ve 20.07.2020 tarih ve 92045188/161.11.1/E.110171 sayılı TÜBİTAK onayı sonrasında eklenen, kontrol grubunun dahil edilmesini kapsayan gözlemsel çalışmaya asemptomatik hematüri nedeniyle polikliniğimize başvuran ve sistoskopi endikasyonu olan 12 hasta gönüllü bilgilendirildikten ve aynı onay tarihi ile onaylanan ikinci bir bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzaladıktan sonra çalışmaya dahil edildi. 12 gönüllüden sistoskopi sırasında sağlıklı mesane dokusu örnekleri alındı.

Çalışmanın birincil amacı orta ve yüksek riskli kasa invaze olmayan mesane kanserinde sağlıklı popülasyona göre AR-FL ve AR-V7 düzeylerini mRNA ve protein düzeyinde karşılaştırmak olarak belirlendi. 23 mesane kanseri dokusunda ve 12 sağlıklı mesane dokusunda AR-FL proteini, AR-V7 proteini, AR-FL mRNA ve AR-V7 mRNA seviyeleri incelendi ve iki grup arasında kıyaslandı.

Tablo 2. Araştırma planı

Nisan 2018- Şubat 2019	Tez önerisi hazırlanması
	Tez önerisi sunumu
Mart 2019- Mayıs 2020	Etik kurul onayı
	Proje önerisinin hazırlanması
Ağustos 2018- Ekim 2020	Örnek toplama süreci
	Malzeme ve hizmet alımı
Haziran 2019- Haziran 2021	qRT-PCR ve WB analizleri ile mRNA ve protein ekspresyonlarının ölçümü
Haziran 2021- Aralık 2021	İstatiksel analizler
	Tez yazım aşaması

Mesane Kanseri Grubu İçin Çalışmaya Dahil Etme Kriterleri

- Primer ve kasa invaze olmayan orta ve yüksek riskli mesane tümörü tanısı almış olması, (T1 olarak sınıflandırılmış, yüksek riskli, tekrarlayan Ta, eşlik eden KİS, 3 cm'den büyük ve çoğul)
- 18 yaşından büyük erkek cinsiyetten hasta olması,
- Alt üriner sistem semptomları olması ve prostat volümü >30 gr olması,
- Çalışmaya uyumluluk gösterebilecek durumda olması,
- ECOG performans skoru iki ve altında olması,
- Bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamış olması.

Mesane Kanseri Grubu İçin Çalışmadan Dışlama Ölçütleri

- Araştırma ürünleri olan BCG veya dutasteridin kontrendike olduğu durumlar veya bu ilaçlara aşırı duyarlılık,
- Hastanın daha önceden BCG kullanmış olması,
- Üst üriner sistemde mevcut ya da geçmiş değişici hücreli karsinomunun olması,
- Mesanenin daha önce kasa invaze olmuş değişici hücreli karsinomunun olması,
- İntravezikal tedaviyi engelleyen mesane disfonksiyonu oluşturan ağır idrar kaçırma, mesane aşırı aktivitesi veya mesane spastisitesi gibi durumların varlığı,
- Bir yıldan az yaşam beklentisi olması,
- Doğumsal veya edinilmiş eş zamanlı bir hastalık, bağışıklığı baskılayıcı tedavi ya da kanser tedavisi nedeniyle bağışıklığın yetersizliği,
- Pelvise uygulanmış radyoterapi,
- Çalışmaya alınmadan önceki beş yıl içinde başka bir malignite öyküsü (derinin melanomatöz olmayan karsinomu),
- Çalışma protokolüne uyma yeteneğini sınırlayabilecek ciddi tıbbi durum ya da psikiyatrik hastalığın olması.

Sağlıklı Kontrol Grubu İçin Çalışmaya Alma Ölçütleri:

- Asemptomatik mikroskopik hematüri nedeniyle üroloji polikliniğinde değerlendirilen ve örneklerin patolojik değerlendirmesinde mesane tümörü saptanmaması,
- 60 yaşından büyük erkek cinsiyetten olma,
- Alt üriner sistem semptomları olması ve prostat volümü >30 gr olması,
- Çalışmaya uyumluluk gösterebilecek durumda olma,
- ECOG performans skoru iki ve altında olması,

- Bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamış olması.

Gözlemsel Çalışma Kontrol Grubu İçin Çalışmadan Dışlama Ölçütleri

- Doğumsal veya edinilmiş eş zamanlı bir hastalık, bağışıklığı baskılayıcı tedavi ya da kanser tedavisi nedeniyle bağışıklığın yetersizliği,
- Pelvise uygulanmış radyoterapi,
- Çalışmaya alınmadan önceki beş yıl içinde başka bir malignite öyküsü (derinin melanomatöz olmayan karsinomu dışında),
- Çalışma protokolüne uyma yeteneğini sınırlayabilecek ciddi tıbbi durum ya da psikiyatrik hastalığın olması.
- Geçirilmiş cinsel yolla bulaşıcı hastalık öyküsü olması,
- Son 1 ay içerisinde antibiyotik kullanım öyküsü olması,
- İdrar analizinde kanıtlanmış enfeksiyon bulgusu olması,
- Bilinen renal hastalığının olması (Glomerülonefritler, böbrek transplantasyonu, kronik böbrek hastalığı, arteriovenöz malformasyonlar, geçirilmiş renal cerrahi, renal kitle veya kist öyküsü vb.),
- Bilinen taş hastalığı öyküsü,
- Antikoagülan tedavi kullanım öyküsü.

Hasta ve sağlıklı gönüllüler bilgilendirilip BGOF imzalatıldıktan sonra sistoskopileri sırasında kanserli hastaların tümör dokularından (n=23) ve kontrol grubu sağlıklı bireylerin (n=12) normal mesane dokularından AR-full length (AR-FL) protein, AR-V7 protein, AR-FL mRNA, AR-V7 mRNA ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi amacıyla dokular toplandı ve uygun koşullarda saklandı. Tüm doku örnekleri (n=35) toplandıktan sonra protein ekspresyon seviyeleri “Western Blot” (WB) metoduyla mRNA ekspresyon seviyeleri ise “Real Time Polimerase Chain Reaction” (rt-PCR) metoduyla analiz edildi.

3.1 Gen Transkripsiyonlarındaki Değişimin qRT-PCR Yöntemi ile İncelenmesi, Primer Seçimi ve Tasarımı

AR-V7 ve AR-FL dizileri Antonarakis ve arkadaşlarının makalesinden alınarak hazırlandı (18). İnternal kontrol olarak normalizasyon genleri GAPDH ve ACTB kullanıldı (Tablo 3). NCBI Primer Blast kullanılarak tasarlanan primerler olası DNA kontaminasyonunun etkilerinin önüne geçmek amacıyla ekson-ekson bağlantı bölgelerini ve/veya intron bölgesi içerecek şekilde seçildi. Daha sonra IDT OligoAnalyzer kullanılarak hairpin, self-dimer ve hetero-dimer yapma ihtimalleri kontrol edildi. UCSC In-Silico PCR analiz aracı kullanılarak tasarlanan primerlerin sadece planlanan bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığı in-silico olarak test edildi.

Tablo 3. Kullanılan primerlerin ve sekans bilgileri

Gen	F/R	Sekans 5'>3'
ACTB	F	TGATGATATCGCCGCGCTC
	R	CATCACGCCCTGGTGCC
GAPDH	F	GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC
	R	GAAGATGGTGATGGGATTTC
AR-FL	F	CAGCCTATTGCGAGAGAGCTG
	R	GAAAGGATCTTGGGCACTTGC
AR-V7	F	CCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTA
	R	TTTGAATGAGGCAAGTCAGCCTTTCT

Total RNA İzolasyonu

Hasta doku materyalleri alınır alınmaz Ribosave (Bio-Speedy, BS-NA-203-250) içerisine kondu. Sıvı azotta dondurulup izolasyon gününe kadar -20°C'de saklandı. RNA izolasyonu öncesinde yapılan hazırlıklar;

1. Kullanılacak tüm ependorflar %0,1 DEPC (Applichem, 0881) eklenen distile su içerisinde 24 saat bekletildikten sonra otoklavlanarak DEPC'den arındırıldı.

2. İzolasyon yapılacak ortam ZAP kullanılarak temizlendi.
3. RNase, DNase free, ultra pure distile su (Invitrogen, 10977-035) kullanıldı.
4. Bütün malzemeler (pipet uçları, falconlar vb.) RNase, DNase Free olarak temin edildi.

Total RNA izolasyonu RNeasy Mini kit (Qiagen 74104) kullanılarak gerçekleştirildi. Dokular Ribosave içerisinde alınıp temiz ependorfa aktarıldı.

1. Kit içeriğindeki RLT (liziz tamponu) beta-merkaptoetanol (BME) varlığında dokular üzerine eklenip pestle yardımıyla dokular ezildi.
2. Dört katı miktarda 100% etanol içeren RPE tamponu ile lizatlar iyice karıştırıldı.
3. Örnekler RNeasy kolonlarına aktarılarak 15 saniye 9000g de santrifüj edildi. Atık uzaklaştırıldı. Karışım bitene kadar işlem tekrarlandı.
3. Kolonlara RPE tamponu eklenerek 15 saniye 9000g de santrifüj edildi. Atık uzaklaştırıldı.
4. Kolonlara RPE tamponu eklenerek 2 dakika 9000g de santrifüj edildi. Atık uzaklaştırıldı.
5. Kolonlar yeni toplama tüplerine aktarılarak En yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilerek membranlar iyice kurutuldu.
6. Kolonlar 1.5ml ependorflara aktarılarak 30 mikrolitre RNase-free su ile 1 dakika 9000g de RNA örneği elüt edildi.
7. RNA ölçümü aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirildikten sonra RNA örnekleri -80oC'de saklandı.

RNA Miktarının Ölçümü

RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayini için 2µl örnek kullanılarak 260 nm ve 280 nm'deki absorbanları Nanodrop ile spektrofotometrik olarak saptandı. A260/A280 oranından faydalanarak RNA saflık değerleri elde edildi (Tablo 4). En iyi sonuç için bu oranın 2'ye yakın olmasına dikkat edildi.

Tablo 4. İzole edilen total RNA'ların konsantrasyonları ve 260/280 oranları

Hasta Kodu	ng/µl	260/280	Kontrol Grubu Kod	ng/µl	260/280
BCa1	239.3	2.08	N1	12.7	2.02
BCa2	496.3	2.08	N2	16.3	2.06
BCa3	57.8	2.15	N3	14.3	2.09
BCa4	234.4	2.11	N4	26	2.01
BCa5	225.1	2.1	N5	17.8	1.97
BCa6	272.4	2.09	N6	15.3	2.17
BCa7	195.4	2.07	N7	53.3	2.05
BCa8	488.9	2.09	N8	21.6	2.06
BCa9	324.7	2.1	N9	35.9	2.03
BCa10	773.4	2.08	N10	18.1	2
BCa11	354.1	2.09	N11	16.9	1.96
BCa12	438	2.08	N12	11.9	2.15
BCa13	323.5	2.09			
BCa14	407	2.09			
BCa15	799.7	2.08			
BCa16	260.8	2.11			
BCa17	967.7	2.09			
BCa18	629.9	2.1			
BCa19	516.6	2.05			
BCa20	746.4	2.09			
BCa21	164.5	2.08			
BCa22	1176	2.1			
BCa23	329.8	2.11			

“BCa” kod sistemi mesane kanseri örneklerini temsil ederken, “N” kodu kontrol grubundan alınan normal mesane doku örneklerini temsil etmektedir.

cDNASentezi

Yukarıda detaylandırıldığı gibi örneklerden total RNA izole edilip, kalite ve konsantrasyonları belirlendikten sonra cDNA sentezi basamağına geçildi. Örneklerin RNA’larından Tablo 5’te listelenen malzemeler kullanılarak cDNA sentezlendi (Thermo, K1622).

Tablo 5. cDNA sentezinde kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları

Malzeme Adı	Stok Konsantrasyonu	Son Konsantrasyonu / Son Hacmi
Reaksiyon Tamponu	5X	1X
RevertAid Enzim Karışımı	200U/μL	1μL/20μL
RiboLock Rnase İnhibitör	20U/μL	1μL/20μL
dNTP Karışımı	10mM	2μL/20μL
Oligo(dT) Primer	100μM	1μL/20μL
Random Hexamer	100μM	1μL/20μL
DNase Rnase Free Su	-	20 μL’ye kadar
Total RNA	-	Tümör 500 ng / Normal 100ng

Tüpler hazırlandıktan sonra sonra 25 °C’de 5 dk, 42 °C’de 60 dk, ve 70 °C’de 5 dk inkübe edildi (Applied Biosystems, SimpliAmp Thermal Cycler) ve sonrasında -20°C’de saklandı.

qRT-PCR Reaksiyonu cDNA sentezlendikten sonra ilgilenilen gene spesifik primerler (Tablo 3) aracılığıyla Tablo 6’daki malzemeler kullanılarak qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Ampliqon, A323406).

Tablo 6. qRT-PCR reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları

Malzeme Adı	Stok Konsantrasyonu	Son Konsantrasyonu / Son Hacmi
RealQ Plus Reaksiyon Karışımı	2x	1x
Primer F	100 µM	0,2 µM
Primer R	100 µM	0,2 µM
Su	-	12,5 µL'ye kadar
cDNA	-	10ng/20ng

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR sistemi kullanılarak gerçekleştirilen inkübasyonun sıcaklık süre ve döngü sayısı bilgileri Tablo 7’de listelenmiştir.

Tablo 7. Kullanılan primerlerin optimum çalışma koşulları

Bekletme aşaması	95°C 15dk
Denatürasyon	95°C 15sn
Bağlanma	60°C 30 sn
Uzama	72°C 30 sn
Döngü Sayısı	40-50

İnkübasyon döngülerine ek olarak erime eğrisi (melting curve) uygulandı. Bu sayede reaksiyon sonucu elde edilen ürünlerin spesifikliği incelenebilmekte ve spesifik olmayan çoğaltmalar olup olmadığı tespit edilebilmektedir.

qRT-PCR ile Elde Edilen Verilerin Analizi

Cihazdan ham CT değerleri olarak elde edilen veriler 2- Δ CT metodu kullanılarak analiz edildi. Her bir hasta için çalışılan 4'lü teknik tekrarların ortalaması alındı ve normalizasyon için GAPDH ve ACTB'nin geometrik ortalama değerleri

kullanıldı. Normal örnekler için ise doku örneklerinin küçüklüğü sebebiyle elde edilebilen RNA miktarının sınırlılığı nedeniyle 2 teknik tekrar ve internal kontrol olarak yalnızca GAPDH çalışılabilirdi. Tekrarlar arasındaki standart sapmalar grafiklere eklendi.

Normal örneklerde RNA havuzu sınırlı olduğu için tümör örneklerine göre 1/5 oranda daha düşük miktarda RNA ile cDNA sentezi gerçekleştirilebildi. Hem kısıtlama nedeniyle sağlıklı bir karşılaştırma yapabilmek için, hem de biyolojik tekrarlar veya deneysel tekrarlar kaynaklı farklılıkları elimine edebilmek için normal örnekler çalışılırken deney setine “plate”ler arası kalibratör (interplate calibrator) olarak BCa10, BCa15, BCa22 örnekleri ilave edildi.

Son olarak CT değerlerine ek olarak erime eğrisi sonuçları da değerlendirildi. Bu sayede reaksiyon sonucu beklenen boyutta ürün elde edilip edilemediği de doğrulandı ve düşük seviyede de olsa ifade varlığı tespit edildi.

qRT-PCR sonucu AR-V7 mRNA ekspresyonu seviyesi deteksiyon sınırının altında çıkan örneklerde testin kantitatif doğası gereğiyle mutlak “0” yerine diğer dokulardan elde edilen en düşük değerin yarısının altında minimum değer verildi.

3.2 Gen Ekspresyonlarındaki Değişimin Western Blot Yöntemi İle İncelenmesi - Protein Ekspresyonu Değerlendirilmesi

Total protein izolasyonu

1. Mesane tümör örnekleri ile normal mesane doku örnekleri alınır alınmaz sıvı azotta dondurulup -80oC’de muhafaza edildiler.
2. Complete Ultra mini proteaz inhibitör karışımı (Ref Roche 05892970001), phosSTOP fosfataz inhibitor karışımı tabletleri RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) tamponu içerisine katılarak protein izolasyon solüsyonu hazırlandı.

3. -80°C'den alınan dokular 1.5ml'lik steril ependorflara aktarıldı. Dokular büyüklüklerinin yaklaşık 3 katı olacak miktarda izolasyon solüsyonu içerisinde havan eli (SSIBio 1015-39) yardımıyla ezildi.
4. Buz üzerinde her 5 dakikada bir vortekslenerek 45 dakika lize olması için inkübasyona bırakıldı.
5. Doku debrislerini uzaklaştırmak için 4°C'de 13.200 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldı.
6. Proteinleri içeren süpernatant yeni bir tüpe alındı ve protein miktarının belirlenmesinden sonra -80°C'ye kaldırıldı.

Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Protein lizatının içerisindeki protein miktarı BCA (bicinchoninic acid) yöntemi kullanılarak hesaplandı.

1. Standart grafik oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda sığır serum albumini (BSA) kullanıldı.
2. Standart konsantrasyonlara ve elde ettiğimiz protein lizatlarına BCA reageni A ve B karıştırılarak eklendi ve reaksiyon başlatıldı.
3. 37 °C'de 30 dakika veya 55 °C'de 15 dakika inkübe edilerek reaksiyon gerçekleştirildi.
4. Reaksiyon sonucunda protein konsantrasyonu ile birlikte artan BCA/bakır kompleksi 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.
5. BSA konsantrasyonlarına bağlı olarak elde edilen ölçümler standart grafiğinin çizilmesinde kullanıldı ve örneklerin de bu standart grafiğe göre ne kadar protein içerdiği hesaplandı.

SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1. Görüntülemek istediğimiz protein boyutuna uygun olan konsantrasyonda ayrıştırıcı (resolving) poliakrilamid jel hazırlandı (%8) ve camların arasına

eklendi. Üzerleri izopropanol ile tamamlanarak jel polimerize olana kadar bekledi.

2. Bu esnada %5 paketleyici (stacking) poliakrilamid jel hazırlandı ve alt jel polimerize olduktan sonra ve izopropanol uzaklaştırıldıktan sonra üzerine yaklaşık 2 ml eklendi ve tarak yerleştirildi. Üst jel de polimerize olana kadar bekledi.
3. Total protein lizatından optimize edilen miktarda protein alındı ve proteinlerin denatürasyonu için %20 beta-merkaptoetanol içeren 4X yükleme tamponu ile her örnek eşit son hacimde olacak şekilde karıştırıldı.
4. Hazırlanan proteinler denatürasyonu tamamlamak için 95oC'de 10 dakika kaynatıldı.
5. Kaynatılan protein örnekleri yükleme işlemine geçilene kadar oda sıcaklığında bekletildi.
6. Elektroforez tankının içerisine yürütme tamponu eklendi ve jeller uygun olarak yerleştirildikten sonra örnekler ince uzun uçlu pipet uçları ile kuyulara yüklendi.
7. Protein göçünü göz ile takip edebilmek için önceden işaretlenmiş protein belirtecinden (prestained protein marker, thermo 1669)) 4-5 µl boş bir kuyuya yüklendi.
8. İlk olarak 70 Voltluk (V) gerilim uygulanarak paketleyici jelin proteinleri aynı hizaya getirmesi sağlandı.

Örnekler paketleyici jeli geçtikten sonra proteinler ayrıştırıcı jelde 110 V'luk gerilim ile belirteçteki bantların arası istenilen düzeyde açılana kadar yürütüldü.

Poliakrilamid Jelde Yürütülen Proteinlerin PVDF Membranlara Transferi Ve Membranın Bloklanması

1. Elektroforez işlemi bittikten sonra jeller cam aparattan çıkartılarak transfer tamponunda ısıtıldı. Membran ve Whatmann kağıtları transfer kaseti boyutunda kesildi.

2. Membran (BioRad LF, PVDF), porlarının açılması için 1 dakika boyunca metanolde bekletildi. Daha sonra dengelemek için transfer tamponunda ıslatıldı.
3. Transfer tamponu içerisinde kasetin siyah tarafı altta kalacak şekilde sırasıyla sünger, Whatmann kağıdı, jel, membran, Whatmann kağıdı, sünger üst üste konularak bir sandviç formu oluşturuldu.
4. Kaset kapatılarak transfer tankı içerisine yerleştirildi ve tank transfer tamponu ile dolduruldu.
5. 400 miliAmper'lik (mA) akımda yaklaşık 3 saat transfer yapıldı. Akım çok yüksek olduğundan ve hemen ısınma yapacağından jel yapısının ve dolayısıyla protein yapılarının bozulmasını istemediğimiz için transfer tankının içerisine buz konuldu ve ara ara tamponun aşırı ısınmasına fırsat vermeden değiştirildi.
6. Transfer işlemi bittikten sonra membran %100 metanolde bir dakika, ultra saf suda 1 dakika ve TBS'te iki dakika inkübe edildi.
6. Görüntülemek istediğimiz proteinin optimize edilmiş bloklama solüsyonu ile membran 1 saat boyunca falkon tüp içerisinde döndürülerek antikorun spesifik olmayan bölgeleri tanıyıp yanlış sinyal vermemesi için bloklandı.

Proteinlerin Membran Üzerinde Saptanması

1. Bloklama %5 yağsız süt tozu 0,1% TBS-T (Tween-20) veya %5 BSA 0,1% PBS-T işleminden sonra optimize edilen primer antikor solüsyonu ve dilüsyonları ile gece boyunca 4°C'de falkon tüp içerisinde membranın her yerine eşit şekilde primer antikorun gelip bağlanması için döndürülerek inkübe edildi. İnternal kontrol için kalneksin (Calnexin Sc-11397) kullanıldı. Uygun çalışma dilüsyonlar belirlendi. Tam uzunlukta (full-length: FL) Androjen reseptör (AR) antikoruna özgül anti-androjen reseptörü fare monoklonal antikor (sc-7305); 1:200 sulandırılarak ve sürekli aktif varyant AR formu olan AR-V7 için anti-AR-V7 fare monoklonal antikor (AG10008) 1:500 sulandırılarak kullanıldı.

2. Ertesi gün membran %0,5 TBS-T solüsyonu ile beşer dakika üç kez yıkandı.
3. Yıkama işleminin ardından primer antikorun hazırlandığı hayvana uygun olacak şekilde (anti-fare, anti-tavşan, vb.) infrared ışıması yapan sekonder antikor seçildi ve optimize edilen sekonder antikor solüsyonunda oda sıcaklığında falkon tüp içerisinde döndürülerek iki saat inkübe edildi. İkincil antikorlar için infrared ışıma yapan keçi anti-fare (Goat anti rabbit 680 RD: IRD 926-68071) ve keçi anti-tavşan (goat anti mouse 800CW: IRD 926-322-10) antikorları 1:10.000 / %3 Süt Tozu, 0,5 TBS-T olacak şekilde hazırlandı. İnfrared ışıması yapan sekonder antikor kullanıldığı için bu işlemde deteksiyona kadar olan süreçte membran üzerindeki işlemler karanlık ortam sağlanacak şekilde yapıldı.
4. Sekonder antikoru da bağlanan membran %0,5 TBS-T solüsyonu ile beşer dakika beş kez yıkandı.
5. Son olarak membran TBS solüsyonu ile duruladıktan sonra görüntüleme işlemine geçildi.

Görüntüleme Li-COR Odyssey CLx infrared floresan görüntüleme sistemi ve Biorad ChemiDoc Imaging sistemi ile yapıldı. Bu sistemler iki farklı floresan kanalı olduğu için aynı anda iki farklı hayvandan hazırlanan primer antikorların aynı anda görüntülenmesine olanak sağladı.

Western Blot Görüntülerinin Analizi

1. ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) programı kullanılarak Western Blot görüntülerinde her bir bandın dansitometrik analizi gerçekleştirilerek sayısal değerler elde edilerek bantlar arasındaki dansite farkları belirlendi.
2. Görüntüler bilgisayar ortamına aktararak 8-bit tiff imajı şekline çevrildi.
3. Her bir bant standart bir çerçeve ile çevrilerek aynı eksenle sırasıyla bütün protein örneklerinin dansitometrik değerleri toplandı. Bu analiz AR-FL, AR-V7 ve kalneksin bantları için bütün örneklerde yapıldı.

4. Kalibrasyon işlemi için her bir Western blot membranında bir veya iki kutucuğa aynı protein örneği yüklenerek membranlar arasında dansitometrik denklik sağlandı.
5. Normal ve tümör doku örneklerinin daha sağlıklı kıyaslayabilmek ve biyolojik tekrarlar veya deneysel tekrarlar kaynaklı farklılıkları elimine edebilmek için BCa4 ve BCa7 nolu hasta örnekleri deney setine eklendi, normal dokular ile birlikte tekrar çalışıldı ve kalibratör olarak kullanıldı. Her iki AR varyantını değişik seviyede eksprese etmelerinden dolayı 4 ve 7 nolu örnekler seçildi. Ayrıca iki örnek arasında AR-FL ve AR-V7 oranlarında da farklılık olması tercih sebebiydi. BCa4 ve BCa7 nolu hasta örneklerinin kontrol grubu hastalarla birlikte tekrar çalışıldığında bir önceki Western Blot analizine göre yaklaşık 1.8 kat farklılık olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu örnekleri bu orana göre kalibre edilerek verileri hesaplandı ve istatistiksel analizler bu veriler üzerinden yapıldı.
6. Dansitometrik analizlerden sonra ARs/Kalnekسين değerleri hesaplanarak semi-kantitatif olarak her bir protein havuzundaki ARs oranları belirlendi. Bu oran bize hasta ve normal dokular arasında ARs açısından ekspresyonel farklılıkları verdi.
7. Semi-kantitatif değerlendirmeden elde edilen veriler istatistik analizlerle değerlendirilerek grafiklendi.
8. Dansitometrik analizin deteksiyon sınırının altında dansitede bant oluşturan örnekler için analiz sonucunda protein ekspresyonu seviyesi deteksiyon sınırının altında çıkan örneklerle testin semi-kantitatif doğası gereğiyle mutlak “0” yerine diğer dokulardan elde edilen en düşük değerin yarısının altında minimum değer verildi.

3.3 İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Inc., Chicago IL), sürüm 22, Windows yazılımı ile yapıldı. Verilerin normal dağılıp dağılmadığını belirlemek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı, p değerlerinin 0,05'ten küçük olduğu için verilerin normal dağılıma uymadığına karar verildi. Kategorik

veriler sayı ve yüzde ile belirtilirken, sürekli değişkenler median ve minimum-maksimum olarak belirtildi. Androjen reseptörü parametrelerinin hiçbirinin normallik dağılımına uymadığı görüldü. Kanseri grubu ve sağlıklı grubun kıyaslanmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 23 erkek hasta gönüllünün yaş ortalaması 68.4 ± 10.2 (min-max, 37-80), ortalama Vücut Kitle İndeksi (VKİ) 28.01 ± 3.5 olarak saptandı. VKİ açısından 7 hasta kilolu gruptaydı. Beş hasta gönüllü halen sigara kullanımına devam ederken, 17 hasta gönüllü geçmişte sigara içtiğini ifade etti. Sağlıklı kontrol grubunda ise 6 kişi aktif sigara içicisiyken 6 kişinin sigara kullanım öyküsü yoktu. İki grup arasında istatistiksel analizlerde yaş ve vücut kitle endeksi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Mesane kanseri grubunda sigara kullanımı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek saptandı ($p < 0.05$).

Çalışmaya alınan hasta gönüllülerin 8'i T1 evresinde, 15'i Ta evresindeydi. 23 hasta gönüllünün 13'ü EORTC risk gruplandırmasına göre orta riskli iken 10'u yüksek riskli mesane kanseri olarak tespit edildi. T1 evresindeki hastaların tümünün ve Ta evresindekilerin ise 1'inin tümörü yüksek dereceliydi. Ta evresindeki 4 (%17.3) hasta düşük dereceli, 10 (% 82.7) hasta yüksek dereceli tespit edildi, KİS 2 (% 8.6) hastada saptandı (Tablo 8).

Tablo 8. Hasta gönüllerin çalışmaya alınma anında mesane kanseriyle ilgili veriler

Hasta No	Tanı	Tümör Evresi	Tümör Derecesi	Tümör Boyutu (cm)	Tümör Sayısı	Risk Grubu
1	İnvaziv papiller ürotelyal karsinom	pT1	Yüksek dereceli	10	5	Yüksek
2	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	4	1	Orta
3	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	4,5	2	Orta
4	İnvaziv papiller ürotelyal karsinom	pT1	Yüksek dereceli	4	3	Yüksek
5	İnvaziv papiller ürotelyal karsinom	pT1*	Yüksek dereceli	10	4	Yüksek
6	İnvaziv papiller ürotelyal karsinom	pT1	Yüksek dereceli	5	2	Yüksek
7	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	3	2	Orta
8	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	2	2	Orta
9	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	4	4	Orta
10	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	7	4	Orta
11	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	3,5	1	Orta
12	Papiller ürotelyal karsinom	pTais	Yüksek dereceli	4	1	Yüksek
13	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	1,5	2	Orta
14	Papiller ürotelyal karsinom	pT1	Yüksek dereceli	7	5	Yüksek

Tablo 8. Hasta gönüllülerin çalışmaya alınma anında mesane kanseriyle ilgili veriler (Devamı)

15	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	1,5	2	Orta
16	Solid İnvaziv Ürotelyal karsinom	pT1	Yüksek dereceli	5	3	Yüksek
17	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	4	1	Orta
18	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	1,5	3	Orta
19	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	2	4	Orta
20	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Yüksek dereceli	2,5	2	Yüksek
21	İnvaziv papiller ürotelyal karsinom	pT1	Yüksek dereceli	5	1	Yüksek
22	İnvaziv papiller ürotelyal karsinom	pT1	Yüksek dereceli	2	11	Yüksek
23	Papiller ürotelyal karsinom	pTa	Düşük dereceli	4	1	Orta

*Hastanın patolojisi pT1-2 + KİS; kesitlerde muskularis mukoza - muskularis propria invazyon ayrımı yapılamamaktadır şeklinde raporlanmış ve T1 kabul edilmiştir.

Mesane kanseri hasta grubu kendi içerisinde AR-FL ve AR-V7 protein ekspresyonu klinik ve histopatolojik özelliklerine göre incelendi. Aynı inceleme AR-FL ve AR-V7 mRNA ekspresyonu için de gerçekleştirildi. Yaş, obezite, KİS varlığı, tümör evresi, tümör derecesi ve EORTC risk grubu ile herhangi bir AR parametresi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. AR-V7 mRNA ekspresyonu tümör boyutu 3 cm üzeri olan grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek saptandı ($p=0.027$). AR-FL protein ekspresyonu seviyesi ise tekil olan tümörlerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek saptandı ($p=0.020$, Tablo 9).

Tablo 9. Mesane kanseri klinik ve histopatolojik özelliklerinin AR-FL ve AR-V7 mRNA ve protein ekspresyonları düzeyinde incelenmesi

	AR-FL mRNA Median (Min-Max)	AR-V7 mRNA Median (Min-Max)	AR-FL Protein Median (Min- Max)	AR-V7 Protein Median (Min-Max)
YAŞ				
65 yaş altı	0.26 (0.0006-0.29)	0.000053 (0.000007-0.00044)	0.32 (0.06-2.4)	1.44 (0.25-14.23)
65 yaş üstü	0.036 (0.0007-0.12)	0,000075 (0.000007-0.0003)	0,49 (0.06-1.05)	1.13 (0.20-3.39)
VKİ				
25 VKİ <	0.035 (0.004-0.077)	0.000061 (0.000007-0.00019)	0.44 (0.06-0.87)	1.49 (0.87-14.23)
25 VKİ >	0,034 (0.0006-0.29)	0.000079 (0.000007-0.00044)	0,40 (0.06-2.4)	1,12 (0.20-4.32)
Tümör Boyutu				
< 3 cm	0.0048 (0.0013-0.09)	0.000046 (0.000007-0.00008)	0.13 (0.06-0.87)	0.95 (0.20-3.39)
> 3 cm	0,0425 (0.0006-0.29)	0,000109 (0.000007-0.00044)	0,49 (0.06-2.4)	1,16 (0.27-14.23)
Tümör Sayısı				
Tek	0.0612 (0.0007-0.29)	0.000168 (0.00001-0.00044)	0.80 (0.36-2.4)	1.13 (0.57-1.83)
Çoğul	0.0298 (0.0006-0.13)	0.000053 (0.000007-0.00037)	0.32 (0.06-1.05)	1.17 (0.2-14.23)
KİS				
Yok	0.0376 (0.0006-0.29)	0.000079 (0.000007-0.00044)	0.49 (0.06-2.4)	1.15 (0.20-14.23)
Var	0.0042 (0.0007-0.007)	0.000030 (0.00001-0.00004)	0.20 (0.06-0.36)	2.25 (1.12-3.39)
Tümör Derecesi				
Düşük	0.0617 (0.0013-0.29)	0.000082 (0.000007-0.00044)	0.49 (0.06-2.4)	0.97 (0.2-4.32)
Yüksek	0.0302 (0.0006-0.12)	0.000058 (0.000007-0.00037)	0.28 (0.06-1.05)	1.16 (0.27-14.23)

Tablo 9. Mesane kanseri klinik ve histopatolojik özelliklerinin AR-FL ve AR-V7 mRNA ve protein ekspresyonları düzeyinde incelenmesi (Devamı)

Tümör Evresi				
pTa	0.029 (0.0007-0.29)	0.000056 (0.000007-0.00044)	0.40 (0.06-2.4)	0.97 (0.2-4.32)
pT1	0.036 (0.0006-0.12)	0.000075 (0.000007-0.00037)	0.34 (0.06-1.05)	1.38 (0.27-14.23)
EORTC Risk Derecesi				
Orta	0.061 (0.0013-0.29)	0.000082 (0.000007-0.00044)	0.49 (0.06-2.4)	0.97 (0.2-4.32)
Yüksek	0.030 (0.0006-0.12)	0.000058 (0.000007-0.00037)	0.28 (0.06-1.05)	1.16 (0.27-14.23)

Çalışmanın birincil sonlanım hedefi mesane kanseri olan bireylerde ve sağlıklı bireylerde AR parametrelerinin (AR-FL protein, AR-FL mRNA, AR-V7 protein, AR-V7 mRNA) karşılaştırılmasıydı. 23 mesane kanserli ve 12 sağlıklı bireyin AR parametreleri Tablo 10'da verilmektedir.

Tablo 10. Çalışmaya katılan tüm bireylerin AR parametrelerinin kantitatif verileri

Hasta Kodu	AR-FL Protein	AR-V7 Protein	AR-FL mRNA	AR-V7 mRNA
Bca 1	0,14	0,87	0,0048	0,0000536
Bca 2	0,2	0,28	0,0819	0,0001238
Bca 3	0,06	3,39	0,0076	0,0000462
Bca 4	1,15	0,98	0,1169	0,0002914
Bca 5	0,87	0,96	0,0046	0,0000183
Bca 6	0,87	1,16	0,0447	0,0000704
Bca 7	0,58	0,57	0,026	0,0001426
Bca 8	0,06*	0,52	0,0035	0,0000077*
Bca 9	0,06*	0,2*	0,0298	0,0000538
Bca 10	0,49	1,18	0,0344	0,0000798
Bca 11	0,36	1,12	0,0007	0,0000147
Bca 12	0,87	1,53	0,0968	0,0000829
Bca 13	2,4	1,45	0,2959	0,000445
Bca 14	0,34	1,6	0,0145	0,0000531
Bca 15	0,79	2,07	0,0376	0,0000961
Bca 16	0,4	4,32	0,1306	0,0002623
Bca 17	0,49	0,48	0,0617	0,0000564
Bca 18	0,75	1,83	0,0777	0,0001942
Bca 19	0,33	2,05	0,0013	0,0000077*
Bca 20	0,06*	0,27	0,0404	0,0003726
Bca 21	0,06*	14,23	0,026	0,0000077*
Bca 22	0,21	1,59	0,0006	0,0000077*
Bca 23	1,05	1,05	0,1279	0,0002314
N1	0,22	2,42	0,1243	0,0000077*
N2	0,06*	2,75	3,0305	0,0000077*
N3	0,06*	3,24	0,4772	0,0000077*
N4	0,06*	2,08	0,3436	0,0000077*
N5	0,06*	2,09	0,2783	0,0000077*
N6	0,06*	2,77	0,2381	0,0000077*
N7	0,06*	2,6	0,1876	0,0000077*
N8	0,3	2,14	0,1428	0,000445
N9	0,06*	2,98	0,3489	0,0001935
N10	-	1,53	0,3082	0,0000077*
N11	0,32	3,34	0,3675	0,0000077*
N12	-	1,11	0,136	0,0000077*

*Deteksiyon sınırının altındaki örneklere verilen minimum değer

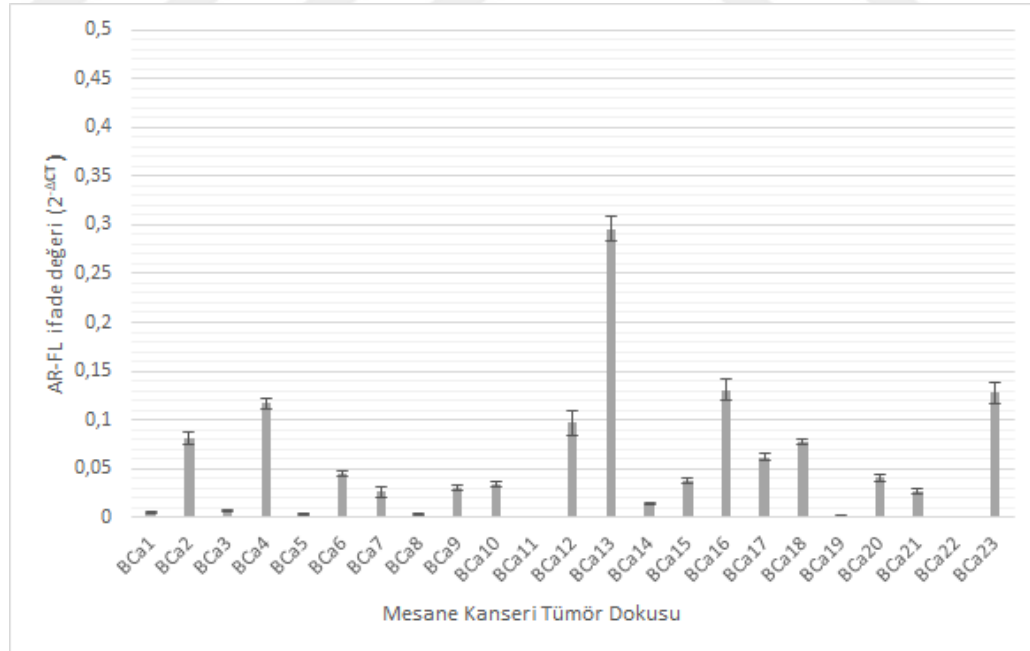
Veriler iki gruba ayrıldı ve iki grup arasında AR-FL, AR-V7 proteini ve mRNA ekspresyonları karşılaştırıldı.

4.1 mRNA Seviyesinde Analiz

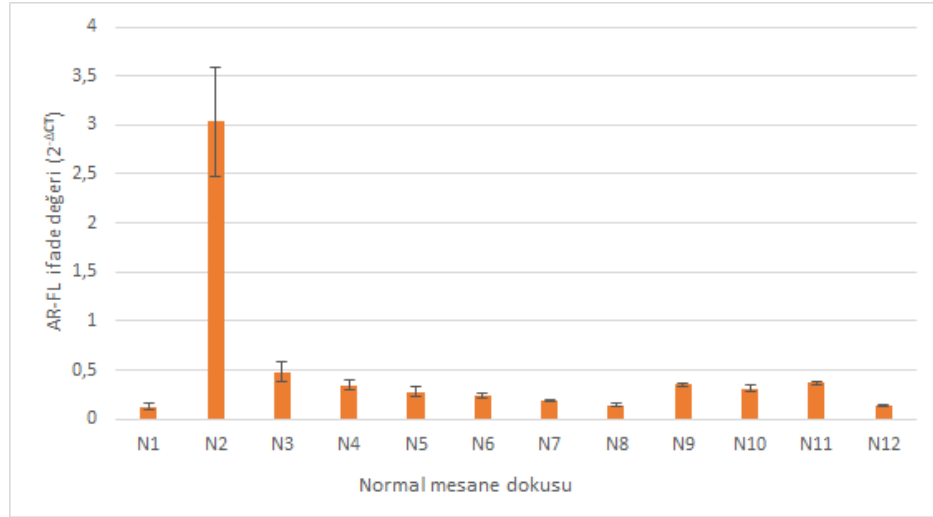
23 hastadan alınan mesane kanseri dokusunda ve 12 mesane kanseri olmayan gönüllü bireyden alınan mesane dokusu örnekleri qRT-PCR yöntemiyle incelendi. AR-FL ve AR-V7 mRNA ekspresyonları her bir hasta ve normal örnek için sütun grafiklerinde gösterilmektedir (Şekil 4, Şekil 5, Şekil 7, Şekil 8). Tablo 12’de protein ekspresyonları ile birlikte mRNA ekspresyonunun 23 mesane kanseri dokusunda sağlıklı dokulardaki ortalama değere göre değişimleri belirtilmiştir.

AR-FL mRNA ekspresyonu;

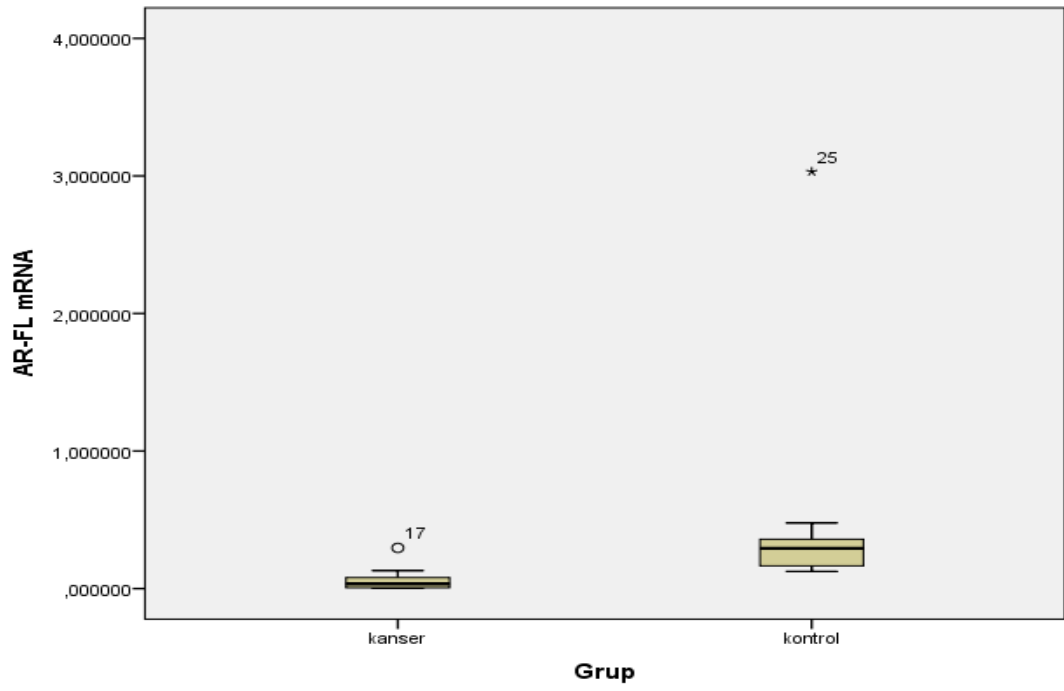
AR-FL mRNA ekspresyonları her bir hasta ve normal örnek için sütun grafiklerinde gösterilmektedir (Şekil 4, Şekil 5).



Şekil 4. Mesane kanseri grubu AR-FL mRNA ekspresyonları



Şekil 5. Kontrol grubu AR-FL mRNA ekspresyonları



Şekil 6. AR-FL mRNA seviyelerinin iki grup arasında karşılaştırılması

Tablo 91. AR-FL ve AR-V7 protein ve mRNA ekspresyon düzeylerinin mesane kanseri ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel analizi

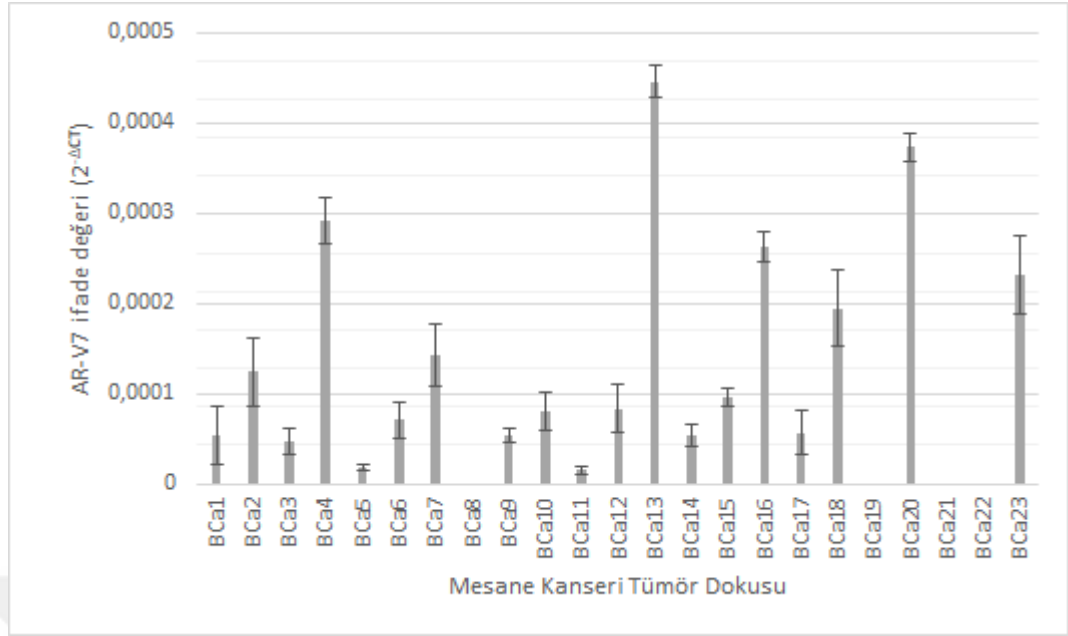
	Mesane Kanseri	Kontrol Grubu	P*
AR-FL Protein Medyan (Min-Max)	0.40 (0.06-2.4)	0.06 (0.06-0.32)	0.003
AR-V7 Protein Medyan (Min-Max)	1.15 (0.20-14.23)	2.5 (1.11-3.34)	0.003
AR-FL mRNA Medyan (Min-Max)	0.034 (0.0006-0.29)	0,29 (0.12-3.03)	<0.001
AR-V7 mRNA Medyan (Min-Max)	0.00007 (0.000007-0.00044)	0.0000077 (0.0000077-0.00044)	0.005

*P değeri eldesinde Mannn-Whitney U testi kullanılmıştır.

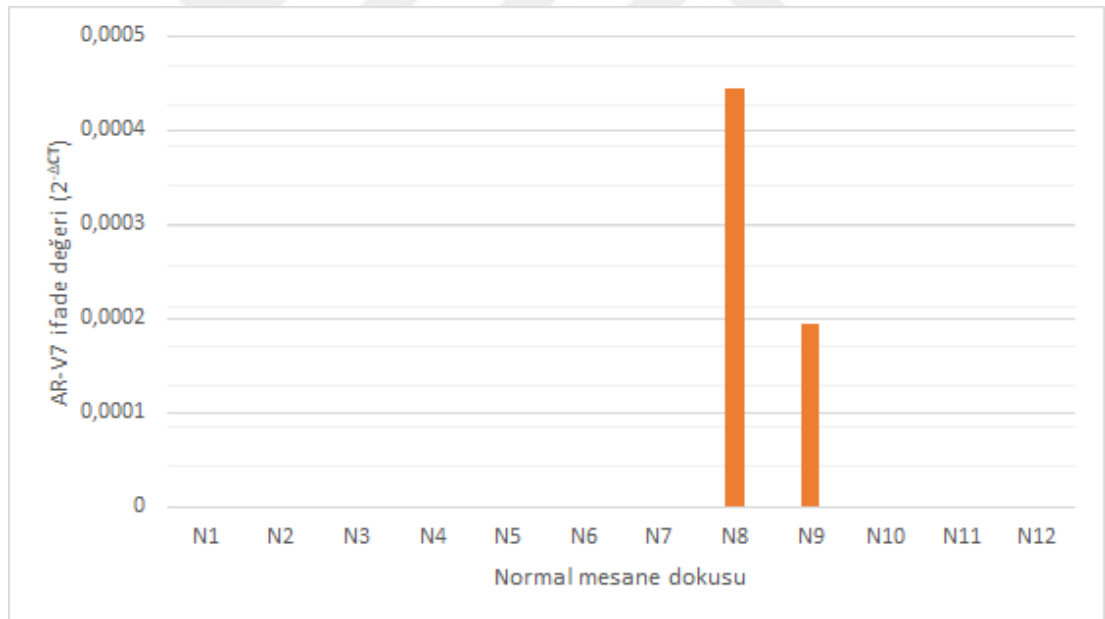
Mesane kanseri grubunda AR-FL mRNA median ekspresyonu 0.034 iken kontrol grubunda 0.29'du. Kontrol grubunda AR-FL mRNA ekspresyonu anlamlı yüksekti (Tablo 11, Şekil 6) .

AR-V7 mRNA ekspresyonu;

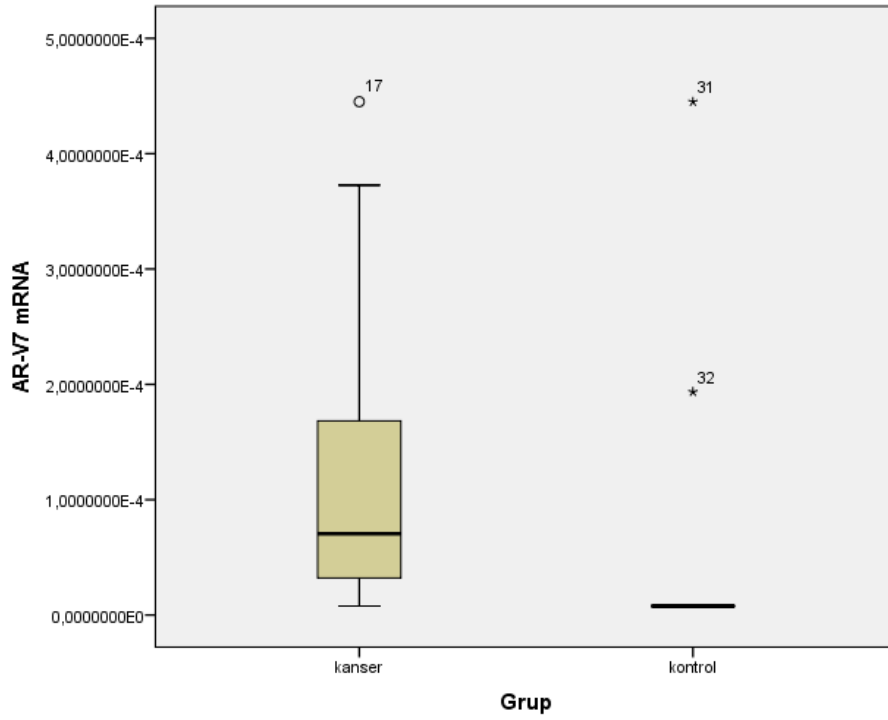
AR-V7 mRNA ekspresyonları her bir hasta ve normal örnek için sütun grafiklerinde gösterilmektedir (Şekil 7, Şekil 8).



Şekil 7. Mesane kanseri AR-V7 mRNA ekspresyonları



Şekil 8. Kontrol grubu AR-V7 mRNA ekspresyonları



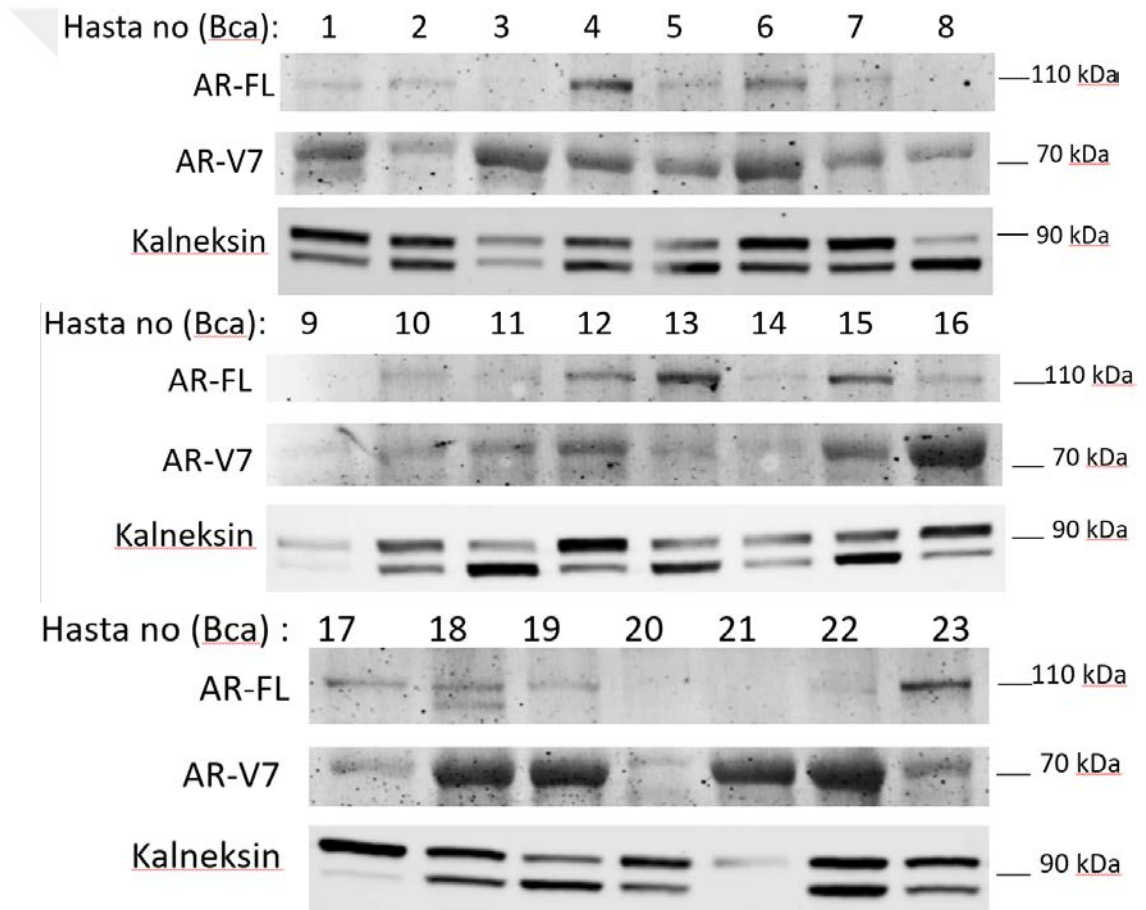
Şekil 9. AR-V7 mRNA seviyelerinin iki grup arasında karşılaştırılması

Tablo 11’de verildiği gibi mesane kanseri grubunda AR-V7 mRNA median ekspresyonu 0.0007 iken kontrol grubunda 0.0000077 idi. Mesane kanseri grubunda AR-V7 mRNA ekspresyonu belirgin şekilde yüksek olarak gözlendi ($p=0.005$, Şekil 9).

AR-FL mRNA için normal örneklerin ortalama $2-\Delta CT$ değeri olan 0.5 eşik değeri alınmış ve mesane tümör örneklerinde bu değerden düşük olanlar ve ekspresyonu mevcut koşullarda tespit edilemeyenler “Düşük” ekspresyon, benzer olanlar “Değişmedi”, yüksek olanlar “Yüksek” ekspresyon olarak ifade edilmiştir. AR-V7 mRNA için ise normal örneklerin ortalama $2-\Delta CT$ değeri olan 0.0000596 eşik değeri alınmış ve mesane tümör örneklerinde bu değerden düşük olanlar ve ekspresyonu mevcut koşullarda tespit edilemeyenler “Düşük” ekspresyon, benzer olanlar “Değişmedi”, yüksek olanlar ise “Yüksek” ekspresyon olarak ifade edilmiştir (Tablo 12). 23 hastanın tamamında AR-FL mRNA ekspresyonunun sağlıklı grubun ortalamasının altında olduğu saptandı. 12 hastada AR-V7 mRNA ekspresyonu daha yüksek saptanırken 6 hastada AR-V7 mRNA ekspresyonu sağlıklı grubun ortalamasının altında saptandı, 5 hastada ise benzer seviyede saptandı.

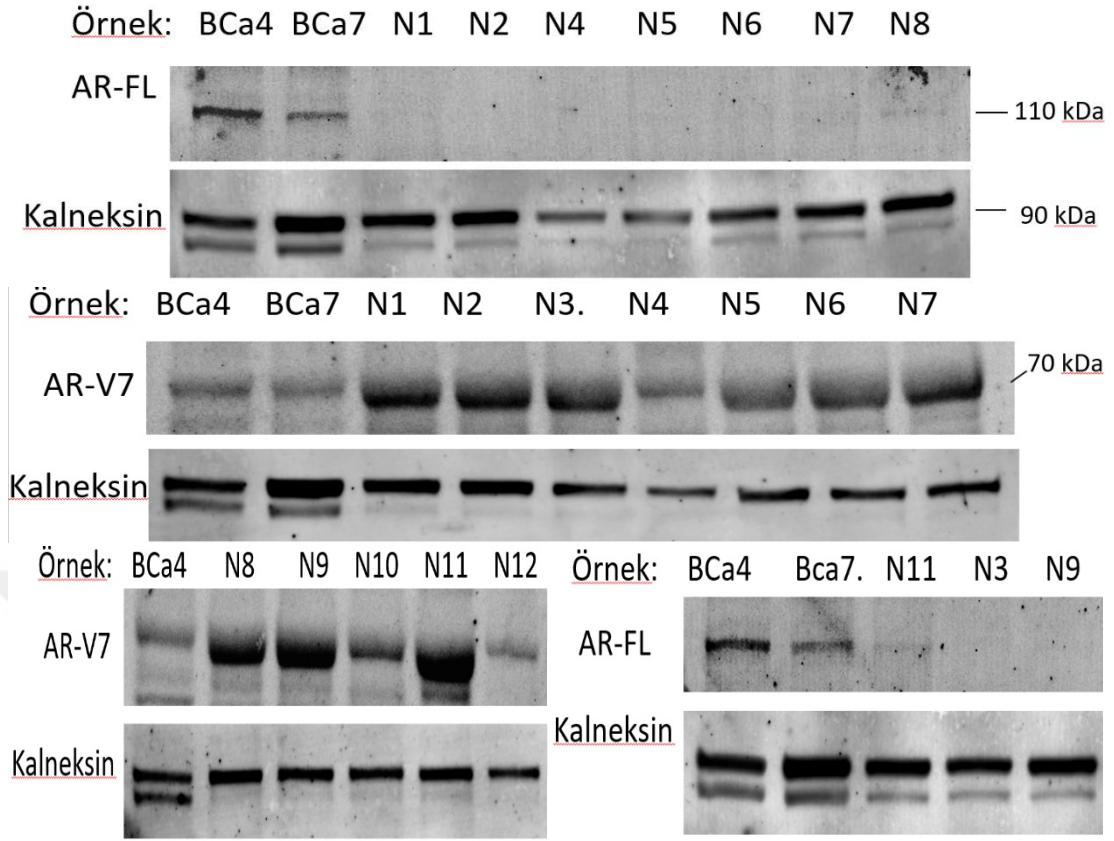
4.2 Protein Seviyesinde Analiz

Western Blot yöntemiyle AR-FL ve AR-V7 protein ekspresyonları 23 hastanın mesane kanseri dokusunda incelendi. Aynı örnekler için üç kez Western Blot çalışması gerçekleştirildi. Kalneksin internal kontrol olarak kullanıldı. Şekil 10'da 23 hastanın ve Şekil 11'de 12 sağlıklı kontrol grubunun protein ekspresyonu analizlerinin imajları örnek olarak gösterilmiştir.



Şekil 10. Mesane kanseri grubunun AR-FL ve AR-V7 ile kalneksin proteini düzeylerinin western blot analizi

Görüntülerde her bir banda verilen numara örnek numarasını temsil etmektedir. Şekil 10'da Bca 1-23 kodlu hasta örnekleri AR-FL ve AR-V7 ve kalneksin protein ekspresyon düzeyleri gösterilmektedir. Bant kalınlıkları ölçülerek semi-kantitatif veriler elde edildi.



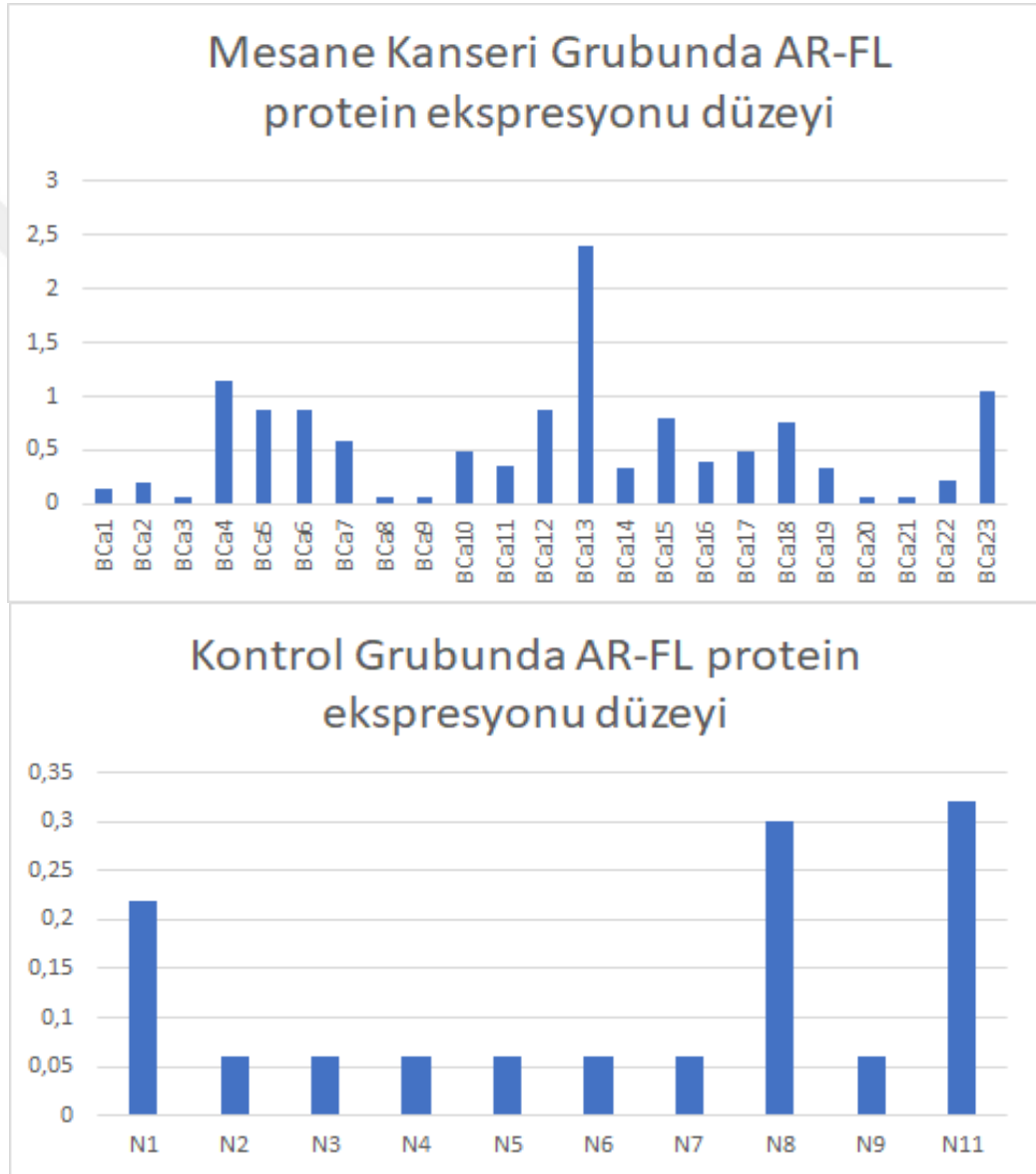
*BCa: Mesane kanseri, N: Normal kontrol grubu

Şekil 11. 12 kontrol grubunda elde edilen normal mesane doku örneğinde Western Blot yöntemiyle AR ve AR-V7 protein düzeylerinin belirlenmesi.

Yine Western Blot yöntemiyle normal mesane doku örneklerinde AR-FL ve AR-V7 protein düzeyleri incelendi ve kalneksin proteini internal kontrol olarak kullanıldı. Yöntem kısmında daha önce belirtildiği gibi semi-kantitatif analizleri gerçekleştirildi. 4 ve 7 nolu mesane kanseri hasta örnekleri normal kontrol grubu ile kalibrasyon için tekrar çalışıldı ve sonuçlar oran farklılığı ile kalibre edildi. Şekil 11’de 12 kontrol grubu olgusunun western blot analizi sonrası elde edilen bant kalınlıkları gösterilmektedir. 10 ve 12 numaralı kontrol grubu olgularında AR-FL protein ekspresyonu için uygun kalitede örnek sağlanamadığından AR-FL proteini değerlendirilemedi.

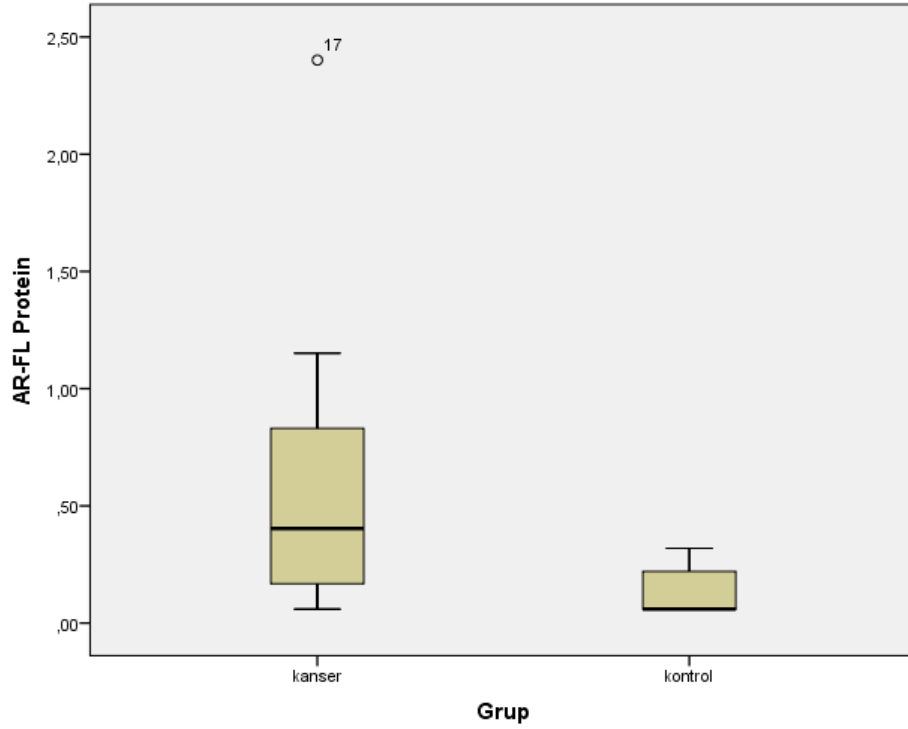
AR-FL protein ekspresyonu;

Bant kalınlıkları ölçülerek semi-kantitatif veriler elde edilmiş ve kalibrasyon sonrası veriler her bir birey için Şekil 12’de gösterilmektedir. Protein ekspresyonlarının kantitatif verileri Tablo 10’da verildi.



Şekil 12. AR-FL protein ekspresyonlarının seviyeleri

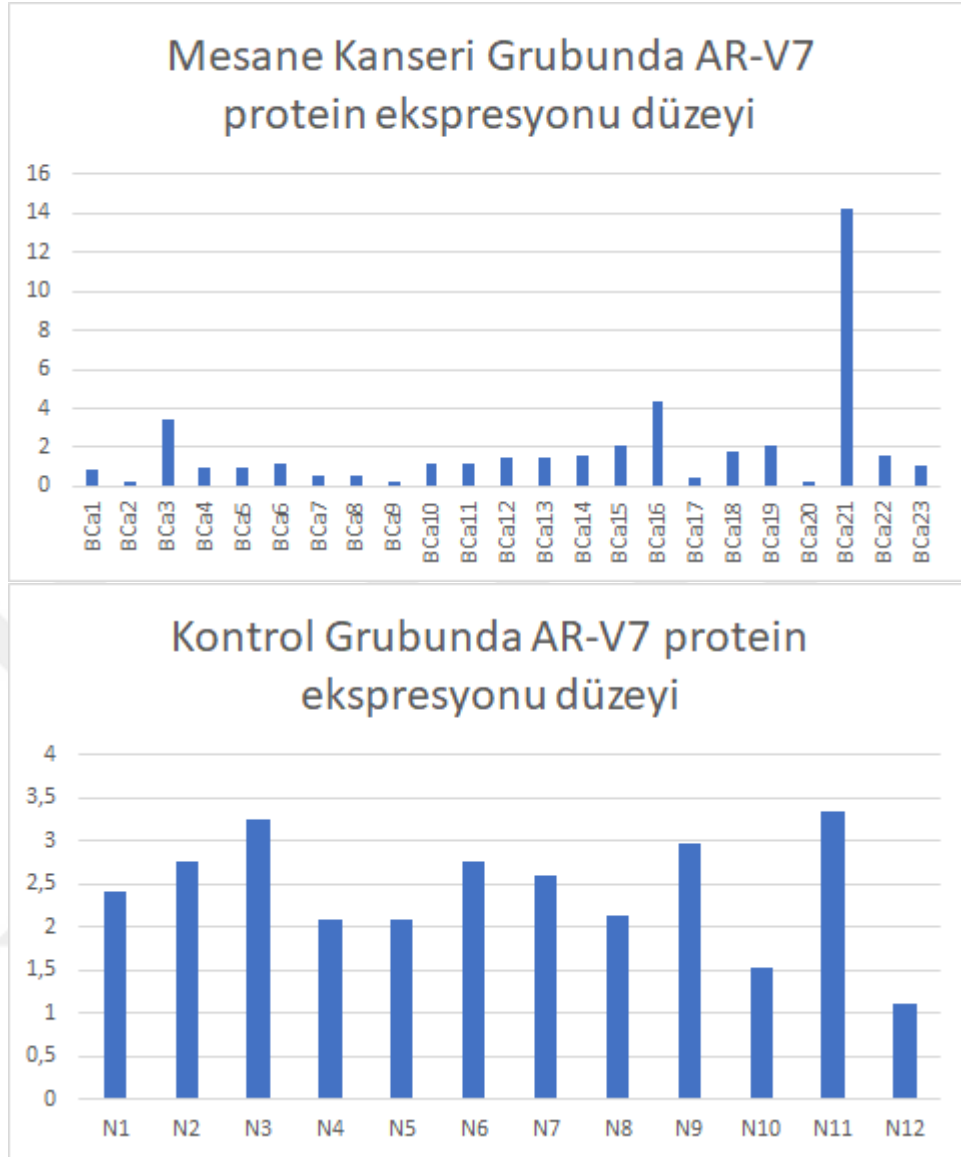
Tablo 11’de verildiği gibi mesane kanseri grubunda AR-FL protein median ekspresyonu 0.4 iken kontrol grubunda 0.06’ydı. Mesane kanseri grubunda AR-FL protein ekspresyonu belirgin derecede daha yüksek saptandı ($p=0.003$, Şekil 13).



Şekil 13. AR-FL protein seviyelerinin iki grup arasında karşılaştırılması

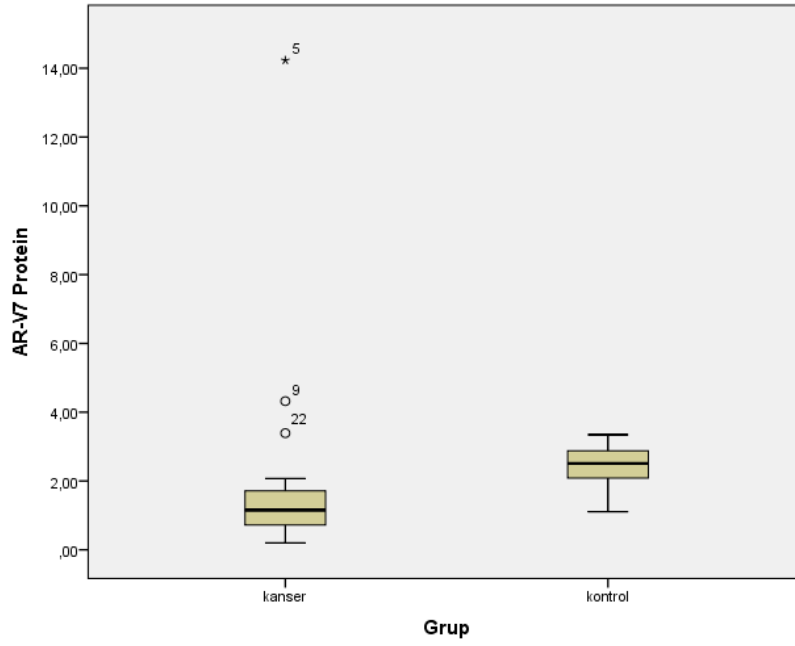
AR-V7 protein ekspresyonu;

23 mesane kanseri hastasının ve 12 gönüllü bireyin mesane dokusunda saptanan AR-V7 protein miktarı Şekil 14’te gösterilmektedir.



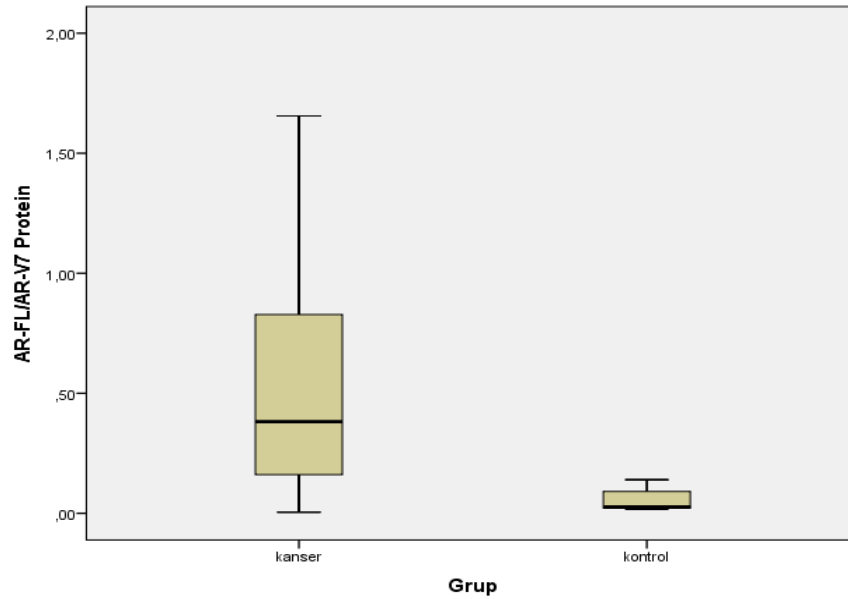
Şekil 14. AR-V7 protein ekspresyonlarının seviyeleri

Tablo 11’de verildiği gibi mesane kanseri grubunda AR-V7 protein median ekspresyonu 1.15 iken kontrol grubunda 2.5 idi. Kontrol grubunda AR-V7 protein ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksekti ($p=0.003$, Şekil 15).

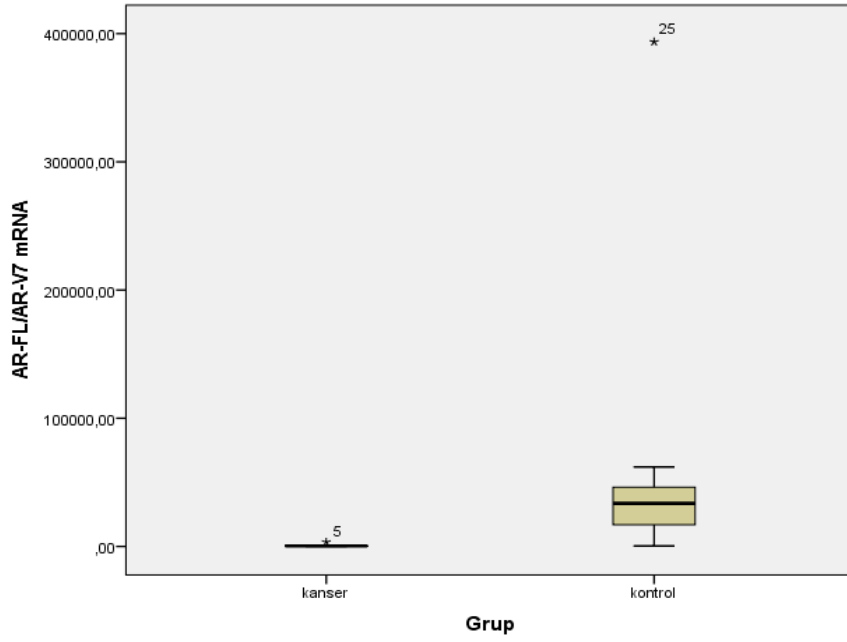


Şekil 15. AR-V7 protein seviyelerinin iki grup arasında karşılaştırılması

AR-FL ve AR-V7 protein ve mRNA seviyelerinin birbirine olan oranlarını iki grup arasında kıyasladığımızda; mesane kanseri olan grupta AR-FL/AR-V7 protein oranı belirgin şekilde yüksek saptandı ($p < 0.05$). Ancak mesane kanserli grupta mRNA düzeyinde AR-FL/AR-V7 mRNA oranı belirgin şekilde düşük bulundu (Şekil 16, Şekil 17, $p < 0.05$).



Şekil 16. AR-FL/AR-V7 protein oranının iki grup arasında karşılaştırılması



Şekil 17. AR-FL/AR-V7 mRNA oranının iki grup arasında karşılaştırılması

Her bir mesane tümör örneğinin AR-FL ve AR-V7 protein ekspresyon analizlerinden elde edilen semi-kantitatif değerler normal mesane dokularından elde edilen AR-FL ve AR-V7 semi-kantitatif değerlerin ortalamasına oranla değerlendirildi. Tümör dokusunda AR-FL veya AR-V7 ekspresyonlarının normal doku ekspresyon ortalaması oranlarına göre yüksek olduğu durumda “Yüksek”, düşük olduğu durumda “Düşük” ve ekspresyon düzeylerinin benzer olduğu durumda “Değişmedi” olarak değerlendirilmiştir (Tablo 12). AR-FL protein ortalaması normal dokularda 0.126 olarak ölçüldü. 17 hastada sağlıklı grubun ortalamasına göre AR-FL protein ekspresyonunun daha yüksek olduğu gözlemlendi, 6 hastada AR-FL protein ekspresyonunun benzer olduğu gözlemlendi. 18 hastada AR-V7 protein ekspresyonu azalmış olarak saptanırken 3 hastada sağlıklı grubun ortalamasının üzerinde saptandı, 2 hastada ise ortalama benzer seviyede saptandı.

Tablo 102. Kansere hastalarının tümör dokularının AR ekspresyonlarında sağlıklı grubun dokuların ortalamalarına göre meydana gelen değişimler

Örnek No	AR-FL protein ekspresyon düzeyi	AR-FL mRNA ekspresyon düzeyi	AR-V7 protein ekspresyon düzeyi	AR-V7 mRNA ekspresyon düzeyi
BCa1	Yüksek	Düşük	Düşük	Değişmedi
BCa2	Yüksek	Düşük	Düşük	Yüksek
BCa3	Değişmedi	Düşük	Yüksek	Değişmedi
BCa4	Yüksek	Düşük	Düşük	Yüksek
BCa5	Yüksek	Düşük	Düşük	Düşük
BCa6	Yüksek	Düşük	Düşük	Yüksek
BCa7	Yüksek	Düşük	Düşük	Yüksek
BCa8	Değişmedi	Düşük	Düşük	Düşük
BCa9	Değişmedi	Düşük	Düşük	Değişmedi
BCa10	Yüksek	Düşük	Düşük	Yüksek
BCa11	Yüksek	Düşük	Düşük	Düşük
BCa12	Yüksek	Düşük	Düşük	Yüksek
BCa13	Değişmedi	Düşük	Düşük	Yüksek
BCa14	Yüksek	Düşük	Düşük	Değişmedi
BCa15	Yüksek	Düşük	Değişmedi	Yüksek
BCa16	Yüksek	Düşük	Yüksek	Yüksek
BCa17	Yüksek	Düşük	Düşük	Değişmedi
BCa18	Yüksek	Düşük	Düşük	Yüksek
BCa19	Yüksek	Düşük	Değişmedi	Düşük
BCa20	Değişmedi	Düşük	Düşük	Yüksek
BCa21	Değişmedi	Düşük	Yüksek	Düşük
BCa22	Yüksek	Düşük	Düşük	Düşük
BCa23	Yüksek	Düşük	Düşük	Yüksek

Tablo 13. Mesane kanserinde meydana gelen değişiklikler

	AR-FL Protein	AR-FL mRNA	AR-V7 Protein	AR-V7 mRNA
Normal Doku	-	-	-	-
Mesane Kanseri	Artmış	Azalmış	Azalmış	Artmış

Bulgularımızı özeti olarak, mesane kanseri dokusunda normal dokuya oranla; AR-FL protein ekspresyonu ve AR-V7 mRNA ekspresyonunda artış; AR-FL mRNA ve AR-V7 protein ekspresyonunda ise azalma saptanmıştır (Tablo 13).

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda, hücre büyümesi ve tümörogeneze katkısı olduğu bilinen AR-FL proteininin mesane kanserinde arttığı gözlenmiştir. AR-FL proteini literatürde daha önce mesane kanseri ve sağlıklı doku arasında yalnızca İHC yöntemi ile kıyaslanmıştır. Laor ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sağlıklı mesane dokusunda düşük seviyede AR-FL proteini bulunduğunu ve bulgularımıza benzer şekilde mesane tümörlerinde AR-FL protein miktarının arttığını gözlemlemiştir (10). Mashhadi ve arkadaşları benzer şekilde İHC ile yaptıkları çalışmada sağlıklı mesane dokusunda %0 oranında, mesane tümöründe ise %22 oranında AR-FL protein ekspresyonu pozitifliği saptamıştır (170). Tuygun ve arkadaşları da sağlıklı kontrol grubunda AR-FL protein ekspresyonu pozitifliği saptamazken mesane kanseri olgularında %51 oranında AR-FL pozitifliği saptadıklarını belirtmiştir (9). Her üç çalışmada da mesane kanserinde AR-FL proteini artışı saptanmasına karşın AR-FL ile hastalığın derecesi ve prognoz arasındaki ilişki incelendiğinde çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Laor ve arkadaşları yüksek dereceli tümörlerde düşük dereceli tümörlere göre AR-FL ekspresyonunun azaldığını göstermiş ve bunun tümör derecesi yükseldikçe beraberinde gelen diferansiasyonu kaybı ile ilişkili olduğunu savunmuştur (10). Tuygun ve arkadaşları da T2 mesane tümörlerinde Ta ve T1 evresindeki tümörlere göre daha düşük oranda AR-FL protein pozitifliği olduğunu belirtmiştir (9). Mashhadi ve arkadaşları ise bu çalışmaların aksine tümörün derecesi arttıkça AR-FL protein ekspresyonu pozitifliğinin arttığını göstermiştir (170). AR-FL mesane kanseri ilişkisinde literatürde başka çelişkiler de mevcuttur. Miyamoto, Boorjan ve Kauffman yaptıkları üç ayrı İHC çalışmasında sağlıklı dokularda mesane kanseri dokularına göre AR-FL protein ekspresyonunun daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (5,6,169). Yonekura ve arkadaşları AR-FL protein ekspresyonu pozitifliğinin rekürrensiz sağ kalım ile ilişkili olduğunu belirtmiştir, Nam ve arkadaşları da KİOMK ve KİMK hastaları üzerinde yaptığı çalışmada benzer sonuçlar elde etmiştir (12,171). 2020 yılında bu çalışmaları da içine alan bir meta-analizde tümörün histopatolojik özellikleri ile AR-FL protein ekspresyonu arasında ilişki bulunmamasına karşın AR-FL pozitifliğinin rekürrensiz sağ kalım ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (8).

Klinik çalışmalardaki çelişkili sonuçların ortaya çıkma sebeplerinin; mesane kanserinin heterojen doğası, farklı AR alt-tiplerinin mesane kanseri davranışı üzerindeki etkilerinin farklı olması ve ekspresyon ölçümündeki teknik kusurlar olabileceği savunulmuştur. Bu konudaki çalışmaların tamamı İHC yöntemi kullanılarak yapılmış olup çalışmalarda AR-FL protein ekspresyonu pozitifliğinin %8,75 ile %75 arasında değiştiği gözlenmiştir (8). Pozitiflik oranının çalışmalar arasında yüksek oranda değişiklik göstermesi İHC yönteminin güvenilirliğini hakkında şüphe doğurmaktadır. Ayrıca İHC yönteminin nükleer AR-FL protein ekspresyonunun yalnızca %5.7'sini, nükleer ve sitoplazmik AR-FL protein ekspresyonunun ise yalnızca %26.3'ünü saptayabildiği gösterilmiştir (172). Çalışmamızda literatürde ilk kez AR-FL protein ekspresyonu ölçümü için western blot yöntemi tercih edilmiştir. İHC basit, ucuz ve protein eldesi kolay bir yöntem olarak tercih edilmektedir. Ancak İHC'nin dezavantajları kantitatif olmaması, gözlemciye dayalı olması, standardize bir cut-off değerinin olmaması, antikor epitop ve antijen eldesindeki farklılıklar ve laboratuvar kaynaklı farklılıklardır. Western blot yöntemi ise; tekrarlanabilir, spesifik epitoplara sahip, düşük miktardaki proteini bile saptayabilen ve yüksek kantitatif sensitiviteye sahip bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (183). Çalışmamızda Western blot yöntemi ile tüm hastalarda AR-FL veya AR-V7 protein ekspresyonlarının semi-kantitatif şekilde gösterilebilir olması, WB yönteminin üstünlüğü yönünde bir kanıttır. Biz WB yönteminin literatürdeki çelişkinin önüne geçebilecek bir yöntem olduğu görüşündeyiz.

Çalışmamızda mesane kanserinin evresi, derecesi, boyutu, KİS varlığı ve AR-FL protein ekspresyonu arasında ilişki saptanmadı. AR-FL protein ekspresyonu tekil olan tümörlerde istatistiksel anlamlı şekilde daha yüksek saptandı. Örneklem sayımızın kısıtlılığı evre, derece gibi parametrelerdeki olası ilişkinin saptanamamasına yol açmış olabilir. Mesane kanseri risk faktörleri ile AR-FL protein ekspresyonu ilişkisinin çok daha büyük serilerde araştırılması kanıt değeri yüksek sonuçlara ulaştıracaktır.

Çalışmamız literatürde mesane kanserinde AR-FL mRNA ve AR-FL protein seviyelerinin eş zamanlı incelendiği ilk çalışmadır. Literatürde sağlıklı doku ve mesane kanseri arasında AR-FL mRNA ekspresyon seviyesinin kıyaslandığı bir çalışma bulunmamaktadır. mRNA ekspresyonu, protein sentezinin ilk ana

basamaklarındandır ve yüksek AR-FL proteininin AR-FL mRNA ekspresyonunu baskıladığı bilinmektedir (181,182). Çalışmamızda AR-FL mRNA ekspresyonu kanser dokusunda daha düşük saptanmıştır. Bu bulgunun mesane kanser gelişiminde rol oynamadığını, tam aksine kanser gelişimine sebep olan mekanizmalar nedeniyle oluştuğunu düşünmekteyiz. Biz bu yolla tümörogeneze katkısı olan asıl parametrenin artmış AR-FL proteini olduğu ve mesane kanserinde AR-FL protein artışına sekonder AR-FL mRNA ekspresyonunun azaldığı görüşündeyiz. AR-FL proteininin mRNA'sından bağımsız şekilde artmasının sebebi, mRNA basamağından (transkripsiyon) sonraki aşamalarda meydana gelen bir regülasyon kaybı olabilir. Regülasyon kaybı; translasyon, splicing, miRNA, protein degradasyonu, folding veya ubiquitin yıkım yolağı kökenli olabilir (175). Xiong ve arkadaşları long coding RNA ve miRNA aracılı AR sinyali regülasyonunun mesane kanseri gelişimi üzerindeki etkisini hücre kültürü üzerinde göstermişlerdir (184).

Tripathi ve arkadaşları yaptıkları derlemede İHC yöntemi ile yapılan klinik çalışmaların çelişkili sonuçlarından dolayı, AR sinyalinin mesane kanserindeki öneminin daha iyi anlaşılması için eş zamanlı hem protein hem de mRNA ekspresyonunun ölçüldüğü klinik çalışmalara ihtiyaç olduğunu savunmuştur (185). Çalışmamız bunu gerçekleştiren ilk çalışmadır ve çalışmanın sonuçları mesane kanserinde AR sinyalizasyonu hakkında yeni bilgiler ortaya çıkartmıştır.

AR-FL mRNA ekspresyonunun mesane kanseri davranışı üzerindeki etkisi daha önce incelenmiştir. Sikic ve arkadaşları KİOMK hastalarında yaptıkları çalışmada AR-FL mRNA ekspresyonu ile tümör derecesi, boyutu ve KİS varlığı arasında ilişki saptamasa da AR mRNA pozitifliği ile rekürrensiz sağ kalım arasında pozitif ilişki saptamışlardır (172). Yasui ve arkadaşları da benzer sonuçlar elde etmiştir (11). Bizim çalışmamızda AR-FL mRNA ekspresyonu ile tümörün evresi, derecesi, KİS varlığı, boyutu ve sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

AR splice varyantları (AR-V) AR-FL'nin ligand bağlayıcı bölgelerinin kesilmesi (splicing) ile meydana gelir. Splicing mRNA veya protein düzeyinde meydana gelebilir. AR-V'lerin kesik uçları son yıllarda farklı ajanların bağlanabileceği yeni bir hedef olarak görülmektedir ve bu hedefe yönelik ilaç çalışmaları gerçekleştirilmektedir (153). AR splice varyant 7 (AR-V7) şimdiye kadar

en çok üzerinde durulmuş AR-V'dir. AR-V7'nin prostat kanserinde rol oynadığı ve AR-V7 pozitifliğinde kastrasyon mekanizması ile fayda sağlayan ilaçların etkisinin azaldığı bilinmektedir (18,23). Ayrıca farklı AR-V'ler ile meme kanseri ve hepatoselüler kanser ilişkisi de gösterilmiştir (19,20). Hem prostat kanseri hem de hepatoselüler karsinomda AR-V pozitifliğinin, mesane kanserinde de kullanılan PD-L1 inhibitörlerine iyi yanıt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (186–188). Bununla birlikte AR-V7 protein ekspresyonu ile mesane kanseri ilişkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Mesane kanseri ve AR splice varyantları literatürde daha önce yalnızca bir çalışmada ele alınmıştır. 2021 yılında yapılan bu çalışmada mesane kanseri hücrelerinde AR-V'lerden yalnızca AR-V19 ekspresyonunun mesane kanserinde mevcut olduğu gösterilmiş ve bu durum mesane kanserinde AR yolağını hedef alan tedavilerin etkili olabileceği yönünde bir kanıt olarak sunulmuştur (167). Çalışmamız, mesane kanserinde AR-V7 mRNA ve protein seviyelerindeki değişikliklerin AR-FL'de meydana gelen değişikliklerle birlikte incelendiği, hatta mesane dokusunda AR-V7'nin varlığının gösterildiği ilk çalışmadır. Bulgularımıza göre mesane kanserinde AR-FL proteini dominant hale gelmekte ve AR-V7 protein miktarı azalmaktadır, buna karşın AR-V7 mRNA ekspresyonu artmaktadır. Ancak literatürde sınırlı veriye sahip olduğumuz AR-V7 hakkındaki bulgularımızı yorumlamak oldukça güçtür. AR-FL protein artışının altında yatan mekanizma veya regülasyon kaybı eş zamanlı splicingi ve/veya başka AR-V7 sentez basamaklarını duraksatıyor olabilir. Son ürün olan AR-V7 proteininin azalması AR-V7 mRNA üzerinde potansiyel baskılayıcı etkinin ortadan kalkması ve AR-V7 mRNA ekspresyonunun artması ile sonuçlanabilir. AR-V7 hakkındaki mevcut bilgiler AR-V7'nin mesane kanserinde rol oynadığı söylemek için yeterli değildir. Bu kompleks yolaklarda üretim veya yıkımın regülasyonunun her dört parametre için hangi basamakta sekteye uğradığının netleştirilmesi ve sorumlu bir olası “marker” bulunabilmesi için tam DNA (genomik) ve RNA (transkriptomik) sekanslama yapılmalı, biyoinformatik analizler ve in-vitro hücre kültürü destekli moleküler analizlerler kullanılmalı ve belirlenecek potansiyel sorumlu genlerin in-vitro ortamda overekspresyon ve inhibisyon (CRISPR-Cas9) çalışmaları ile fonksiyonları gösterilmelidir.

AR-V7 mRNA ve protein ekspresyonu parametreleri mesane dokusunda ilk kez bu çalışmada gösterilmiş olup literatürde mesane kanserinde davranışa etkisi konusunda veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda hastaların nüks durumu ele alınmamıştır. Ancak T evresi, KİS varlığı, tümör derecesi gibi nüksü öngören parametreler ile AR-V7 protein ve mRNA ekspresyonları arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Yalnızca AR-V7 mRNA ekspresyonunun 3 cm üzerindeki tümörlerde daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Mesane kanseri ve AR sinyali pre-klinik ve kesitsel birçok çalışmada ele alınmıştır. Miyamoto fareler üzerinde yaptığı çalışmada mesane kanseri gelişimini BBN ile indüklenmiş ve yabancı tip farelerin tamamında kanser geliştiğini göstermiştir. Bununla beraber kastre edilmiş farelerin yarısında kanser geliştiğini ve AR tamamen etkisiz hale getirilmiş (ARKO) farelerin ise hiçbirinde mesane kanseri gelişmediğini göstermiştir (3). Bu sayede pre-klinik düzeyde mesane kanseri gelişiminde hem androjenlerin hem de androjenden bağımsız AR aktivitesinin rolü olduğunu kanıtlamıştır. Miyamoto çalışmasının devamında mesane kanseri gelişen farelerin bir kısmına anti-androjen (flutamid) bir kısmına ise plasebo vermiş ve anti-androjen tedavi alan grupta apoptozun daha yüksek olduğunu ve tümör proliferasyonunun ve boyutunun belirgin şekilde daha düşük olduğunu göstermiştir. AR negatif zenograft tümörlerde ise anti androjen tedaviden benzer şekilde fayda görülmemiştir (3). AR'nin siRNA aracılı hedeflenmesi veya degradasyonunun sağlanması ile de anti-androjen tedaviye benzer şekilde tümör proliferasyonu ve boyutu azalmıştır (3).

5-alfa redüktaz inhibitörleri benign prostat hiperplazisi tedavisinde kullanılmaktadır ve testosteronun dihidrotestesterona dönüşümünü engeller. Dihidrotestesteron erkeklerde bilinen en potent androjendir (142). Morales ve arkadaşları 6 bini finasterid kullanan toplamda 72 bin bireyi ele alarak yaptıkları çalışmada finasterid kullanımının mesane kanseri gelişimi riskini azalttığını belirtmişlerdir (142). 2021 yılında yapılan bir meta-analizde de finasterid kullanımının mesane kanseri insidansını azalttığı gösterilmiştir(189). Kim ve arkadaşları da yaptıkları meta-analizde 5 alfa redüktaz inhibitörü kullanımının mesane kanseri insidansını azalttığını, mesane kanseri tanısından sonra 5 alfa redüktaz tedavisi başlanmasının ise kansere bağlı mortaliteyi azalttığını göstermişlerdir (190). Creta ve

arkadaşları ise özellikle düşük evredeki hastalıklarda 5 alfa redüktaz kullanımının mesane kanseri rekürrensini azaltabileceğini savunmuştur (191).

Primer prostat kanseri tedavisinde ise androjen deprivasyon tedavisi (ADT) kullanılmaktadır. Bu tedavide amaç hipotalamo-hipofizo-gonadal aksı baskılayarak androjen seviyesini kastrasyon sınırının altına getirilmesidir. İzumi ve Shiota yaptıkları çalışmalarda ADT alan hasta grubunda mesane kanseri insidansının ve rekürrensının daha düşük olduğunu belirtmiştir (16,17). Kim ve arkadaşlarının meta-analizinde de benzer şekilde ADT tedavisinin mesane kanseri rekürrensini azalttığını göstermiştir (190). Kourbanhousen ve arkadaşları da 12 çalışmayı ele alarak yaptıkları sistematik derlemede hem 5 alfa redüktaz inhibitörlerinin hem de ADT tedavisinin mesane kanserinin tedavisinde rol oynayabileceğini savunmuştur (192).

Mesane kanserinde AR-FL pozitifliğinin tedavi yanıtını öngörmede kullanılabileceği birçok farklı tedavi modalitesinde araştırılmıştır. KİOMK tedavisinde BCG tedavisi 40 yılı aşkın süredir altın standart tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (193). Mizushima ve arkadaşları hücre kültüründe AR-FL etkisiz hale getirildiğinde intraselüler BCG miktarının, BCG sitotoksitesinin ve dolayısı ile tedavi yanıtının arttığını göstermiştir. Yaptıkları mikroarray tarama sonucunda BCG ekzositozunda görevli Rab27b enziminin BCG dirençli hücrelerde upregüle olduğunu ve insan dokularında da AR/Rab27b ekspresyonu pozitif olanların yüksek rekürrens oranına sahip olduğunu gözlemlemiştir. AR aktivasyonunun Rab27b regülasyonunda rol oynadığını ve anti-androjen tedavinin bu sayede BCG yanıtını arttırmada rol oynayabileceğini belirtmiştir (194). Shang ve arkadaşları da hem hücre kültüründe hem de fare zenograft model üzerinde, anti-androjen tedavi (hidroksiflutamid) veya AR-FL degradasyonu sağlayan ASC-J9 tedavisi ile BCG yanıtının arttığını ve mesane kanseri progresyonunun daha iyi baskılandığını göstermiştir (195).

KİMK veya metastatik mesane kanserinde ise kemoterapi endikasyonu varlığında altın standart tedavi sisplatin bazlı kemoterapi kombinasyonlarıdır (15). Kashiwagi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada AR-FL pozitifliğinin sisplatin direnci ile ilişkili olduğunu belirtmiş ve anti androjen tedavinin sisplatin direncinin üstesinden gelmek için gerekli olduğunu savunmuştur (15). Mesane kanserinde kullanılan başka bir kemoterapötik ajan olan doksorubisinin etkinliğinin de anti androjen tedavi ile

arttığı gösterilmiştir (196). İkinci basamak anti androjen tedavilerden olan enzalutamidin de mesane kanserinde kullanılan gempitabin direncini azalttığı bilinmektedir (191).

Ürotelyal karsinomun geliştiği mesane epiteli ürogenital sinüs endoderminden oluşmaktadır ve AR-FL sinyali bu dokunun diferansiasyonu ve gelişiminde rol oynar (174). AR-FL sinyali tümör supressor genleri, enzim aktivitesini, non-genomik yolları, miRNA'ları ve otofaji gibi süreçleri regüle ederek kanser gelişimine katkıda bulunur. Literatürde hücre kültürlerinde ve zenograft modellerde mesane kanserinin gelişiminde, progresyonunda AR-FL aktivasyonunun rol oynadığı net şekilde gösterilmiştir. Kesitsel çalışmalarda anti-androjen tedavi alan bireylerde mesane kanseri insidansının ve rekürrensının daha düşük olduğunun saptanması yine AR-FL aktivasyonunun mesane kanseri gelişimindeki etkisine yönelik bir kanıttır. Mesane kanserinin birçok tedavi modalitesinin etkinliğinin yine anti androjen tedaviler ile artabileceği savunulmaktadır. Bütün bu destekleyici verilerin yanında İHC ile yapılan klinik kesitsel çalışmalardaki AR-FL pozitifliği açısından çelişkili sonuçlar göze batmaktadır. Literatürde bu kafa karışıklığını gidermek için alternatif protein ölçüm yöntemleri ve eş zamanlı mRNA ile protein ekspresyonu ölçümü yapılmasının gerekli olduğunu savunan yayınlar bulunmaktadır (185). Çalışmamız bu alanda protein ekspresyonunun sağlıklı ve kanser dokusu arasında WB yöntemi ile çalışıldığı ve semi-kantitatif verilerin elde edildiği ilk çalışmadır. Ayrıca eş zamanlı mRNA ve protein ekspresyon analizlerinin yapıldığı ilk çalışmadır.

Kanser hücrelerinin moleküler ve genetik yapısının kansere yönelik tedaviler sonucunda değişikliğe uğradığı farklı organ kanserlerinde gösterilmiştir (197). Çalışmamızın bir diğer kuvvetli yanı çalışmamıza yalnızca daha önce mesane kanseri nedeniyle tedavi almamış naif KİOMK hastalarının dahil edilmiş olmasıdır. Ayrıca çalışmamızda protein ve mRNA ölçümü yapılacak dokuların parafin bloklardan değil rezeksiyondan hemen sonra taze olarak elde edilmiş ve ölçüme kadar uygun koşullarda saklanmış olması çalışmamızın güçlü yönlerindendir.

Mesane kanserinde AR-FL ve AR-V7 yollarında meydana gelen değişikliklerin incelenmesi için gelecek çalışmalara ihtiyaç vardır. Mesane kanserinde AR yolağında hem mRNA hem de protein düzeyinde yeni bir yaklaşım uygulayarak

bulduğumuz veriler regülasyon kaybının altta yatan mekanizmasını netleştirecek çalışmalara ışık tutacaktır. Bu yolların daha iyi anlaşılması mesane kanseri tedavisinde AR hedefli tedavilerin kullanımı için kanıt oluşturacaktır.

6.KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I BF. Cancer Today [Internet]. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [30.01.2021]. 2021 [cited 2021 Jan 30]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>
2. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. Eur Urol [Internet]. 2013;63(2):234–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2012.07.033>
3. Miyamoto H, Yang Z, Chen YT, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y, et al. Promotion of bladder cancer development and progression by androgen receptor signals. J Natl Cancer Inst [Internet]. 2007 Apr 4 [cited 2022 Jan 12];99(7):558–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406000/>
4. Ide H, Inoue S, Miyamoto H. Histopathological and prognostic significance of the expression of sex hormone receptors in bladder cancer: A meta-analysis of immunohistochemical studies. PLoS One. 2017;12(3):1–13.
5. Miyamoto H, Yao JL, Chaux A, Zheng Y, Hsu I, Izumi K, et al. Expression of androgen and oestrogen receptors and its prognostic significance in urothelial neoplasm of the urinary bladder. BJU Int. 2012;109(11):1716–26.
6. Eric C. Kauffman¹, Brian D. Robinson, Martin Downes, Leigh G. Powell, Ming Ming Lee, Douglas S. Scherr, Lorraine J. Gudas and NPM. Role of androgen receptor and associated lysine-demethylase coregulators, LSD1 and JMJD2A, in localized and advanced human bladder cancer. Mol Carcinog 2011 December ; 50(12) 931–944 doi10.1002/mc2075. 2011;
7. Mir C, Shariat SF, Van Der Kwast TH, Ashfaq R, Lotan Y, Evans A, et al. Loss of androgen receptor expression is not associated with pathological stage, grade, gender or outcome in bladder cancer: A large multi-institutional study. BJU Int. 2011;108(1):24–30.
8. Sanguedolce F, Cormio L, Carrieri G, Calò B, Russo D, Menin A, et al. Role of androgen receptor expression in non-muscle-invasive bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. Histol Histopathol. 2020;35(5):423–32.
9. Tuygun C, Kankaya D, Imamoglu A, Sertcelik A, Zengin K, Oktay M, et al. Sex-specific hormone receptors in urothelial carcinomas of the human urinary bladder: A comparative analysis of clinicopathological features and survival outcomes according to receptor expression. Urol Oncol Semin Orig Investig [Internet]. 2011;29(1):43–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2009.01.033>

10. Laor E, Schiffman ZJ, Braunstein JD, Reid RE, Tolia BM, Koss LG, et al. Androgen receptors in bladder tumors. *Urology*. 1985;25(2):161–3.
11. Yasui M, Kawahara T, Izumi K, Yao M, Ishiguro Y, Ishiguro H, et al. Androgen receptor mRNA expression is a predictor for recurrence-free survival in non-muscle invasive bladder cancer. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1–6.
12. Yonekura S, Terauchi F, Hoshi K, Yamaguchi T, Kawai S. Androgen Receptor Predicts First and Multiple Recurrences in Non-Muscle Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Pathol Oncol Res*. 2019;25(3):987–94.
13. Lee KH, Kim BC, Jeong SH, Jeong CW, Ku JH, Kim HH, et al. Histone demethylase kdm7a regulates androgen receptor activity, and its chemical inhibitor tc-e 5002 overcomes cisplatin-resistance in bladder cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16):1–21.
14. Tyagi A, Chandrasekaran B, Kolluru V, Rai S, Jordan AC, Houda A, et al. Combination of androgen receptor inhibitor and cisplatin, an effective treatment strategy for urothelial carcinoma of the bladder. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2019;37(7):492–502. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2019.03.008>
15. Kashiwagi E, Ide H, Inoue S, Kawahara T, Zheng Y, Reis LO, et al. Androgen receptor activity modulates responses to cisplatin treatment in bladder cancer. *Oncotarget*. 2016;7(31):49169–79.
16. Shiota M, Yokomizo A, Takeuchi A, Imada K, Kiyoshima K, Inokuchi J, et al. Secondary bladder cancer after anticancer therapy for prostate cancer: reduced comorbidity after androgen-deprivation therapy. *Oncotarget* [Internet]. 2015 [cited 2022 Jan 12];6(16):14710. Available from: [/pmc/articles/PMC4546499/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25557268/)
17. Izumi K, Taguri M, Miyamoto H, Hara Y, Kishida T, Chiba K, et al. Androgen deprivation therapy prevents bladder cancer recurrence. *Oncotarget* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jan 12];5(24):12665–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25557268/>
18. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Sep 11 [cited 2022 Feb 5];371(11):1028–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25184630/>
19. Dauki AM, Blachly JS, Kautto EA, Ezzat S, Abdel-Rahman MH, Coss CC. Transcriptionally Active Androgen Receptor Splice Variants Promote Hepatocellular Carcinoma Progression. *Cancer Res* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Jan 8];80(3):561–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31685543/>
20. Hickey TE, Irvine CM, Dvinge H, Tarulli GA, Hanson AR, Ryan NK, et al. Expression of androgen receptor splice variants in clinical breast cancers. *Oncotarget* [Internet]. 2015 [cited 2022 Jan 8];6(42):44728–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26554309/>
21. Sharp A, Coleman I, Yuan W, Sprenger C, Dolling D, Rodrigues DN, et al.

- Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer. *J Clin Invest*. 2019;129(1):192–208.
22. Markowski MC, Frick KD, Eshleman JR, Luo J, Antonarakis ES. Cost-Savings Analysis of AR-V7 Testing in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Eligible for Treatment With Abiraterone or Enzalutamide. *Prostate*. 2016 Dec 1;76(16):1484–90.
 23. Scher HI, Lu D, Schreiber NA, Louw J, Graf RP, Vargas HA, et al. Association of AR-V7 on circulating tumor cells as a treatment-specific biomarker with outcomes and survival in castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncol*. 2016 Nov 1;2(11):1441–9.
 24. Key Statistics for Bladder Cancer [Internet]. [cited 2021 Jan 30]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/key-statistics.html#references>
 25. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. medical sciences Epidemiology of Bladder Cancer. *Med Sci*. 2020;8(15):1–12.
 26. WHO. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025. 2019. 121 p.
 27. Partin AW, editor. *Campbell-Walsh-Wein Urology*. 12th ed. Elsevier Inc.; 2021. 14125 p.
 28. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JWF, La Vecchia C. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol* [Internet]. 2016;70(3):458–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2015.06.042>
 29. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2011;306(7):737–45.
 30. Tanagho EA, Lue TF. *Smith & Tanagho's General Urology*. 19th ed. Smith & Tanagho's General Urology. 2020.
 31. Gu J, Liang D, Wang Y, Lu C, Wu X. Effects of N-acetyl transferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2005;581(1–2):97–104.
 32. Yan H, Ying Y, Xie H, Li J, Wang X, He L, et al. Secondhand smoking increases bladder cancer risk in nonsmoking population: a meta-analysis. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2018 Sep 21 [cited 2021 Jan 31];Volume 10:3781–91. Available from: <https://www.dovepress.com/secondhand-smoking-increases-bladder-cancer-risk-in-nonsmoking-populat-peer-reviewed-article-CMAR>
 33. Bjurlin MA, Matulewicz RS, Roberts TR, Dearing BA, Schatz D, Sherman S, et al. Carcinogen Biomarkers in the Urine of Electronic Cigarette Users and Implications for the Development of Bladder Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol Oncol* [Internet]. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.euo.2020.02.004>

34. Hartge P, Harvey EB, Linehan WM, Silverman DT, Sullivan JW, Hoover RN, et al. Unexplained excess risk of bladder cancer in men. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(20):1636–40.
35. Hemelt M, Yamamoto H, Cheng KK, Zeegers MPA. The effect of smoking on the male excess of bladder cancer: A meta-analysis and geographical analyses. *Int J Cancer.* 2009;124(2):412–9.
36. Yuesheng Zhang. Understanding the gender disparity in bladder cancer risk: The impact of sex hormones and liver on bladder susceptibility to carcinogens. *Natl Institutes Heal [Internet].* 2013; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3852434/pdf/nihms533246.pdf>
37. Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, Lotan Y, Noon AP, Resnick MJ, et al. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol [Internet].* 2016;69(2):300–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2015.08.037>
38. Poirier MC, Beland FA. DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in rodents. *Environ Health Perspect.* 1994;102(SUPPL. 6):161–5.
39. Buckley DB, Klaassen CD. Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(1):121–7.
40. Karagas MR, Park S, Warren A, Hamilton J, Nelson HH, Mott LA, et al. Gender, smoking, glutathione-S-transferase variants and bladder cancer incidence: A population-based study. *Cancer Lett.* 2005;219(1):63–9.
41. McGrath M, Michaud DS, De Vivo I. Hormonal and reproductive factors and the risk of bladder cancer in women. *Am J Epidemiol.* 2006;163(3):236–44.
42. Sarah E. Daugherty¹, James V. Lacey Jr^{2, 3}, Ruth M. Pfeiffer¹, Yikyung Park¹ RN, Hoover¹ and DTS. Reproductive factors and menopausal hormone therapy and bladder cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. 2013;130(6):1411–9.
43. Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, Bahadori A, Chromecki TF, Karakiewicz PI, et al. Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis. *World J Urol.* 2011;29(4):457–63.
44. Jeldres C, Isbarn H, Capitanio U, Baillargeon-Gagne S, Bhojani N, Shariat SF, et al. Gender Is an Important Predictor of Cancer-Specific Survival in Patient With Transitional Cell Carcinoma After Radical Cystectomy. *J Urol [Internet].* 2009;181(4):635. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(09\)61783-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(09)61783-3)
45. Joshua A. Cohn, M.D.¹, Benjamin Vekhter, Ph.D.², Christopher Lyttle, M.S.² GD, Steinberg, M.D.¹, and Michael C. Large MD. Sex disparities in diagnosis of bladder cancer after initial presentation with hematuria: a nationwide claims-based investigation. 2015;120(4):555–61.
46. Mungan NA, Aben KKH, Schoenberg MP, Visser O, Coebergh JWW, Witjes

- JA, et al. Gender differences in stage-adjusted bladder cancer survival. *Urology*. 2000;55(6):876–80.
47. Scosyrev E, Noyes K, Feng C, Messing E. Sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US. *Cancer*. 2009;115(1):68–74.
 48. Kluth LA, Rieken M, Xylinas E, Kent M, Rink M, Rouprêt M, et al. Gender-specific differences in clinicopathologic outcomes following radical cystectomy: An international multi-institutional study of more than 8000 patients. *Eur Urol*. 2014;66(5):913–9.
 49. Scosyrev E, Golijanin D, Wu G, Messing E. The burden of bladder cancer in men and women: Analysis of the years of life lost. *BJU Int*. 2012;109(1):57–62.
 50. Mitra AP, Skinner EC, Schuckman AK, Quinn DI, Dorff TB, Daneshmand S. Effect of gender on outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder: A critical analysis of 1,994 patients. *Urol Oncol Semin Orig Investig [Internet]*. 2014;32(1):52.e1-52.e9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.08.007>
 51. Kiemeny LALM. Hereditary bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol*. 2008;42(SUPPL.218):110–5.
 52. THELEN A, SCHAEUBLE J. [Simultaneous occurrence of bladder papilloma in uniovular twins]. *Z Urol*. 1957;50(4):188–95.
 53. Fraumeni JF, Thomas LB. Malignant Bladder Tumors in a Man and His Three Sons. *JAMA J Am Med Assoc*. 1967;201(7):507–9.
 54. Mueller CM, Caporaso N, Greene MH. Familial and genetic risk of transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2008;26(5):451–64.
 55. Dong C, Hemminki K. Modification of cancer risks in offspring by sibling and parental cancers from 2,112,616 nuclear families. *Int J Cancer*. 2001;92(1):144–50.
 56. García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: Results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*. 2005;366(9486):649–59.
 57. Gu J, Wu X. Genetic susceptibility to bladder cancer risk and outcome. *Per Med*. 2011;8(3):365–74.
 58. Guey LT, García-Closas M, Murta-Nascimento C, Lloreta J, Palencia L, Kogevinas M, et al. Genetic Susceptibility to Distinct Bladder Cancer Subphenotypes. *Eur Urol*. 2010;57(2):283–92.
 59. Phelan A, Lopez-Beltran A, Montironi R, Zhang S, Raspollini MR, Cheng M, et al. Inherited forms of bladder cancer: A review of Lynch syndrome and other inherited conditions. *Futur Oncol*. 2018;14(3):277–90.
 60. Mitra AP, Birkhahn M, Cote RJ. P53 and Retinoblastoma Pathways in

Bladder Cancer. *World J Urol*. 2007;25(6):563–71.

61. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Samarghandian S, Najafi M. PTEN: What we know of the function and regulation of this onco-suppressor factor in bladder cancer? *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2020;881:173226. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173226>
62. Cumberbatch MGK, Cox A, Teare D, Catto JWF. Contemporary occupational carcinogen exposure and bladder cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(9):1282–90.
63. Al-Zalabani AH, Stewart KFJ, Wesselius A, Schols AMWJ, Zeegers MP. Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. Vol. 31, *European Journal of Epidemiology*. Springer Netherlands; 2016. 811–851 p.
64. Reimar R.W. Gaertner1,* LT, Kenneth C. Johnson2 & The Canadian Cancer Registries, Group3 ER. A case–control study of occupational risk factors for bladder cancer in Canada. *Cancer Causes Control*. 2004;
65. Mossanen M, Kibel AS, Goldman RH. Exploring exposure to Agent Orange and increased mortality due to bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2017;35(11):627–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.07.030>
66. Vlaanderen J, Straif K, Ruder A, Blair A, Hansen J, Lynge E, et al. Tetrachloroethylene exposure and bladder cancer risk: A meta-analysis of dry-cleaning-worker studies. *Environ Health Perspect*. 2014;122(7):661–6.
67. Liang Z, Wang X, Xie B, Zhu Y, Wu J, Li S, et al. Pesticide exposure and risk of bladder cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(41):66959–69.
68. MELIKER J, NRIAGU J. Arsenic in drinking water and bladder cancer: review of epidemiological evidence. *Arsen Soil Groundw Environ - Biogeochem Interact Heal Eff Remediat*. 2007;9(06):551–84.
69. Polat A, Myo S, Tar O. İçme sularında arsenik kirlenmesi.
70. Üniversitesi DE, Fakültesi M, Bölümü ÇM. İÇME SularındaArsenKirliliği :Ülkemiz AçısındanBirDeğerlendirme. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilim Derg*. 2009;15(1):69–79.
71. Tsuji JS, Alexander DD, Perez V, Mink PJ. Arsenic exposure and bladder cancer: Quantitative assessment of studies in human populations to detect risks at low doses. *Toxicology* [Internet]. 2014;317(1):17–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2014.01.004>
72. Mink PJ, Alexander DD, Barraj LM, Kelsh MA, Tsuji JS. Low-level arsenic exposure in drinking water and bladder cancer: A review and meta-analysis. *Regul Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2008;52(3):299–310. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.08.010>
73. Koutros S, Baris D, Waddell R, Freeman LEB, Joanne S, Schwenn M, et al. Potential effect modifiers of the arsenic-bladder cancer risk relationship. 2019;143(11):2640–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6235710/pdf/nihms-977807.pdf>

74. Koutros S, Kogevinas M, Friesen MC, Stewart PA, Baris D, Karagas MR, et al. Diesel exhaust and bladder cancer risk by pathologic stage and grade subtypes. *Environ Int* [Internet]. 2020;135(December 2019):105346. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105346>
75. Reed O, Jubber I, Griffin J, Noon AP, Goodwin L, Hussain S, et al. Occupational bladder cancer: A cross section survey of previous employments, tasks and exposures matched to cancer phenotypes. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(10 October):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0239338>
76. Ros MM, Bas Bueno-De-Mesquita HB, Büchner FL, Aben KKH, Kampman E, Egevad L, et al. Fluid intake and the risk of urothelial cell carcinomas in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2011;128(11):2695–708.
77. Qin J, Xie B, Mao Q, Kong D, Lin Y, Zheng X. Tea consumption and risk of bladder cancer: a meta-analysis. *World J Surg Oncol* [Internet]. 2012;10(1):1. Available from: *World Journal of Surgical Oncology*
78. Bai Y, Yuan H, Li J, Tang Y, Pu C, Han P. Relationship between bladder cancer and total fluid intake: A meta-analysis of epidemiological evidence. *World J Surg Oncol*. 2014;12(1):1–11.
79. Vartolomei MD, Iwata T, Roth B, Kimura S, Mathieu R, Ferro M, et al. Impact of alcohol consumption on the risk of developing bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J Urol* [Internet]. 2019;37(11):2313–24. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00345-019-02825-4>
80. Yao B, Yan Y, Ye X, Fang H, Xu H, Liu Y, et al. Intake of fruit and vegetables and risk of bladder cancer: a dose–response meta-analysis of observational studies. *Cancer Causes Control*. 2014;25(12):1645–58.
81. Li Z, Yu J, Miao Q, Sun S, Sun L, Yang H, et al. The association of fish consumption with bladder cancer risk: A meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2011;9:1–7.
82. Crippa A, Larsson SC, Discacciati A, Wolk A, Orsini N. Red and processed meat consumption and risk of bladder cancer: a dose–response meta-analysis of epidemiological studies. *Eur J Nutr*. 2018;57(2):689–701.
83. Guo J, Wei W, Zhan L. Red and processed meat intake and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;151(1):191–8.
84. Li F, Zhou Y, Hu RT, Hou LN, Du YJ, Zhang XJ, et al. Egg consumption and risk of bladder cancer: A meta-analysis. *Nutr Cancer*. 2013;65(4):538–46.
85. Shephard RJ. Physical activity in the prevention and management of bladder cancer. *J Sports Med Phys Fitness*. 2017;57(10):1359–66.
86. Noguchi JL, Liss MA, Parsons JK. Obesity, Physical Activity and Bladder Cancer. *Curr Urol Rep*. 2015;16(10).
87. Lin Y, Wang Y, Wu Q, Jin H, Ma G, Liu H, et al. Association between obesity

- and bladder cancer recurrence: A meta-analysis. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2018;480(January):41–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.01.039>
88. Chen YC, Kao LT, Lin HC, Lee HC, Huang CC, Chung SD. Increased risk for urological cancer associated with anxiety disorder: A retrospective cohort study. *BMC Urol* [Internet]. 2016;16(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12894-016-0187-x>
 89. Gu F, Xiao Q, Chu LW, Yu K, Matthews CE, Hsing AW, et al. Sleep duration and cancer in the NIH-AARP diet and health study cohort. *PLoS One*. 2016;11(9):1–14.
 90. Blanc-Lapierre A, Rousseau MC, Weiss D, El-Zein M, Siemiatycki J, Parent MÉ. Lifetime report of perceived stress at work and cancer among men: A case-control study in Montreal, Canada. *Prev Med (Baltim)* [Internet]. 2017;96:28–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2016.12.004>
 91. Tang J er, Wang R jiang, Zhong H, Yu B, Chen Y. Vitamin A and risk of bladder cancer: A meta-analysis of epidemiological studies. *World J Surg Oncol*. 2014;12(1):1–9.
 92. Zhao Y, Chen C, Pan W, Gao M, He W, Mao R, et al. Comparative efficacy of vitamin D status in reducing the risk of bladder cancer: A systematic review and network meta-analysis. *Nutrition* [Internet]. 2016;32(5):515–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2015.10.023>
 93. Zhang H, Wen X, Zhang Y, Wei X, Liu T. Vitamin D Deficiency and Increased Risk of Bladder Carcinoma: A Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(5):1686–92.
 94. Lin J-H, Chen S-J, Liu H, Yan Y, Zheng J-H. Vitamin E consumption and the risk of bladder cancer. *Int J Vitam Nutr Res* [Internet]. 2019 Sep;89(3–4):168–75. Available from: <https://econtent.hogrefe.com/doi/10.1024/0300-9831/a000553>
 95. Duan F, Mei C, Yang L, Zheng J, Lu H, Xia Y, et al. Vitamin K2 promotes PI3K/AKT/HIF-1 α -mediated glycolysis that leads to AMPK-dependent autophagic cell death in bladder cancer cells. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–15.
 96. Wang YY, Wang XL, Yu ZJ. Vitamin c and e intake and risk of bladder cancer: A meta-analysis of observational studies. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(11):4154–64.
 97. Peng D, Ge G, Gong Y, Zhan Y, He S, Guan B, et al. Vitamin C increases 5-hydroxymethylcytosine level and inhibits the growth of bladder cancer. *Clin Epigenetics*. 2018;10(1):1–13.
 98. Vinceti M, Filippini T, Del Giovane C, Dennert G, Zwahlen M, Brinkman M, et al. Selenium for preventing cancer (Cochrane Review). *Cochrane database Syst Rev*. 2018;(1):Art. No.: CD005195.
 99. He H, Shui B. Folate intake and risk of bladder cancer: A meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Food Sci Nutr*. 2014;65(3):286–92.

100. Myung SK, Kim Y, Ju W, Choi HJ, Bae WK. Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol*. 2009;21(1):166–79.
101. Tang H, Shi W, Fu S, Wang T, Zhai S, Song Y, et al. Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med*. 2018;7(4):1070–80.
102. Guercio V, Turati F, Bosetti C, Polesel J, Serraino D, Montella M, et al. Bladder cancer risk in users of selected drugs for cardiovascular disease prevention. *Eur J Cancer Prev*. 2019;28(2):76–80.
103. Zhang H, Jiang D, Li X. Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Bladder Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *PLoS One*. 2013;8(7):1–8.
104. Nieder AM, Porter MP, Soloway MS. Radiation Therapy for Prostate Cancer Increases Subsequent Risk of Bladder and Rectal Cancer: A Population Based Cohort Study. *J Urol*. 2008;180(5):2005–10.
105. Faurschou M, Mellekjaer L, Voss A, Keller KK, Hansen IT, Baslund B. Prolonged risk of specific malignancies following cyclophosphamide therapy among patients with granulomatosis with polyangiitis. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2015;54(8):1345–50.
106. Travis LB, Curtis RE, Glimelius B, Holowaty EJ, Van Leeuwen FE, Lynch CF, et al. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Apr;87(7):524–30.
107. A. R. FEIXUSON, M.D. C. ASSOCIATED BILHARZIOSIS AND PRIMARY MALIGNANT DISEASE OF THE URINARY BLADDER, WITH OBSERVATIONS ON A SERIES OF FORTY CASES.I. 1911;i.
108. Zaghloul MS. Bladder cancer and schistosomiasis. *J Egypt Natl Canc Inst* [Internet]. 2012;24(4):151–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnci.2012.08.002>
109. Piper JM, Matanoski GM, Tonascia J. Bladder cancer in young women. *Am J Epidemiol*. 1986;123(6):1033–42.
110. Kjaer SK, Knudsen JB, Sørensen BL, Jensen M. The copenhagen case-control study of bladder cancer V. Review of the role of urinary-tract infection. *Acta Oncol (Madr)*. 1989;28(5):631–6.
111. Vermeulen SH, Hanum N, Grotenhuis AJ, Castaño-Vinyals G, Van Der Heijden AG, Aben KK, et al. Recurrent urinary tract infection and risk of bladder cancer in the Nijmegen bladder cancer study. *Br J Cancer*. 2015;112(3):594–600.
112. Sun LM, Lin CL, Liang JA, Liu SH, Sung FC, Chang YJ, et al. Urinary tract infection increases subsequent urinary tract cancer risk: A population-based cohort study. *Cancer Sci*. 2013;104(5):619–23.
113. Bayne CE, Farah D, Herbst KW, Hsieh MH. Role of urinary tract infection in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J Urol* [Internet]. 2018;36(8):1181–90. Available from:

<https://doi.org/10.1007/s00345-018-2257-z>

114. Jiang X, Castelao JE, Groshen S, Cortessis VK, Shibata D, Conti D V., et al. Urinary tract infections and reduced risk of bladder cancer in Los Angeles. *Br J Cancer*. 2009;100(5):834–9.
115. Jørgensen KR, Jensen JB. Human papillomavirus and urinary bladder cancer revisited. *Apmis*. 2020;35(8):72–9.
116. Gabriel J, Starrett CBB. BK polyomavirus is a cause of bladder cancer Gabriel. *Dep Heal Hum Serv*. 2019;176(3):139–48.
117. Zeng Y, Sun J, Bao J, Zhu T. BK polyomavirus infection promotes growth and aggressiveness in bladder cancer. *Virol J*. 2020;17(1):1–9.
118. Abol-Enein H. Infection: Is it a cause of bladder cancer? *Scand J Urol Nephrol*. 2008;42(SUPPL.218):79–84.
119. Wu P, Zhang G, Zhao J, Chen J, Chen Y, Huang W, et al. Profiling the urinary microbiota in male patients with bladder cancer in China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8(MAY):1–10.
120. Alfano M, Canducci F, Nebuloni M, Clementi M, Montorsi F, Salonia A. The interplay of extracellular matrix and microbiome in urothelial bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2016;13(2):77–90.
121. Xu W, Yang L, Lee P, Huang WC, Nossa C, Ma Y, et al. Mini-review: perspective of the microbiome in the pathogenesis of urothelial carcinoma. *Am J Clin Exp Urol [Internet]*. 2014;2(1):57–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25126590><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4219294>
122. Ho CH, Sung KC, Lim SW, Liao CH, Liang FW, Wang JJ, et al. Chronic indwelling urinary catheter increase the risk of bladder cancer, even in patients without spinal cord injury. *Med (United States)*. 2015;94(43):1–6.
123. Melzak J. National Spinal Injuries Centre , Stoke Mandeville Hospital , Aylesbury , Bucks ., England Urinary Tract Pathology prior to Bladder Cancer . Four patients (Cases I , 3 , . 1966;(1963).
124. Welk B, McIntyre A, Teasell R, Potter P, Loh E. Bladder cancer in individuals with spinal cord injuries. *Spinal Cord*. 2013;51(7):516–21.
125. Böthig R, Kurze I, Fiebag K, Kaufmann A, Schöps W, Kadhum T, et al. Clinical characteristics of bladder cancer in patients with spinal cord injury: the experience from a single centre. *Int Urol Nephrol*. 2017;49(6):983–94.
126. Kalisvaart JF, Katsumi HK, Ronningen LD, Hovey RM. Bladder cancer in spinal cord injury patients. *Spinal Cord [Internet]*. 2010;48(3):257–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sc.2009.118>
127. Yu Z, Yue W, Jiuzhi L, Youtao J, Guofei Z, Wenbin G. The risk of bladder cancer in patients with urinary calculi: a meta-analysis. *Urolithiasis [Internet]*. 2018;46(6):573–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00240-017-1033-7>
128. Pierre K, Borer J, Phelps A, Chow JS. Bladder exstrophy: Current

- management and postoperative imaging. *Pediatr Radiol*. 2014;44(7):768–86.
129. Austin JC, Elliott S, Cooper CS. Patients with spina bifida and bladder cancer: atypical presentation, advanced stage and poor survival. *J Urol*. 2007 Sep;178(3 Pt 1):798–801.
 130. Lenis AT, Lec PM, Chamie K. Bladder cancer a review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;324(19):1980–91.
 131. Anastasiadis A, de Reijke TM. Best practice in the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *Ther Adv Urol* [Internet]. 2012 [cited 2022 Feb 1];4(1):13. Available from: [/pmc/articles/PMC3263923/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2363923/)
 132. EAU Guidelines: Non-muscle-invasive Bladder Cancer | Uroweb [Internet]. [cited 2022 Feb 1]. Available from: <https://uroweb.org/guideline/non-muscle-invasive-bladder-cancer/#4>
 133. Lobo N, Shariat SF, Guo CC, Fernandez MI, Kassouf W, Choudhury A, et al. What Is the Significance of Variant Histology in Urothelial Carcinoma? *Eur Urol Focus* [Internet]. 2020;6(4):653–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.euf.2019.09.003>
 134. DeGeorge KC, Holt HR, Hodges SC. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician* [Internet]. 2017 Oct 15 [cited 2022 Feb 1];96(8):507–14. Available from: www.aafp.org/afp
 135. AJCC Cancer Staging Handbook. *AJCC Cancer Staging Handb*. 2010;
 136. Messing EM, Tangen CM, Lerner SP, Sahasrabudhe DM, Koppie TM, Wood DP, et al. Effect of Intravesical Instillation of Gemcitabine vs Saline Immediately Following Resection of Suspected Low-Grade Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer on Tumor Recurrence: SWOG S0337 Randomized Clinical Trial. *JAMA* [Internet]. 2018 May 8 [cited 2022 Feb 1];319(18):1880–8. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2680547>
 137. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Holmang S, Sydes MR, Birtle A, Gudjonsson S, 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* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2022 Feb 1];69(2):231–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26091833/>
 138. Soukup V, Babjuk M, Bellmunt J, Dalbagni G, Giannarini G, Hakenberg OW, et al. Follow-up after surgical treatment of bladder cancer: A critical analysis of the literature. *Eur Urol*. 2012;62(2):290–302.
 139. Kamat AM, Li R, O'Donnell MA, Black PC, Roupret M, Catto JW, et al. Predicting Response to Intravesical Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy: Are We There Yet? A Systematic Review. *Eur Urol*. 2018 May 1;73(5):738–48.
 140. Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, Van Andel G, et

- al. EORTC Nomograms and Risk Groups for Predicting Recurrence, Progression, and Disease-specific and Overall Survival in Non-Muscle-invasive Stage Ta–T1 Urothelial Bladder Cancer Patients Treated with 1–3 Years of Maintenance Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol*. 2016 Jan 1;69(1):60–9.
141. Alameddine M, Kineish O, Ritch C. Predicting Response to Intravesical Therapy in Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol Focus* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 Feb 1];4(4):494–502. Available from: <http://www.eufocus.europeanurology.com/article/S2405456918302165/fulltext>
 142. Morales EE, Grill S, Svatek RS, Kaushik D, Thompson IM, Ankerst DP, et al. Finasteride Reduces Risk of Bladder Cancer in a Large Prospective Screening Study. *Eur Urol* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2022 Jan 12];69(3):407–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26320383/>
 143. Tran L, Xiao JF, Agarwal N, Duex JE, Theodorescu D. Advances in bladder cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2021;21(2):104–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-020-00313-1>
 144. De Maeseneer DJ, Delafontaine B, Rottey S. Checkpoint inhibition: new treatment options in urologic cancer. *Acta Clin Belgica Int J Clin Lab Med* [Internet]. 2017;72(1):24–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17843286.2016.1260890>
 145. Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas*. 2009;63(2):142–8.
 146. Brinkmann AO, Blok LJ, De Ruiter PE, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets CA, et al. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;69(1–6):307–13.
 147. Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J*. 1992;11(3):1003–13.
 148. Ronald M. Evans. The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily on JSTOR. *Science* (80-) [Internet]. 1988;240(4854):889–95. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.library.georgetown.edu/pmc/articles/PMC6159881/pdf/nihms-989143.pdf%0Ahttp://www.jstor.org.libproxy.usc.edu/stable/1701095?pq-origsite=summon&seq=1#page_scan_tab_contents
 149. Li D, Zhou W, Pang J, Tang Q, Zhong B, Shen C, et al. A magic drug target: Androgen receptor. *Med Res Rev*. 2019;39(5):1485–514.
 150. Jenster G, Van Der Korput HAGM, Vroonhoven C Van, Van Der Kwast TH, Trapman J, Brinkmann AO. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol*. 1991;5(10):1396–404.
 151. Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev*. 2005;105(9):3352–70.
 152. Dalal K, Roshan-Moniri M, Sharma A, Li H, Ban F, Hessein M, et al. Selectively targeting the DNA-binding domain of the androgen receptor as a

- prospective therapy for prostate cancer. *J Biol Chem*. 2014;289(38):26417–29.
153. Wach S, Taubert H, Cronauer M. Role of androgen receptor splice variants, their clinical relevance and treatment options. *World J Urol* [Internet]. 2020;38(3):647–56. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00345-018-02619-0>
 154. Uo T, Plymate SR, Sprenger CC. The potential of AR-V7 as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2018;22(3):201–16. Available from: <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1439016>
 155. Daniel E Shumer Norman P Spack NJN. Emerging Mechanisms of Resistance to Androgen Receptor Inhibitors in Prostate Cancer. *Physiol Behav*. 2017;176(12):139–48.
 156. Edwards J, Krishna NS, Grigor KM, Bartlett JMS. Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *Br J Cancer*. 2003;89(3):552–6.
 157. Mary-Ellen Taplin, M.D., Glenn J., Bubley, M.D, Todd D. Shuster, M.D., Martha E. Frantz, Amy E. Spooner, George K. Ogata, Harold N. Keer, M.D., Ph.D. SPBMD. MUTATION OF THE ANDROGEN-RECEPTOR GENE IN METASTATIC ANDROGEN-INDEPENDENT PROSTATE CANCER. 1995;332.
 158. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med*. 2004;10(1):33–9.
 159. El-Amm J, Patel N, Freeman A, Aragon-Ching JB. Metastatic castration-resistant prostate cancer: Critical review of enzalutamide. *Clin Med Insights Oncol*. 2013;7:235–45.
 160. Kim W, Ryan CJ. Androgen receptor directed therapies in castration-resistant metastatic prostate cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2012;13(2):189–200.
 161. Assi R, Temraz S, Shamseddine A, Mukherji D. New Compounds Targeting the Androgen Receptor for Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Curr Drug Targets*. 2016;17(3):290–302.
 162. Cao S, Zhan Y, Dong Y. Emerging data on androgen receptor splice variants in prostate cancer.
 163. Roggero CM, Jin L, Cao S, Sonavane R, Kopplin NG, Ta HQ, et al. A detailed characterization of stepwise activation of the androgen receptor variant 7 in prostate cancer cells. *Oncogene* 2020 406 [Internet]. 2020 Dec 15 [cited 2022 Jan 8];40(6):1106–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41388-020-01585-5>
 164. Zhang T, Karsh LI, Nissenblatt MJ, Canfield SE. Androgen Receptor Splice Variant, AR-V7, as a Biomarker of Resistance to Androgen Axis-Targeted Therapies in Advanced Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Jan 8];18(1):1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31653572/>
 165. Hillebrand AC, Pizzolato LS, Neto BS, Branchini G, Brum IS. Androgen

- receptor isoforms expression in benign prostatic hyperplasia and primary prostate cancer. *PLoS One*. 2018;13(7):1–17.
166. Zhan Y, Zhang G, Wang X, Qi Y, Bai S, Li D, et al. Interplay between cytoplasmic and nuclear androgen receptor splice variants mediates castration resistance. *Mol Cancer Res*. 2017;15(1):59–68.
 167. Katleba K, Lombard AP, Tsamouri MM, Baek HB, Nishida KS, Libertini SJ, et al. Depletion of androgen receptor low molecular weight isoform reduces bladder tumor cell viability and induces apoptosis. *Cancer Lett [Internet]*. 2021 Apr 28 [cited 2022 Jan 8];504:49–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33549708/>
 168. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7–30.
 169. Boorjian S, Ugras S, Mongan NP, Gudas LJ, You X, Tickoo SK, et al. Androgen receptor expression is inversely correlated with pathologic tumor stage in bladder cancer. *Urology*. 2004;64(2):383–8.
 170. Mashhadi R, Pourmand G, Kosari F, Mehraei A, Salem S, Pourmand MR, et al. Role of steroid hormone receptors in formation and progression of bladder carcinoma: A case-control study. *Urol J*. 2014;11(6):1968–73.
 171. Nam JK, Park SW, Lee SD, Chung MK. Prognostic value of sex-hormone receptor expression in non-muscle-invasive bladder cancer. *Yonsei Med J*. 2014;55(5):1214–21.
 172. Sikic D, Breyer J, Hartmann A, Burger M, Erben P, Denzinger S, et al. High Androgen Receptor mRNA Expression Is Independently Associated with Prolonged Cancer-Specific and Recurrence-Free Survival in Stage T1 Bladder Cancer. *Transl Oncol [Internet]*. 2017;10(3):340–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2017.01.013>
 173. Jiang G, Teramoto Y, Goto T, Mizushima T, Inoue S, Ide H, et al. Identification of BXDC2 as a key downstream effector of the androgen receptor in modulating cisplatin sensitivity in bladder cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(5):1–13.
 174. Martínez-Rojo E, Berumen LC, García-Alcocer G, Escobar-Cabrera J. The role of androgens and androgen receptor in human bladder cancer. *Biomolecules*. 2021;11(4).
 175. Buccitelli C, Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet [Internet]*. 2020;21(10):630–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>
 176. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. [Internet]. New York: 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
 177. Blagden SP, Willis AE. The biological and therapeutic relevance of mRNA translation in cancer. *Nat Rev Clin Oncol [Internet]*. 2011;8(5):280–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.16>
 178. Kempfer R, Pombo A. Methods for mapping 3D chromosome architecture.

- Nat Rev Genet [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Jan 12];21(4):207–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31848476/>
179. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nat Rev Genet [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 Jan 12];17(6):333–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27184599/>
 180. Robichaud N, Sonenberg N, Ruggero D, Schneider RJ. Translational control in cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2019;11(7):1–16.
 181. Ma T, Bai S, Qi Y, Zhan Y, Ungerleider N, Zhang DY, et al. Increased transcription and high translation efficiency lead to accumulation of androgen receptor splice variant after androgen deprivation therapy. undefined. 2021 Apr 28;504:37–48.
 182. Cai C, He HH, Chen S, Coleman I, Wang H, Fang Z, et al. Androgen Receptor Gene Expression in Prostate Cancer Is Directly Suppressed by the Androgen Receptor Through Recruitment of Lysine-Specific Demethylase 1. Cancer Cell [Internet]. 2011;20(4):457–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.001>
 183. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. Biomed Res Int [Internet]. 2014 [cited 2022 Feb 12];2014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24738055/>
 184. Xiong Y, Wang L, Li Y, Chen M, He W, Qi L. The Long Non-Coding RNA XIST Interacted with MiR-124 to Modulate Bladder Cancer Growth, Invasion and Migration by Targeting Androgen Receptor (AR). Cell Physiol Biochem. 2017;43(1):405–18.
 185. Tripathi A, Gupta S. Androgen receptor in bladder cancer: A promising therapeutic target. Asian J Urol [Internet]. 2020;7(3):284–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2020.05.011>
 186. Li Y, Huang Q, Zhou Y, He M, Chen J, Gao Y, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression in patients with prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. Front Pharmacol. 2019;9(JAN).
 187. Boudadi K, Suzman DL, Anagnostou V, Fu W, Lubner B, Wang H, et al. Ipilimumab plus nivolumab and DNA-repair defects in AR-V7-expressing metastatic prostate cancer. Oncotarget. 2018;9(47):28561–71.
 188. Jiang G, Shi L, Zheng X, Zhang X, Wu K, Liu B, et al. Androgen receptor affects the response to immune checkpoint therapy by suppressing PD-L1 in hepatocellular carcinoma. Aging (Albany NY). 2020;12(12):11466–84.
 189. Xiang P, Du Z, Hao Y, Guan D, Liu D, Yan W, et al. Impact of Androgen Suppression Therapy on the Risk and Prognosis of Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Front Oncol. 2021 Dec 14;11:5291.
 190. Kim A, Kim MS, Ahn JH, Choi WS, Park HK, Kim HG, et al. Clinical significance of 5- α reductase inhibitor and androgen deprivation therapy in bladder cancer incidence, recurrence, and survival: a meta-analysis and

systemic review. *Aging Male* [Internet]. 2021;23(5):971–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/13685538.2019.1646238>

191. Creta M, Celentano G, Napolitano L, La Rocca R, Capece M, Califano G, et al. Inhibition of Androgen Signalling Improves the Outcomes of Therapies for Bladder Cancer: Results from a Systematic Review of Preclinical and Clinical Evidence and Meta-Analysis of Clinical Studies. *Diagnostics* (Basel, Switzerland) [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Mar 20];11(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33672461/>
192. Kourbanhousen K, McMartin C, Lodde M, Zlotta A, Bryan RT, Toren P. Switching Cancers: A Systematic Review Assessing the Role of Androgen Suppressive Therapy in Bladder Cancer. *Eur Urol Focus* [Internet]. 2021;7(5):1044–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.euf.2020.10.002>
193. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, et al. EAU Guidelines on Non–Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2020. Vol. 71, *European Urology*. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2020. ISBN 978-94-92671-07-3.; 2017. 447–461 p.
194. Mizushima T, Jiang G, Kawahara T, Li P, Han B, Inoue S, et al. Androgen receptor signaling reduces the efficacy of bacillus Calmette-Guérin therapy for bladder cancer via modulating Rab27b-induced exocytosis. *Mol Cancer Ther*. 2020;19(9):1930–42.
195. Shang Z, Li Y, Zhang M, Tian J, Han R, Shyr CR, et al. Anti-androgen therapy with Hydroxyflutamide or androgen receptor degradation enhancer ASC-J9® enhances BCG efficacy to better suppress bladder cancer progression. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2022 Feb 12];14(11):2586. Available from: [/pmc/articles/PMC4704455/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25860000/)
196. Shiota M, Takeuchi A, Yokomizo A, Kashiwagi E, Tatsugami K, Kuroiwa K, et al. Androgen receptor signaling regulates cell growth and vulnerability to doxorubicin in bladder cancer. *J Urol* [Internet]. 2012;188(1):276–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2012.02.2554>
197. Boguszewicz Ł, Bieleń A, Jarczewski JD, Ciszek M, Skorupa A, Skłodowski K, et al. Molecular response to induction chemotherapy and its correlation with treatment outcome in head and neck cancer patients by means of NMR-based metabolomics. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1–14.