



**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MESANE KANSERİNDE TOLL-BENZERİ
RESEPTÖRLERİN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN
BELİRLENMESİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

Seda SABAH ÖZCAN

**Aralık 2014
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MESANE KANSERİNDE TOLL-BENZERİ
RESEPTÖRLERİN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN
BELİRLENMESİ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Seda SABAH ÖZCAN

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Vildan CANER

Denizli, 2014

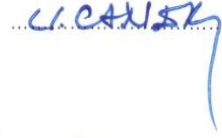
DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Seda SABAH ÖZCAN tarafından Doç. Dr. Vildan CANER yönetiminde hazırlanan "Mesane Kanseri TOLL-Benzeri Reseptörlerin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Neziha YILMAZ
Bozok Üniversitesi



Danışman: Doç. Dr. Vildan CANER
Pamukkale Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Pamukkale Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Ö. Levent TUNCAY
Pamukkale Üniversitesi



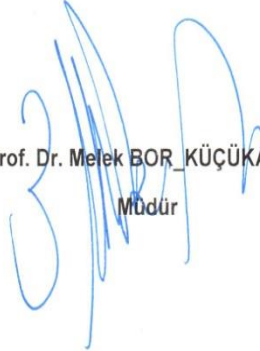
Üye: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
Pamukkale Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

12/2/15 tarih ve 4-20 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Melek BOR_KÜÇÜKATAY
Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :

Öğrenci Adı Soyadı : Seda SABAH ÖZCAN

ÖZET

MESANE KANSERİNDE TOLL-BENZERİ RESEPTÖRLERİN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Seda SABAH ÖZCAN
Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Vildan CANER

Aralık 2014, 101 sayfa

Mesane ortaya çıkan malign tümörlerin %94'ünden fazlasını ürotelyal karsinoma (UK)'lar oluşturmaktadır ve bu karsinomalar morfolojik ve genetik açıdan heterojen tümörlerdir. UK'lar dünyada en sık görülen 5. kanser tipi olup, Türkiye'de erkeklerde akciğer ve prostat kanserinden sonra 3. sırada yer almaktadır. Birçok çevresel faktörün UK gelişiminde rol oynadığının bilinmesine karşın, hastalığın nedenleri ve karsinogenez mekanizması net olarak tanımlanmamıştır. Toll-benzeri reseptör (TLR)'ler patojenlere ve hasarlı veya ölü hücrelerden kaynaklanan endojen tehlike sinyallerine yanıtta doğal ve adaptif immunitenin aktivasyonunda önemli rol oynarlar. Bu reseptörler immun sistem hücrelerinde ve bazı epitel hücrelerinde eksprese olurlar. Son yıllardaki çalışmalar bu reseptörlerin malign epitel hücrelerde de eksprese olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, TLR ekspresyonlarının UK karsinogenezindeki rollerini belirlemek amacı ile 24 UK ve 46 non-tumoral mesane doku örneklerinde TLR1-10'un mRNA ekspresyonları gerçek-zamanlı PCR ile değerlendirildi. TLR ekspresyonlarının proinflamatuvar sitokinlerin üretimlerini artırıp artırmadıklarını belirlemek için, ELISA yöntemi ile idrar örneklerinde pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6 ve IL8) konsantrasyonları belirlendi.

Normal doku örnekleri ile karşılaştırıldığında, TLR2-7 ve TLR10 ekspresyonlarının anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. Bu ekspresyon profilleri aynı zamanda doku örnekleri alınan bireylerin idrar örnekleri ile de karşılaştırıldı ve bu profillerin identikal olmadıkları gözlemlendi. Aynı zamanda TLR1 ve TLR7 ekspresyon artışlarının tümör büyüklüğü ile ilişkili olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.043$). Kanserli olmayan kontrol grubu olgularının idrar örnekleri ile karşılaştırıldığında, UK'lı bireylerin idrar örneklerinde IL-1 β , IL6 ve IL8 düzeylerinin anlamlı derecede arttığı belirlendi (sırasıyla $p= 0.033$, $p= 0.001$ ve $p=0.008$). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, yüksek dereceli UK'da TLR9 ekspresyonu düşük dercelilere göre daha yüksekti ($p=0,057$).

Bu çalışmadan elde edilen veriler, normal epitel ve tümör dokularında TLR'lerin farklı ekspresyon profiline sahip olduklarını ve bu ekspresyonların en azından inflamatuvar yolakları uyaran ve henüz bilinmeyen bir mekanizma ile UK oluşumu ve progresyonunda rol oynayabildiklerini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Toll-benzeri reseptörler (TLR), Mesane kanseri, Gen ekspresyonu, Pro-inflamatuvar sitokinler

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2012SBE015)

ABSTRACT**DETERMINATION OF EXPRESSION PROFILES OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN
BLADDER CARCINOMA**

SABAH OZCAN, Seda
Ph D. Thesis in Medical Biology
Supervisor: Assoc. Prof. Vildan CANER

December 2014, 101 pages

More than 95% of all bladder cancers are urothelial carcinomas (UCs) and they are morphologically and genetically heterogeneous tumors. UCs are the fifth most common cancers in the world and it is the third most common cancer after lung and prostate cancer in man in Turkey. The causes of the disease and the process of carcinogenesis have not been fully identified although it is well known that many environmental factors contribute to the development of UC. Toll-like receptors (TLRs) have an important role in the activation of both innate and adaptive immunity in response to pathogens and endogenous danger signals from damaged or dying cells. These receptors are expressed in immune cells and in some epithelia. Several reports have described the expression of TLRs in malignant epithelial cells.

In this study, it was evaluated the mRNA expression of TLRs 1-10 in 24 of UC and 46 of non-tumoral bladder tissue samples by real-time PCR whether they play a role in the carcinogenesis. Whether the expressions of TLRs activates the production of proinflammatory cytokines, it was also determined the levels of the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and IL8) in the urine samples by ELISA.

TLR2-7 and TLR10 expressions were significantly higher in the UC tissue samples compared to the normal tissues. The profiles of TLR expression were also used to compare the profiles of urine samples taken from the same patient and the TLR expression profiles from the tissue and urine samples of the same patient were not identical. It was also determined that the high expressions of TLR1 and TLR7 were associated with advanced tumor size ($p=0.001$ and $p=0.043$, respectively). Compare to the urine samples taken from the patients with non-malignant disease, the levels of IL-1 β , IL6 and IL8 were significantly higher in the patients with UC ($p= 0.033$, $p= 0.001$ and $p=0.008$). The expression of TLR9 was higher in the high-grade UCs than in low-grade UCs although there was no statistically significance ($p=0.057$).

All results obtained from this study shows that TLR genes were differentially expressed in normal epithelial versus tumor tissues and might at least play a role in the tumor formation and the progression of UC with the unknown mechanisms that induce the inflammatory pathways.

Keywords: Toll-like receptors (TLR), Bladder cancer, Gene expression, Pro-inflammatory cytokines

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research
Projects Coordination Unit through project numbers 2012SBE015.**

TEŞEKKÜR

Doktora tezim boyunca çalışmamın her aşamasında bana sabırla yol gösteren, bana her zaman yanımda olduğunu hissettiren, hem akademisyenliğe hem de hayata yaklaşımıyla bana örnek olan sevgili danışman hocam **Doç. Dr. Vildan CANER**'e,

doktora eğitimim süresince desteğini benden esirgemeyen değerli hocam **Prof. Dr. Gülseren BAĞCI**'ya,

tez çalışmam sırasında beni motive eden ve destekleyen hocalarım **Prof. Dr. Levent TUNCAY** ve **Prof. Dr. Saadettin ESKİÇORAPÇI**'ya,

çalışmamın deney aşamalarında içtenlik ve özveriyle bana yardımcı olan arkadaşlarım, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı **Araştırma Görevlileri Levent ELMAS** ve **İkbal Cansu BARIŞ** ve **Üroloji AD Araştırma Görevlileri Aykut BAŞER** ve **Mahmut Taha ÖLÇÜCÜ**'ye ve

istatistik verilerinin analizinde yardımlarını esirgemeyen, **Prof. Dr. Mehmet ZENCİR**, **Doç. Dr. Nursel KOYUNCU** ve **M. Raşit BAKIR**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi, tez sürecinde de maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, yaşamımın bana verdiği en değerli hediye olan **canım aileme**, eşim **Fatih ÖZCAN**'a ve **dostlarıma** tüm kalbimle sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	3
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Mesanenin Anatomik ve Histolojik Yapısı.....	4
2.2. Ürotelyal Karsinoma	5
2.2.1. Epidemiyoloji.....	5
2.2.2. Etiyoloji ve risk faktörleri	8
2.2.2.1. <i>Sigara kullanımı</i>	8
2.2.2.2. <i>Mesleksen risk faktörleri</i>	9
2.2.2.3. <i>Genetik yatkınlık</i>	9
2.2.2.4. <i>Enfeksiyon</i>	10
2.2.2.5. <i>Radyasyon</i>	11
2.2.2.6. <i>Beslenme alışkanlıkları</i>	11
2.2.3. TNM Evrelendirmesi	12
2.2.3.1. <i>T kategorisi</i>	13
2.2.3.2. <i>N kategorisi</i>	14
2.2.3.3. <i>M kategorisi</i>	14
2.2.4. Derecelendirme(grade'leme).....	14

2.2.5. Klinik ve tanı	15
2.2.5.1. İdrar indikatörleri.....	16
2.2.5.2. Diagnostik transüretal rezeksiyonu.....	16
2.2.6. Prognoz.....	17
2.2.7. Tedavi	18
2.2.7.1. Kasa invaze olmayan ürotelyal karsinomada tedavi.....	18
2.2.7.1.1. Transüretal rezeksiyon (TUR)	18
2.2.7.1.2. İntravezikal tedaviler	19
2.2.7.2. Kasa invazive mesane tümörlerinde tedavi.....	20
2.2.7.2.1. Radikal sistektomi	21
2.2.8. Ürotelyal karsinomanın gelişiminde ve progresyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalar.....	21
2.2.8.1. Kasa invaze olmayan ürotelyal karsinomadaki moleküler değişimler	24
2.2.8.1.1. FGFR 3.....	27
2.2.8.1.2. PIK3CA	28
2.2.8.1.3. Siklin D1	28
2.2.8.1.4. MikroRNA Ekspresyonu	29
2.2.8.2. Kasa invaze ürotelyal karsinomadaki moleküler değişimler	29
2.2.8.2.1. Onkogenler	31
2.2.8.2.2. Tümör baskılayıcı genler	33
2.2.8.3. İnvaziv ürotelyal karsinomadaki diğer genomik değişimler	34
2.2.8.4. MikroRNA ekspresyonu	34
2.3. Ürotelyal karsinomada sinyal yolları	35
2.3.1. Ürotelyal tümör-başlatıcı hücreler	35
2.4. Toll-benzeri Reseptör (TLR)'ler	36
2.4.1. TLR'lerin lokalizasyonları ve ligandları.....	38
2.4.2. TLR sinyal iletimi	39
2.4.2.1. MYD88- bağımlı yolak	42
2.4.2.2. MYD88-bağımsız ya da TRIF-bağımlı yolak	42
2.4.3. TLR'ler ve kanser	43
2.4.4. Mesane kanseri tedavisinde TLR'lerin rolü	47

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	49
3.1.Çalışma grubu.....	49
3.2.Doku ve İdrar örneklerinden Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	50
3.2.1.Total RNA izolasyonu.....	50
3.2.2.Total RNA örneklerinin konsantrasyonlarının ve saflık derecelerinin belirlenmesi.....	51
3.2.3.Total RNA örneklerinden cDNA sentezi.....	51
3.3. Gerçek-zamanlı PCR	51
3.4. Pro-inflamatuvar Sitokinlerin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	55
3.5. İstatiksel Analiz.....	56
4. BULGULAR	58
4.1. Olgulara Ait Demografik ve Patolojik Parametreler.....	58
4.2. Olgulara ait <i>TLR1-10</i> mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	59
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇLAR	90
7. KAYNAKLAR	92
8. ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Mesanenin anatomik (a) ve histolojik (b) yapısı..... 5
Şekil 2.2	TNM klasifikasyon sistemine göre mesane karsinomlarında T kategorileri 13
Şekil 2.3	İnsan mesane dokusunda üropatojenlere (a) ve BCG'ye (b) karşı TLR yanıtının şematize gösterimi. 20
Şekil 2.4	Kasa invaze olan ve olmayan mesane kanserlerinde farklı moleküler yollar..... 23
Şekil 2.5	Ürotelyal karsinomda moleküler değişimlerin gözleendiği yollar ve ağlar..... 25
Şekil 2.6	İnvaziv olmayan papiller ürotelyal neoplazilerin erken onkogeneğinde Ras-MAPK, Jak-STAT ve PI3K-AKT-mTOR sinyalizasyon yolları arasındaki ilişkiler..... 28
Şekil 2.7	(a) TLR'ün şematize edilmiş yapısal modeli ve (b) TLR'lerin dimer yapısının kristallografi modeli 36
Şekil 2.8	TLR'lerin hücre içi lokalizasyonları ve fizyolojik fonksiyonları 38
Şekil 2.9	Memeli TLR sinyal iletim yolları 41
Şekil 2.10	İnflamasyonda TLR yolağı 44
Şekil 2.11	Tümör mikroçevresinde TLR'ler ile tümör progresyonu arasındaki ilişki 46
Şekil 3.1	Hedef genlerin mRNA ekspresyonlarının kantitatif analizlerinde kullanılan bir pleyt örneği..... 55
Şekil 4.1	Ürotelyal karsinomlu doku örneklerinde <i>TLR1-10</i> ve <i>β-aktine</i> özgün amplifikasyon eğrileri..... 63
Şekil 4.2	Ürotelyal karsinomlu idrar örneklerinde <i>TLR1-10</i> ve <i>β-aktine</i> özgün amplifikasyon eğrileri..... 67
Şekil 4.3	Olgu ve kontrol grubuna ait mesane doku örneklerinde <i>TLR</i> ekspresyonları 69
Şekil 4.4	Olgu ve kontrol grubuna ait idrar örneklerinde <i>TLR</i> ekspresyonları. 69
Şekil 4.5	Ürotelyal karsinomlu doku ve idrar örneklerinde farklı <i>TLR</i> ekspresyon profillerini gösteren Venn diagramları..... 72
Şekil 4.6	Ürotelyal karsinoma ve kontrol grubu bireylerde pro-inflamatuvar sitokinlerin ortalama konsantrasyonları..... 73

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 2.1	Ülkemizde yıllara göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı.....	7
Tablo 2.2	Ülkemizde yıllara göre erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün insidansı.....	7
Tablo 2.3	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından karsinojen olarak tanımlanan spesifik aromatik aminler	9
Tablo 2.4	Mesane karsinomlarının 2004 yılı TMN evrelendirmesi	12
Tablo 2.5	Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1973 ve 2004 yılı derecelendirme (Grade) sistemini karşılaştırılması.....	15
Tablo 2.6	İnvaziv Mesane Tümörlerindeki Genetik Değişimler.....	31
Tablo 2.7	NMIBC ve MIBC'de yeni moleküler prognostik markerlar	34
Tablo 2.8	TLR'ler ve ligandları	39
Tablo 2.9	Farklı tipteki kanserlerde aşırı ekspresyonları rapor edilen TLR'ler	47
Tablo2.10	Ürotelyal karsinomanda TLR-aracılı immunoterapi için önerilen ligantlar.....	52
Tablo 3.1	<i>TLR1-10</i> ve <i>β-aktin</i> mRNA ekspresyon analizlerinde kullanılan özgün primer dizilimleri (5'→3') ve UPL numaraları	54
Tablo 3.2	<i>TLR1-10</i> ve <i>β-aktin</i> genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı.....	54
Tablo 3.3	<i>TLR1-10</i> ve <i>β-aktin</i> genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü*.....	56
Tablo 3.4	Pro-inflamatuvar sitokinlerin konsantrasyonlarını belirlemede kullanılan standartlara ait konsantrasyon değerleri	59
Tablo 4.1	Ürotelyal karsinoma olgularına ait patolojik parametreler.....	61
Tablo 4.2	Ürotelyal karsinoma olgularında <i>TLR1-10</i> ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik verilerin karşılaştırılması.....	71
Tablo 4.3	Pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonlarının klinikopatolojik verilerle karşılaştırılması.....	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APC.....	Adeno-matozpoipozis koli
BCG.....	Bacillus Calmette-Guerin
cAMP.....	Siklik Adenozin Monofosfat
CDK.....	Siklin bağımlı kinaz
CDKI.....	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CIS.....	Karsinoma in situ
CYP.....	Sitokrom P450
DAMP.....	Damage ilişkili moleküler paternler
FGFR.....	Fibroblast büyüme faktör reseptörü
GSTM.....	Glutatson S transferaz Mu
JAK.....	Janus tirozin kinaz
Jun.....	Jun onkojeni
MAL.....	Miyelin ve lenfosit protein
MAPK.....	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MYD88.....	Miyeloid diferansiyasyon faktör 88
NAT-2.....	N-Asetiltransferaz 2
NFkB.....	Nüklear faktör kappa B
NMP.....	Nüklear matriks protein
PAMP.....	Patojenle ilişkili moleküler paternler
PCNA.....	Prolifere edici hücre çekirdek antijeni
PI3K.....	Fosfotidil-inositol 3-kinaz
PRR.....	Patern tanıma reseptörleri
PTCH1.....	Patched homolog 1
PTEN.....	Fosfotaz ve tensin homoloğu
PUP.....	Preneoplastik üretalyal plak
RB1.....	Retinoblastoma 1
STAT.....	Sinyal ileme ve transkripsiyon aktivatörü
TAA.....	Tümör ilişkili antijen
TLR.....	Toll-benzeri reseptör
TRAM.....	Toll-benzeri reseptör
TRIF.....	TRIF ilişkili adaptör protein
TSCI.....	Toll/IL-1 reseptör domain adaptörü
TUR.....	Tüberöz skleroz I Trans üretyal rezeksiyon

1. GİRİŞ

Mesanede ortaya çıkan malign tümörlerin yaklaşık %95'i ürotelyumdan gelişen ürotelyal karsinomlardır (Çalışmamızda da ürotelyal karsinoma tanısı alan olgular değerlendirildiğinden, tezin bundan sonraki bölümlerinde mesane kanseri yerine ürotelyal karsinoma terimi kullanılacaktır) ve heterojen özellikleri taşımaktadırlar. Ürotelyal karsinomlar dünyada en sık görülen 5. kanser tipi olup, erkeklerde kadınlara oranla 3 kat fazla görülmektedir. Yaşla birlikte görülme sıklığında artış dikkati çekmektedir ve hastaların %80'i 50-79 yaş arasındadır (Kirkali vd 2005, Peterson vd 2006). Morbidite ve mortalite oranları ise, ülkelere ve etnik gruplara göre farklılık göstermektedir (Murta-Nascimento 2007).

Ürotelyal karsinoma etyolojisinde, aile öyküsünün ciddi risk faktörü olduğu ile ilgili veriler oldukça sınırlıdır (Droller 2004). Her ne kadar konağa ait faktörlerin (glutatyon-S-transferaz, Sitokrom P-450 izozimleri gibi) etyolojide rol oynayabileceği gösterilmişse de, primer olarak çevresel karsinojenlere maruz kalmanın hastalığın etyolojisi ile oldukça yakından ilişkili olduğu görülmektedir (Droller 2004, Lokeshwar vd 2011). Buna göre çevresel faktörler; bireyin yaşam tarzı (sigara, alkol kullanımı gibi), toksik etkenler (arsenik gibi), mesleki risk faktörleri (tekstil sanayinde ve kuaförlerde kullanılan kimyasal boyalar, petrol endüstrisinde kullanılan kimyasallar gibi) ve enfeksiyon/inflamasyon (Şistozoma enfeksiyonu ve tekrarlayan sistit gibi) olarak gruplandırılabilir.

Ürotelyal karsinoma gelişimi ve progresyonunun moleküler temelini aydınlatmaya yönelik geçmişte yapılan çalışmalar, bu iki süreçten sorumlu genler ve/veya kromozomal bölgelerin belirlenmesine odaklanmışlardır (Lokeshwar vd 2011). Belirli genetik değişimlerin (9. kromozomdaki heterozigosite kaybı, *p53*, *FGFR* gibi özgün genetik mutasyonların kazanımı gibi) patogeneze önemli bir rol oynayabileceğinin belirlenmesine karşın, günümüzde tüm kanserlerin patogenezi olduğu gibi bu çok evreli karsinogenez sürecinde birçok genetik ve epigenetik faktörlerin sorumlu olabileceği gösterilmiştir (Lokeshwar vd 2011). Her geçen gün hastalığın patogenezi ile ilgili bilgi birikimimiz artmakla birlikte, henüz bu karsinomanın

patogenezi net olarak aydınlatılamamıştır ve hala en önemli soru hangi gen/lerdeki genetik ve/veya epigenetik değişimlerin spesifik tümör gelişiminden ve bu malign fenotipin devamlılığından sorumlu olduklarıdır.

Toll-benzeri reseptör (Toll-like receptor, TLR)'ler konak savunmasında patojenlere ve hücre içi tehlike sinyallerine karşı doğal immun yanıtın oluşturulmasında ve adaptif ikincil immun yanıtın aktivasyonunda kritik role sahip, evrim sürecinde sıkı korunmuş integral membran reseptörleridir. Günümüze kadar memelilerde 13 TLR analoğu tanımlanmakla birlikte, TLR11, 12 ve 13 insanlarda eksprese olmayıp sadece farelerde fonksiyoneldirler. TLR1, 2, 4, 5 ve 6 hücre yüzeyinde eksprese olurlarken TLR3, 7, 8 ve 9 hemen hemen tamamıyla endozomların yüzeyinde eksprese olurlar (Lawless vd 2012). Farklı TLR'lere özgün patojen-kökenli ligandlar hakkında daha detaylı bilgilerimizin bulunmasına karşın, özellikle hücre içi tehlike sinyalleri olarak rol oynayan ligandlar başta olmak üzere her bir reseptöre özgün ligandlar hakkında oldukça sınırlı bilgi birikimimiz vardır (Lawless vd 2012, Wang vd 2013). TLR'ler başlıca makrofaj ve dendritik hücreler gibi önemli immun sistem hücrelerinde eksprese olurlar ve patojen invazyonunun anahtar sensörleridir (Miyake 2007). Son yıllardaki veriler fonksiyonel TLR'lerin sadece immun sistem hücrelerinde değil kanser hücrelerinde de eksprese olduklarını göstermektedir (Ayari vd 2011). Benzer şekilde, TLR'lerin tümör mikroçevresinde var olan kronik inflamasyon sırasında hem karsinogenezde hem de tümör progresyonunda rol oynadıkları belirlenmiştir. Hasarlı normal epitel hücrelerden ve nekrotik kanser hücrelerinden köken alan hasarla-ilişkili moleküler kalıplar (Damage-associated molecular patterns, DAMPs), tümör mikroçevresinde önemli düzeyde bulunmaktadır ve bu kalıpların özgün TLR'leri uyarmalarının kronik inflamasyonu uyardığı düşünülmektedir (Sato vd 2009, Bhatelia vd 2014, Husseinzadeh vd 2014).

Helicobacter pylori (*H.pylori*) ile infekte kronik gastritli bireylerdeki yüksek gastrik kanseri riski, kronik inflamasyon ve kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi gösteren önemli bir örnektir (Mantovani vd 2008). TLR2, 4, 5 ve 9'un normal gastrik epitel hücrelerinde eksprese olduğu, ancak TLR4, 5 ve 9'un *H.pylori* ile infekte bireylerin hem gastrik kanser hücrelerinde hem de metaplastik ve displastik gastrik epitel hücrelerinde aşırı eksprese oldukları gösterilmiştir (Schmausser vd 2005). Kronik inflamasyon, TLR ekspresyonu ve karsinogenez arasındaki olası ilişkiyi gösteren bir başka örnek de kolorektal kanserdir. TLR1-9 olmak üzere 9 farklı TLR'nin normal kolon epitel hücrelerinde eksprese oldukları, ancak TLR4'ün kolitli bireylerin kolorektal kanser hücrelerinde aşırı eksprese oldukları belirlenmiştir (Fukata vd 2007). Over kanseri, servikal kanser, akciğer kanseri ve melanoma gibi farklı kanser türlerinde de benzer

ilişkiyi araştıran çalışmalar bulunmakla birlikte (Mai vd 2013), literatürde ürotelyal karsinomlarla ilgili oldukça sınırlı ve netlik kazanmamış veriler bulunmaktadır.

Yukarıda özetlemeye çalıştığımız veriler eşliğinde, “Doktora tezi” olarak planladığımız bu çalışmadaki hipotezimiz, ürotelyal karsinomlu olguların kanserli olmayan olgulara göre farklı *TLR* ekspresyonlarına sahip oldukları ve bu ekspresyon profillerinin ürotelyal karsinomanın patogenezinde rol oynadığıdır. Bu hipotezimiz çerçevesinde, çalışmamızda ürotelyal karsinomlu olan (yeni tanı alan) ve olmayan olgulardan alınan mesane doku örnekleri ve idrar örnekleri kullanıldı. Bu örneklerden gerçek-zamanlı PCR yöntemi kullanılarak *TLR1-10* olmak üzere 10 farklı *TLR*'lerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon profilleri belirlendi. Aynı zamanda, doku ile idrar örneklerindeki ekspresyon profilleri karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmada tümörün grade ve evresi başta olmak üzere olgulara ait patolojik veriler de değerlendirmeye alındı. Çalışmanın bir diğer bölümünde ise, çalışmaya dahil edilen olgulardan alınan idrar örneklerinde pro-inflamatuar sitokinlerin konsantrasyonları belirlendi ve *TLR*'lerin ekspresyon profilleri ile inflammatuar yanıt arasındaki olası ilişki değerlendirildi.

2.KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Mesanenin Anatomik ve Histolojik Yapısı

Mesane, idrar depolama ve boşaltma görevi yapan, pelvik yerleşimli, içi boş muskuler bir organdır. Boş mesane erişkinlerde simfiz pubisin arkasında, yeni doğan ve çocuklarda deessensus tamamlanmadığı için daha yukarıda yer alır. Mesanenin şekli ve konumu boş veya dolu oluşuna göre değişir. Boş mesane simfiz pubisin arkasında yer alan, tepesi önde ve yukarıda, tabanı arkada ve aşağıda bir üçgen piramit şeklindedir (Şekil 2.1). Mesanenin en üst noktasını oluşturan apeks, simfiz pubisin yukarısında karın ön duvarına doğru uzanır ve embriyolojik dönemdeki urakusun artığı olan fibröz bir bantla (chorda urachii) göbeğe bağlanır. Mesanenin tepesi prostat, tabanı plika rektovezikalis ve yanları vaz deferenslerden oluşan bir üçgen şeklindedir. Erkeklerde rektumla komşudur. Kadınlarda ise mesane tabanı vagina ön duvarı ve uterus ile komşudur (Anafarta vd 2011).

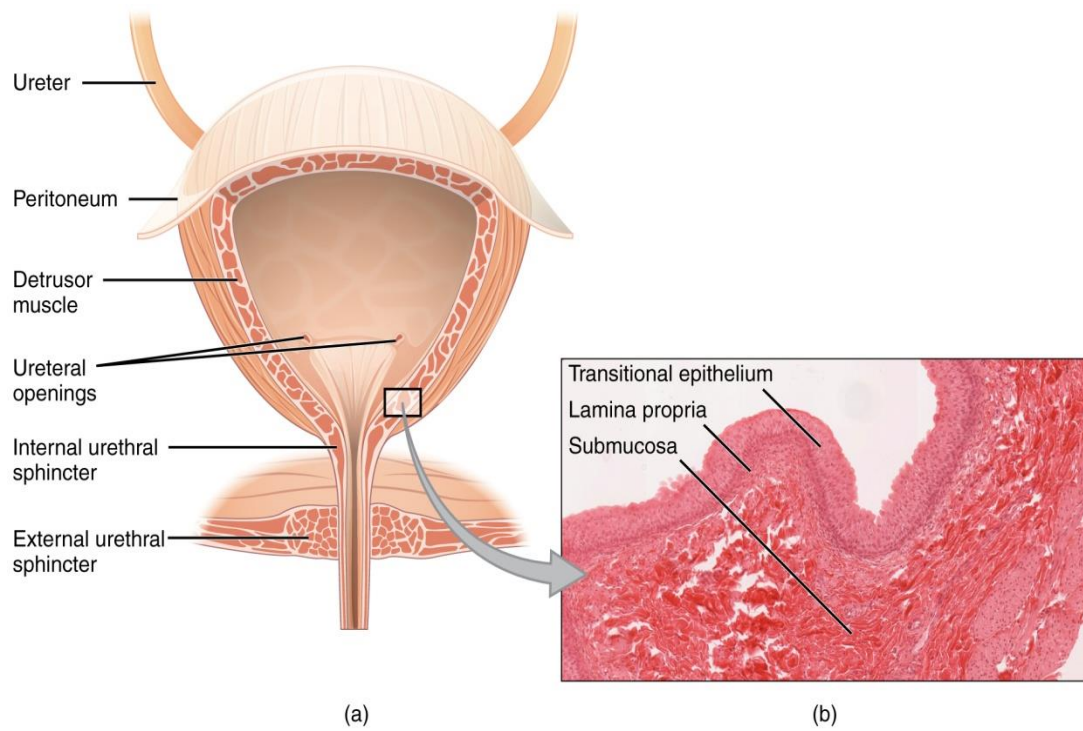
Mesane histolojik olarak mukoza ve submukoza, musküler tabaka ve seroza olmak üzere üç tabakadan oluşur (Şekil 2.1).

Mukoza ve submukoza: Mukoza transizyonel epitel hücreleri ile döşenmiştir. Transizyonel epitel hücreleri mesane boş iken 4-8, dolu iken 2-3 kat hücreden oluşan tabakalar halinde dizilmektedir. Yüzeysel tabakada, tek sıralı eozinofilik sitoplazmalı hegzagonal şemsiye hücreler bulunur. Bu tabaka sülfatlanmış polisakkaritler (glikozaminoglikan) ile kaplıdır. Orta tabaka; alçak kolumnar, küboidal, oval geniş sitoplazmalı lizozim ve sitoplazmik veziküller içeren hücrelerden oluşmaktadır. Bazal tabaka; düzenli bir bazal lamina üzerinde ve ona yapışık olarak bulunan tek sıralı kuboidal hücrelerden oluşmaktadır.

Musküler tabaka: İçte ve dışta longitudinal, ortada sirküler seyirli kas demetleri bulunmaktadır. Mesane boş iken oval ve kuboid yapıda olan hücreler, mesane dolunca basınç etkisiyle yassı epitele dönüşmektedir. Lamina propria zengin bir damar ağı içermektedir. Lenfatik damarlar, elastik liflerden oluşan gevşek bağ dokusu bulunmaktadır. Damar ağına yakın seyreden düzenli veya düzensiz şekilde düz kas demetleri bulunur. Bu kas demetleri muskularis mukoza'yı oluşturmaktadır. Mesane

tümör evrelemesinde bu bölgede görülen tümörler bazen kas invazyonu yapmış izlenimi vererek yanlış evrelemeye neden olabilmektedir.

Seroza: Fibroelastik bir tabaka olup damarlar ve sinirler bulunur. Çok sayıda yağ hücresi mevcuttur (Sarı 2007).



Şekil 2.1 Mesanenin anatomik (a) ve histolojik (b) yapısı (Marieb ve Hoehn 2009)

2.2. Ürotelyal Karsinoma

2.2.1.Epidemiyoloji

2010 yılının verilerine göre kanser, hemen hemen tüm dünya ülkelerinde ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır (Siegel vd 2014). Dünya Sağlık Örgütü 2012 yılı verilerine göre, Dünya genelinde 8.2 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir (<http://www.who.int/cancer/en/index.html>).

Mesanede ortaya çıkan malign tümörlerin yaklaşık %95'i ürotelyumdan gelişen ürotelyal karsinomlardır ve heterojen özellikleri taşımaktadırlar. Ürotelyal karsinomlar dünyada en sık görülen 5. kanser tipi olup, erkeklerde kadınlara oranla 3 kat fazla görülmektedir. Yaşla birlikte görülme sıklığında artış dikkati çekmektedir ve hastaların

%80'i 50-79 yaş arasındadır (Kirkali vd 2005, Peterson vd 2006). Morbidite ve mortalite oranları ise, ülkelere ve etnik gruplara göre farklılık göstermektedir (Murta-Nascimento vd 2007).

Ürotelyal karsinomalarda en yüksek prevalans Kuzey Amerika ve Avrupa Birliği Ülkeleri'ndedir. Gelişmekte olan ülkelere oranla gelişmiş olan ülkelerde ürotelyal karsinoma prevalansı yaklaşık olarak altı kat daha yüksektir. (Eble vd 2004). Bu farklılık büyük olasılıkla gelişmekte olan ülkelerde kanser vakası kayıtlarının düzenli tutulmamış olması ve bu ülkelerde yıllık kanser vakası istatistiklerinin düzenli yapılmamış olmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte ürotelyal karsinomanın risk faktörleri arasında bulunan şistosomiyazisin endemik olduğu Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde de hastalığın insidans hızı yüksektir (Curado vd 2007). Amerikan Kanser Derneği 2014 yılı verilerine göre ürotelyal karsinoma tanısı konulan tahmini vaka sayısı 141.610'dur ve bu hastalıktan ölen vakaların sayısının ise yaklaşık 30.350 olacağı tahmin edilmektedir (Siegel vd 2014).

Türkiye'de 2006-2008 yıllarına ait kanser istatistik verilerine göre, ürotelyal karsinoma erkeklerde en sık görülen 3. kanser türüdür. Bu yıllar arasında ülkemizde önemli bir insidans artışı gözlenmemektedir. Türkiye'de, sekiz ila ait verilere göre en yüksek insidans hızlarının gözlemlendiği iller erkeklerde İzmir (24.8), Eskişehir (24.8) ve Trabzon (24.1) iken, kadınlarda Antalya (3.3), Eskişehir (2.7) ve İzmir'dir (2.5). En düşük hızlara sahip iller ise erkeklerde (15.3) ile Bursa, kadınlarda ise (1.7) ile Samsun'dur. Tablo 2.1 ve 2.2, T.C. Sağlık Bakanlığının 2012 yılı Türkiye Sağlık İstatistikleri Yıllığına'na göre kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen kanser türlerini ve insidanslarını göstermektedir (Web_3).

Tablo 2.1 Ülkemizde yıllara göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı (100.000'de) (Türkiye Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2012)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009*	2010*	2011*
Meme	34,7	35,0	37,6	35,9	40,7	42,1	43,6	45,1
Tiroid	7,3	9,6	10,8	14,4	16,2	19,7	24,0	29,8
Kolorektal	11,3	11,1	12,5	12,3	13,2	13,9	14,6	15,3
Uterus Korpusu	7,6	7,1	8,4	8,7	8,6	9,5	10,4	11,4
Trakea, Akciğer ve Bronş	7,4	7,4	7,7	7,8	8,2	8,7	9,3	9,9
Non-Hodgkin Lenfoma	4,4	4,0	4,9	5,2	5,0	6,0	7,2	8,6
Mide	6,4	6,9	7,6	8,4	7,7	8,0	8,3	8,6
Over	5,8	5,6	5,9	6,5	6,9	7,1	7,3	7,5
Uterus Serviksi	4,5	4,4	4,8	4,3	4,1	4,9	5,9	7,1
Beyin, Diğer Sinir Sistemi	3,6	4,0	4,6	4,6	4,4	4,5	4,6	4,7

*: 2009, 2010 ve 2011 yıllarına ait insidans değerleri tahmini değerlerdir.

Tablo 2.2 Ülkemizde yıllara göre erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün insidansı (100.000'de) (Türkiye Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2012)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009*	2010*	2011*
Trakea, Akciğer ve Bronş	65,1	65,9	68,9	73,0	69,2	74,1	79,3	84,9
Prostat	24,9	28,6	28,9	32,3	37,6	44,0	51,4	60,0
Mesane	19,3	20,6	21,0	22,5	21,7	23,4	25,3	27,3
Kolorektal	16,5	16,2	18,2	19,1	20,8	22,5	24,3	26,3
Mide	14,1	14,9	14,8	17,3	18,0	19,1	20,3	21,6
Non-Hodgkin Lenfoma	6,3	5,9	6,9	7,6	6,9	8,5	10,4	12,7
Larinks	10,0	8,9	9,7	9,3	9,1	9,5	9,9	10,3
Pankreas	4,0	4,4	5,2	6,3	6,1	6,7	7,3	8,0
Böbrek	4,1	4,1	5,5	5,2	5,8	6,3	6,9	7,5
Beyin, Diğer Sinir Sistemi	4,7	5,7	5,4	5,8	6,1	6,2	6,3	6,4

*: 2009, 2010 ve 2011 yıllarına ait insidans değerleri tahmini değerlerdir.

2.2.2. Etiyoloji ve risk faktorleri

Ürotelyal karsinomanın nedeni/leri net olarak bilinmemektedir. Ancak belli risk faktörlerinin bu hastalığın gelişiminden sorumlu oldukları bilinmektedir. Bu nedenle, bu bölümde ürotelyal karsinom gelişiminde rol oynadıkları belirlenen önemli risk faktörlerinden bahsedilecektir.

2.2.2.1. Sigara kullanımı

Sigara kullanımı ve kanser arasındaki ilişkiye dair epidemiyolojik kanıtlar 1920'li yıllarda ortaya çıkmış, 1950 yılında da sigara kullanımı ve akciğer kanseri arasındaki ilişki kanıtlanmıştır. Gelişmiş ülkelerde sigara kullanımı, akciğer kanserinin yanısıra diğer kanser türlerinden ölümlerin yüzde otuzundan sorumludur (Gandini vd 2008).

Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC) verilerine göre sigara kullanımı; akciğer, oral boşluk, naso-,oro-, ve hipofarinks, nazal boşluk ve paranazal sinuslar, larinks, özafagus, mide, pankreas, karaciğer, böbrek, mesane, üretra, uterus, serviks ve kemik iliği kanserleri ile ilişkilendirilmiştir. Sigarada kabul edilen karsinojenik bileşenler arilaminler, 4-aminobifenil, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), N-nitrozo bileşenleri, heterosiklik aminler ve çeşitli epoksidler olarak sıralanabilir. Ürotelyal karsinoma risk faktörleri arasında sigara kullanımı erkeklerde %50-%65 ve kadınlarda %20-%30 oranlarında belirlenmiştir (Boffetta 2008). Bununla birlikte dünyada sigara kullanımı, erkeklerde ürotelyal karsinoma ölümlerinin %34'ünden sorumlu iken kadınlarda bu oran %13'tür (Maxwell 2008). Sigara kullanma alışkanlığı olanların yanısıra pasif sigara içimi de sigara, ürotelyal karsinoma için bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalar, sigara kullanma süresinin ve ortalama günlük kullanılan sigara sayısının kanser riskini belirleyici etmenlerden olduğunu göstermektedir. Sigara kullanımının bırakılmasını takiben 1-4 yıl içerisinde ürotelyal karsinoma riski %40 azalırken, bu oran 25 yılın sonunda %60'a çıkmaktadır (Brennan vd 2000). Tüm bu bulgular ürotelyal karsinomanın karsinogenezinde sigara kullanımının önemli bir rol oynadığını ve güçlü bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bir başka ifade ile sigara ürotelyal karsinoma gelişimi risk faktörleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Sigara dışında risk faktörü olarak alkol kullanımı değerlendirildiğinde, erkeklerde yalnızca ileri evre tümörlerde alkol kullanımı ve ürotelyal karsinoma arasında düşük bir korelasyon gösterilmiştir (Zeegers vd 2004).

2.2.2.2. Mesleksel risk faktörleri

Mesleksel risk faktörleri, ürotelyal karsinoma gelişimi açısından risk faktörleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Kimyasallara maruz kalma ve ürotelyal karsinoma arasındaki ilişkinin varlığı, yirminci yüzyılda boya sanayinde çalışan işçiler arasında gösterilmiştir. Benzen türevleri ve arilaminler (2-naptilamin, 4-ABP, 4,4'-metilenedianilin ve o-toluidin) bu kimyasallara örnek olarak verilebilir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), Grup1, Grup 2A ve Grup 2B olmak üzere üç sınıfa ayırdığı 11 spesifik aromatik amininin kullanıldığı boya, tekstil, deri ve lastik fabrikalarında çalışan meslek gruplarında mesane kanser riskinde artışın olduğunu ve mesane kanserlerinin %20-%25'inin mesleksel risk faktörlerinden kaynaklandığını rapor etmiştir (Tablo 2.3) (Pelucchi vd 2006).

Tablo 2.3 Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından mesane kanseri için karsinojen olarak tanımlanan spesifik aromatik aminler (Delclos ve Lerner 2008)

Grup 1	Grup 2A	Grup 2B
4- aminobifenil	4-Kloro-orto-toluidin	4,4'- Metilin bis (2-metilanilin)
Arsenik		Perkloroetilen
Benzo[a]pirin		Trikloroetilen
Benzidin		Tetrakloroetilen
B- Napitilamin		
N,N-bis (2-kloroetil)-2-napitillamin (kloroanilin)		
4,4'- Metilin bis(2-kloroanilin) (MOCA)		
Orto-toluidin		

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, riskin garson ve barmenlerde 2.87, tıp ve sağlık ile ilişkili mesleklerde 2.17, tarımsal, çiftlik hayvanları ve hayvanlara özgü ürünlerin üretiminde çalışan bireylerde 1.90, elektrik montajı, kurulumu ve onarımında çalışan işçilerde 1.69 ve iletişim ile ilgili işlerde çalışanlarda 1.74 kat arttığı gösterilmiştir (Cassidy vd 2009).

2.2.2.3. Genetik yatkınlık

Ürotelyal karsinomda genetik yatkınlıkla ilgili sınırlı veriler olmakla birlikte, hastaların birinci derece akrabalarında ürotelyal karsinoma gelişme riskinin ailede bu hastalığa yakalanmış kişi bulunmayanlara oranla iki kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Negri vd 2001). Moleküler araştırmacılar, ürotelyal karsinomun yanısıra diğer birçok kanser türünde karsinogeneze bağlı genetik değişikliklerin genetik yatkınlık ile ilişkili olduğunu doğrulamaktadır. Yapılan araştırmalarda, *Glutasyon S- transferaz* (*GSTM1*, *GSTP1* ve *GSTT1*) genlerinin düşük aktiviteli genotiplerinin ürotelyal

karsinomada risk faktörü oluşturdukları belirlenmiştir (Yuan vd 2008). Benzer şekilde *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2A6* ve *CYP2A13* gibi *sitokrom P450* genlerindeki polimorfizmlerin de ürotelyal karsinoma riskini arttırdığı gösterilmiştir (Sankhwar 2014).

Sekizinci kromozomun kısa kolunda lokalize *N-acetyltransferase (NAT)-1* ve (*NAT)-2* genleri, aminlerin inaktivasyonunda görev almaktadırlar. *NAT-2* aktivitesindeki azalma, aromatik aminler gibi çevresel karsinojenlere maruz kalan hastalar arasında ürotelyal karsinoma yatkınlığını ortaya çıkarmaktadır. Birçok çalışmada *NAT-2* gen polimorfizmlerinin (K268R rs1208, G286E rs1799931, R64Q rs1801279, Y94Y rs1041983, I114T rs1801280, L161L rs1799929, R197Q rs1799930) yüksek dereceli ürotelyal karsinoma riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Garcia-Closas vd 2005). DNA hasarını tamir eden önemli tamir mekanizmalarından biri olan Nukleotid Eksizyon Tamir (Nucleotide excision repair, NER) yolağında görev alan birçok gene ait polimorfizmlerin de ürotelyal karsinoma riskini arttırdıkları gösterilmiştir (Garcia-Closas vd 2005).

2.2.2.4. Enfeksiyon

Kronik idrar yolu enfeksiyonları, özellikle invaziv skuamöz hücre karsinomları başta olmak üzere tüm mesane kanserleri için önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır. IARC, özellikle üriner şistozomiyazisin ürotelyal karsinoma riskini beş kat arttırdığını bildirmiştir (Khurana vd 2005). İnsanlarda malaryadan sonra en önemli ikinci yaygın parazitik enfeksiyon olan şistozomiyazın ürotelyal karsinoma patogenezi nasıl katıldığı ile ilgili mekanizma henüz net olarak bilinmemektedir. Ancak bu konu ile ilgili çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Bunlardan ilki, kronik inflamatuvar proliferasyonun, yüksek kanser insidansına neden olan genetik değişimleri uyarmasıdır. Diğer bir yandan, şistozomiyaz ile infekte olan hastaların idrar örneklerinde, nitrozaminler [özellikle *N*-butil-*N* (4-hidroksibutil)] gibi karsinojenik maddelerin varlığı gözlenmiştir. Aynı zamanda bu inflamatuvar reaksiyonla ilişkili olarak, transisyonel ürotelyumun skuamöz epitelyuma dönüştüğü gösterilmiştir. Bu nedenle de şistozomiyaz öyküsüne sahip ürotelyal karsinoma olgularının %70'inde transisyonel hücre karsinomasından çok, skuamöz hücre karsinomanın varlığı gözlenmektedir (Abol-Enein 2008).

Şistozoma enfeksiyonuna bağlı inflamasyon ile skuamöz hücreli ürotelyal karsinoma arasındaki ilişki bilinmesine rağmen, diğer enfeksiyonlara bağlı inflamasyonların ürotelyal karsinomadaki rolleri henüz tam olarak bilinmemektedir.

Yapılan birçok çalışmada, idrar yolu enfeksiyonları ve ürotelyal karsinoma arasındaki pozitif ilişki açıkça gösterilmiştir. Ancak, ileride yapılacak olan prospektif çalışmalar ile inflamasyonun ürotelyal karsinomadaki rolü tam olarak açıklanabilecektir. Üriner sistem enfeksiyonları ve taşları ile kalıcı katater uygulaması da, mesane epitelinde irritasyona neden olarak ürotelyal karsinoma riskini artırabilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde, üriner sistem enfeksiyonu öyküsü olan kişilerde, özellikle üç ve daha fazla enfeksiyon durumunda ürotelyal karsinoma riskinin iki kat arttığı belirlenmiştir. Ayrıca böbrek taşları riski etkilemezken, üriner sistem taşlarının anlamlı olarak riski yükselttiği bildirilmiştir (Arlene vd 1984).

2.2.2.5. Radyasyon

Uzun bir süredir kanser gelişiminde iyonize radyasyonun uzun süreli etkileri araştırılmaktadır. Japonya'da atom bombasının ortaya çıkardığı radyasyondan etkilenen populasyon ile yapılan çalışmalara ait verilerde, radyasyonun ürotelyalkarsinoma riskini arttırdığı gösterilmiştir (Hall 2008). Benzer sonuçlar, yüksek dozda radyoterapi tedavisi alan kanser hastalarında da gösterilmiş ve prostat kanseri tedavisi alan hastalarda, daha sonraki yıllarda ürotelyal karsinoma riskinin arttığı belirlenmiştir (Nieder vd 2008). Radyoterapi tedavisi alan servikal kanserli hastalarda da, radyoterapi almayanlara oranla ikinci kez kansere (kolon, rektum/anüs, mesane, yumurtalık kanserleri gibi) yakalanma riskinin arttığı belirtilmiştir (Chaturvedi vd 2007).

2.2.2.6. Beslenme alışkanlıkları

Beslenme faktörlerinin ürotelyal karsinoma ile ilişkisi araştırılmış, ancak yapılan çalışmalarda yeterli kanıt bulunamamıştır. Günlük alınan su miktarının da ürotelyal karsinoma ile ilişkisi araştırılmıştır. Fazla su tüketiminin, idrardaki karsinojen konsantrasyonunun düşüşüne ve/veya bu karsinojenlerin boşaltma frekansını arttırarak ürotelyum ile olan temasının düşüşüne neden olduğu ve karsinoma riskini azalttığı gösterilmiştir (Villanueva vd 2006). Yapılan bazı araştırmalarda meyve tüketiminin az da olsa riski azalttığı gösterilmiştir (Steinmaus vd 2000). Aynı zamanda sarı-yeşil sebzelerin de ürotelyal karsinoma riskini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, sebze ve meyvelerde bulunan karatoneitler ve C vitamininin antikarsinojenik etkisi ile açıklanabilmektedir (Lokeshwar vd 2011).

2.2.3. TNM Evrelendirmesi

Ürotelyal karsinomanın tedavisini ve prognozunu belirlemek için klinik olarak tümörün lokalizasyonunun, mesane duvarına infiltrasyon olup olmadığının, infiltrasyon varsa derinliğinin, lokal veya uzak metastazlarının olup olmadığının bilinmesi yani tam anlamıyla evrelendirilmesi gereklidir (Çakır 2006).

Mesane tümörleri Tümör-Nodül-Metastaz (TNM) sınıflandırma sistemi kullanılarak evrelendirilmektedir. TNM sınıflandırması ile tümörün invazyonunun gelişimi (T), lokal ya da uzak lenf nodlarına metastatik yayılımı (N), ve uzak metastazın varlığı (M) belirlenmektedir. Klinik derecelendirme cTNM olarak isimlendirilirken, patolojik doğrulamadan sonra pTNM olarak isimlendirilmektedir (Lokeshwar vd 2011). Dünya Sağlık Örgütü tarafından tanımlanan TNM evrelendirmesi, tüm dünyada en yaygın kullanılan sınıflandırmadır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4 Mesane karsinomlarının 2004 yılı TNM evrelendirmesi

Primer tümör (T)

TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait kanıt yok
Ta	İnvazif olmayan papiller karsinom
Tis	Karsinoma <i>in situ</i> .
T1	Lamina propriya invazyonu
T2	Tümör kas dokusunu (muskularis propria) tutmuş
T2a	Muskularis propriyanın ½ üst tabakasına invazyon
T2b	Muskularis propriyanın ½ alt tabakasına invazyon
T3	Kas tabakasını aşan infiltrasyon (Perivezikal doku invazyonu)
T3a	Mikroskopik invazyon
T3b	Makroskopik invazyon
T4	Prostat, uterus, vagina, pelvik duvar ya da abdominal duvara invazyon
T4a	Prostat, uterus, vagina invazyonu
T4b	Pelvik ya da abdominal duvara invazyon

Lenf nodu (N)

NX	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	En büyük çapı 2 cm ya da daha küçük olan bir adet metastatik lenf nodu
N2	Çapı 2-5 cm arası değişen bir veya birden fazla metastatik lenf nodu
N3	En büyük çapı 5 cm'den büyük metastatik lenf nodları

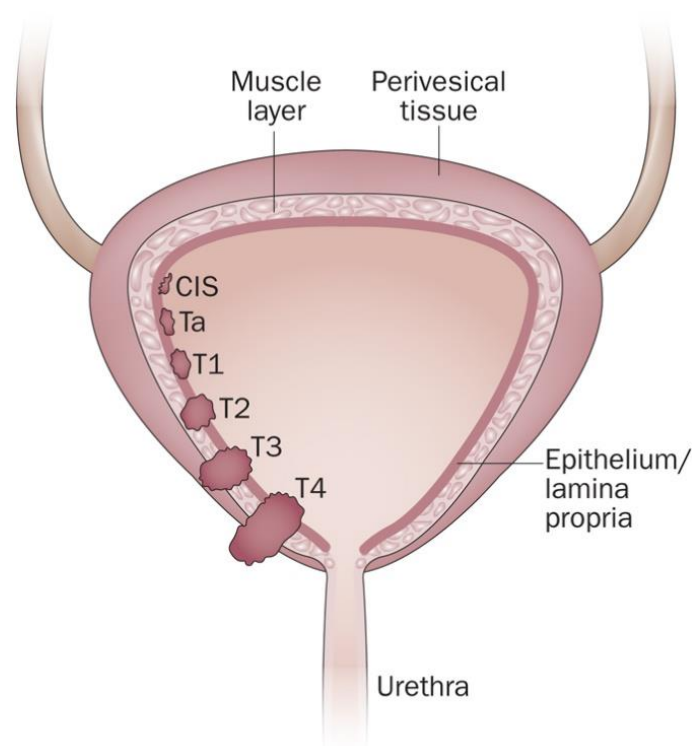
Uzak metastaz (M)

MX	Uzak metastazlar değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz mevcut

2.2.3.1. T kategorisi

Normal mesane epitelyumu, üretelyum adı verilen transisyonel hücre duvarına sahiptir. Üretelyumun hemen altında bazı düz kas fibrillerini içeren subepitelyal bağlayıcı doku (lamina propria) bulunmaktadır. Bu dokuya komşu, prevesikal yağ doku ile çevrili detrusor kası (muscularis propria) yer almaktadır. Mesane üretelyumu ile sınırlı birçok yüzeysel tümör, pTa (non-invaziv) kategorisinde sınıflandırılırken, lamina propria'ya yayılan tümörler ise pT1 (yüzeysel invaziv) olarak sınıflandırılmaktadır. Karsinoma in-situ (CIS) ya da Tis olarak adlandırılan basık yüksek dereceli tümörler ise üretelyum ile sınırlıdır (Lokeshwar vd 2011). Ancak moleküler veriler ve klinik deneyimler, CIS ve T1 lezyonların zaman içinde daha agresif özellik kazanma potansiyeline sahip lezyonlar olduklarını göstermektedir (Çakır 2006).

T1'den daha yüksek evrelere sahip T2-T4 kategorisinde yer alan tümörler, kas-invaziv tümörlerdir. Sırası ile T2, T3 ve T4 evreleri muskularis propria, perivesikal doku ve prostat, uterus, vagina, pelvik duvar ya da abdominal duvar gibi komşu organlara invazyonu içermektedir. Bu kategorideki tümörler tek başına transüretral rezeksiyonla tedavi edilemezler. Mesastazı olmayan bu olgularda birçok batı ülkesinde altın standart tedavi olarak radikal sistektomi yapılmaktadır.



Şekil 2.2 TNM klasifikasyon sistemine göre mesane kansinomlarında T kategorileri (Mertens 2014)

2.2.3.2. N kategorisi

N evresi, lenf nodlarının Bilgisayarlı Tomografi (CT) ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) gibi teknikler kullanılarak ya da radikal sistektomi sırasında pelvik lenf nodu diseksiyonundan elde edilen lenf nodlarının patolojik olarak değerlendirilmesiyle belirlenmektedir. Lenfatik dağılım çoğu zaman hipogastrik, obturator, internal ve eksternal iliak düğümleri takiben, ilk önce anterior ve lateral pelvik nodlarına doğru olmaktadır (Lokeshwar vd 2011).

2.2.3.3. M kategorisi

Ürotelyal karsinomanın metastazı en çok akciğer, karaciğer ve kemikte gözlenmektedir. Toraks filmi ya da CT'si, ultrasonografi, karaciğer filmi ya da CT'si ve iskelet sintigrafisi gibi tekniklerle M evresi belirlenebilmektedir (Lokeshwar vd 2011).

2.2.4. Derecelendirme (grade'leme)

Histolojik olarak, mesane kanserlerinin %90'ı ürotelyal orijinli, % 5'i skuamöz hücre karsinomu, %2'sinden azı ise adenokarsinomlardır. Ürotelyal karsinoma, idrar yolunda görülen en yaygın malignansidir ve ürogenital tümörler arasında ölüme sebep olan ikinci kanserdir (Web_5).

Tümör derecelendirmesi, hastalığın progresyonunu ve rekürrensini belirlemek için günümüzde kullanılan en önemli prognostik indikatördür (Hall vd 2007). Ürotelyal neoplazilerde en sık kullanılan sınıflandırma sistemi Dünya Sağlık Örgütü'nün 1973 yılında yayınlamış olduğu sınıflandırma sistemidir. Ancak, 2004 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslar arası Ürolojik Patologlar Birliği papiller neoplaziler için bu sınıflandırma sistemini revize etmişlerdir ve günümüzde bu derecelendirme sistemi kullanılmaktadır (Tablo 2.5). (Abat 2011).

Tablo 2.5 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1973 ve 2004 yılı derecelendirme (Grade) sistemini karşılaştırılması (Eble vd 2004)

1973 WHO sınıflaması	2004 WHO sınıflaması
Ürotelyal papillom	Ürotelyal papillom
Derece 1: İyi diferansiye	Düşük malignite potansiyeline sahip papiller ürotelyal neoplazi (PUNLMP)
Derece 2: Orta diferansiye	Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom
Derece 3: Kötü diferansiye	Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom

2.2.5. Klinik ve Tanı

Ürotelyal karsinomalarda klinik semptomlar tümörün lokasyonuna ve yayılımına göre değişmektedir. Ürotelyal tümörlü bir çok hasta ilk olarak ağrısız hematuri şikayeti ile hekime başvurmaktadır. Ardından bu belirtiyi ağrılı miksiyon ve pıhtı oluşumu izlemektedir. Mesanenin boyun kısmında lokalize ya da mesanenin büyük bir kısmını kaplayan tümörler, sık ve ağrılı idrara çıkma ve disüri gibi rahatsız edici belirtiler ile kendini gösterebilmektedir. Elli yaşın üzerinde asemptomatik mikroskopik hematürisi olanlarda malignansi insidansı %5 iken; semptomatik mikroskopik hematürisi olanlarda bu insidans %10 civarındadır (Yenice 2008). Nadir olarak, ilerlemiş seviyede olan hastalarda belirgin pelvik kütlesi veya ödem de gözlenmektedir. Aynı zamanda metastaza bağlı olarak hastalarda kilo kaybı ve abdominalde ya da kemiklerde ağrı gerçekleşebilmektedir. Mesane neoplazisi ultrasonografi ya da bilgisayarlı tomografide belirlenebildiği gibi sitotokopi ile de doğrulanmaktadır. Patolojik olarak güvenli tanının konması için ise mesane duvarının musküler tabakasından tümörün resekte edilmesi gerekmektedir.

Ürotelyal karsinoma hastaların büyük bir çoğunluğunda hematurinin aralıklarla ya da sürekli olarak görünür ya da mikroskopik olarak kendini gösterdiğinden bahsetmiştik. Mesane kanserli hastaların özellikle kas-invaziv olmayanlarında fiziksel muayenenin önemi bulunmamaktadır. Transürotelyal rezeksiyon (TUR) sırasında bimanuel muayene özellikle kas-invaziv hastalarda klinik derecelendirmede yardımcı olabilmektedir. Üriner sitoloji, ürotelyal tümör taşıma riski olan hastalarda ve ayrıca transisyonel hücre karsinoma öyküsü bilinen hastalarda rekürrensi, progresyonu ve

yanıtı görüntüleme de kullanılabilmektedir. Üriner sitolojinin, duyarlılığı ve pozitif tahmin değeri, yüksek gradedeki üretyal tümörlerin tanımlanmasında çok daha yüksektir.

Sistoskopi ile bağlantılı olarak radyolojik görüntüleme sıklıkla önerilmektedir. Buna ek olarak, mesane kanser öyküsü bilinen hastalarda, mesane kanser vakalarının ancak %5'inde gözlenen üst kanal tümörlerinin varlığının belirlenmesi için de görüntüleme önerilmektedir. İntravenöz ürogram, retrograde filografi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans en yaygın görüntüleme teknikleri arasında yer almaktadır (Hall vd 2007).

2.2.5.1. İdrar indikatörleri

Ürotelyal karsinoma, rekürrensi yüksek olan kanser türlerinden biri olduğu için, idrar sitolojisi hastaların tarama ve takibinde önem taşımaktadır. Yüksek grade'li malignite veya CIS varlığında idrarda veya mesane yıkantı suyunda dökülmüş kanser hücrelerinin değerlendirilmesi uygun görülmektedir (Yenice 2008). Son yıllarda invaze olmayan ürotelyal kanserlerin tanısında, sistoskopi, sitoloji ve biyopsi tekniklerinin yanı sıra idrar tabanlı indikatörler kullanılmaya başlanmıştır. Bunlara örnek olarak, mesane tümör antijeni STAT (Bard Diagnostics, Redmond, WA, USA), BTA TRAK test (Poly Med Co, Cortlandt Manor, NY, USA), Nükleer Matriks Protein (NMP) 22 ve Mesane Kontrol Testi (Matritech, Newton, MA, USA) gibi FDA-onaylı testler verilebilir. Son yıllarda, idrarda tümör belirteçlerinin değerlendirilmesi ile ilgili birçok farklı tekniklerin kullanıldığı yeni yöntemler de kullanılmaktadır ki, bunların içinde en yaygın olanı FDA-onaylı fluoresan *in situ* hibridizasyon (FISH) (Urovysion Systems Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) yöntemidir (Hall vd 2007).

2.2.5.2. Diagnostik transüretal rezeksiyonu

Ürotelyal karsinomanın tanısı sistoskopi, biyopsi ve çıkarılan materyalin patolojik değerlendirilmesi ile konulmaktadır. Bir hasta ürotelyal karsinoma açısından değerlendirilirken, öncelikle sistoskopi yapılabilir. Eğer yapılan tetkiklerde ürotelyal karsinoma saptanmış ise (görüntüleme yöntemleri veya üriner sitoloji pozitif); tanısız sistoskopi yerine hasta anestezi altında sistoskopi, biyopsi veya tümör rezeksiyonu için hazırlanır. Mesanede ele gelen bir kitle olup olmadığını anlamak ve eğer tümör varsa, pelvik duvara fikse olup olmadığını değerlendirmek için anestezi altındaki hastaya bimanuel muayene yapılmalıdır (Yenice 2008).

Mesane tümörünün sistoskop kullanılarak çıkarılması işlemi “Transüretral Rezeksiyon” (TUR) olarak isimlendirilmektedir. TUR, tümörün evre ve derecesinin belirlenmesine ek olarak histopatolojik bilgi de sağlamaktadır. Hastalığın tipini ve yayılımını tespit etmenin yanı sıra tüm makroskopik yüzeysel ve mümkünse invaziv tümörleri ortadan kaldırmayı amaçlar. Tekrarlanan rezeksiyon yüzeysel tümörlerin kontrolünü daha iyi sağlayabilir ve evrelendirme ile derecelendirilmesini kolaylaştırabilir. Aynı zamanda, tekrarlanan TUR, ilk rezeksiyonun sonucuna dayanılarak önerilen tedavinin değişmesine neden olabilir (Hall vd 2007).

2.2.6. Prognoz

Mesane karsinomlarında prognoz farklı parametrelerle ilişkilidir. Evre, en önemli prognostik göstergedir ve lenf nodu tutulumu kötü prognozun işaretidir. Birden fazla lenf nodu tutulumu olan hastalarda, uzun süreli sağ kalım oranı 0'a yakındır. Evreden bağımsız olarak mikroskopik grade'leme de önemli bir parametredir ve tümör grade'i kas-invaziv karsinoma ilerlemede en önemli prognostik göstergedir. Tümör lokalizasyonu açısından değerlendirme yapılacak olursa, mesane boynundaki tümörler daha kötü prognoz ile ilişkilidir. Mesane kubbesindeki tümörler yüksek grade'li olma eğiliminde iken, lateral duvar ve üreterik orifis tümörlerinin düşük grade'li olma eğilimleri vardır. Tümör lokalizasyonunun yanı sıra mesane mukozasındaki anormallikler de prognozu etkileyen faktörler arasındadır. Özellikle, ana tümör kitlesinden uzakta lokalize olan küçük tümör odakları veya displastik değişiklikler yüksek rekürens oranı ile ilişkilidir. Tümör büyüklüğü de bir başka önemli parametredir ve tümör invazivliği ile ilişkilidir (Erol 2006). Özellikle evre II tümörlerde, tümör boyutu metastaz riski ve derin kas invazyonu açısından daha iyi bir göstergedir (Rosai ve Ackerman 2004). Yapılan bir çalışmada, tümör boyutu 5 cm baz alınarak gruplandırma yapılmış ve bu gruplarda muskularis propria invazyonuna bakıldığında 5 cm'den büyük olan tümörlerde invazyon oranı 4 kat fazla bulunmuştur (Lopez-Beltran vd 2004).

Yüksek grade karsinom veya *in situ* karsinomlarda anaploidili hücre popülasyonlarının varlığı söz konusudur ve bu durum kötü prognozla ilişkilidir. Diploid tümörler genellikle düşük grade ve düşük evre olma eğilimindedir ve daha iyi prognoza sahiptirler. Birçok çalışmada, DNA ploidi durumu ile mikroskopik grade ve klinik gidiş arasında yüksek korelasyon gözlenmiştir. Aynı zamanda kromozomal aberasyonlar açısından değerlendirildiğinde, Y kromozomu kaybı ile 1. ve 17.kromozom polizomileri yüksek progresyon ile koreledir (Rosai ve Ackerman 2004).

Mesane karsinomlarında hücre proliferasyon belirteçleri tümör grade'i ile korele olup evre ile korele değildir. Birçok kanser türünde olduğu gibi, *Retinoblastoma* geninde mutasyonların belirlendiği mesane tümörlerinin, mutasyona sahip olmayan tümörlere oranla daha agresif oldukları gözlenmiştir. Benzer şekilde mesane karsinomlarında da hücre bölünmesinin önemli bir düzenleyici faktörü olarak rol yapan p53 geninde mutasyonlar sıklıkla gözlenmektedir. Mutant p53 ekspresyonunun ürotelyal karsinomda erken invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda, T1 ve T2a mesane karsinomlarında p53 overekspresyonu ile progresyon arasında yüksek korelasyon bulunmuştur (Moch vd 1994).

Prognozda etkili bir diğer faktör hastanın yaşıdır. Yaşamın ilk 20 yılında görülen tümörler genellikle iyi differansiye, invazyon yapmayan ve çok iyi prognoza sahip tümörlerdir. Bir çalışmada 40 yaşın altındaki hastalarda patolojik agresifliğin düşük olduğu saptanmıştır (Erol 2006).

2.2.7.Tedavi

2.2.7.1. Kasainvaze olmayan ürotelyal karsinomada tedavi

Kasa invaze olmayan ürotelyal karsinomada tedavinin amacı rekürrensi ve progresyonu önlemektir ki, böylelikle kansere bağlı mortalitenin azaltılması hedeflenmektedir. Rekürrens riskini azaltmak için TUR sonrası intravezikal kemoterapi uygulanmaktadır. Tekrarlayan düşük dereceli Ta tümörü ve yüksek dereceli Ta ve T1 lezyonları olan hastalarda TUR sonrası adjuvan intravezikal kemoterapi ve CIS olan hastalarda da rezeksiyon sonrası Bacillus Calmette-Guerin (BCG) ile intravezikal kemoterapi önerilmektedir (Abat 2011).

2.2.7.1.1.Transüretal rezeksiyon (TUR)

Ürotelyal karsinomanın başlangıç değerlendirmesi, doğru bir evrelendirmeyi sağlayacak tümör alanlarının rezeksiyonu ile başlar (Söylemez ve Dinçel 2013). TUR'un özellikle düşük evre ve grade'deki tümörlerde tedavi edici etkinliği yüksektir. Özellikle T1 tümörlerde tümörün ilerleme gösterme eğilimi yüksektir ve mümkün olan durumlarda, TUR ile tümörün tamamı çıkarılmalıdır. Bazal membranı aşan invazyon olasılığı açısından kas tabakası mutlaka alınmalıdır. CIS varlığından şüphe ediliyorsa

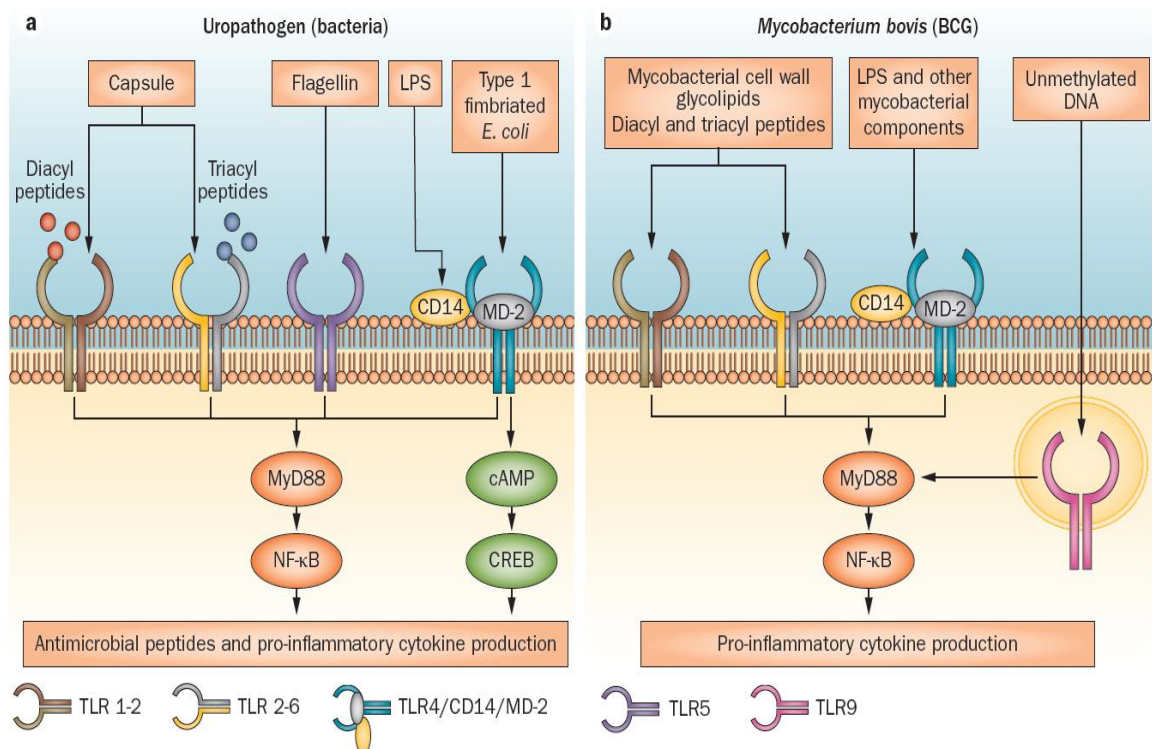
biyopsi alınmalıdır. Orifis çevresini tutan tümörlerde üretral kateterizasyon eşliğinde TUR yapılmalıdır (Yenice 2008).

2.2.7.1.2. İntravezikal tedaviler

Kasa invaze olmayan mesane kanserli hastalarda rekürrens ve progresyonu önlemek ve sistemik tedavilerin morbiditesinden kaçınmak için, mesane içine uretral katater yardımıyla immünoterapötik veya kemoterapötik ajanlar verilebilir. En sık kullanılan ajanlar arasında mitomisin-C, epirubisin ve BCG aşısı gelmektedir. İntravezikal tedaviler rekürrens ve progresyonu önlemede etkin oldukları kadar rezeksiyonu imkansız olan yaygın yüzeysel tümörlerin tedavisinde de başarılı sonuçlar vermektedirler. Ancak, bu tedavilerde en büyük sorun ilaçların dozu, süresi ve tedaviler arası sürenin standardize olmamasıdır ve henüz uluslararası tanımlanmış bir öneri tedavi protokolü bulunmamaktadır. Bu tür tedavilerin lokal toksisitesi olarak sayılan yan etkilerinin başında irritatif işeme semptomları gelmektedir ve sistemik toksisite nadiren gözlenen bir durumdur (Söylemez ve Dinçel 2013).

Mitomisin-C (MMC) DNA sentezini inhibe eden bir anti-kanserojen ve alkilleyici bir ajandır. Transüretral mesane tümörü rezeksiyonun (TURBT)'dan sonra tek doz kullanımının yanında haftalık çoklu kullanımı veya uzun süreli idame kullanımı da söz konusudur. İnterkalasyon ajanlarından biri olan Epirubisin'in rekürrensi önleme oranları daha düşük, hastalığa bağlı ölüm oranları ise daha yüksek bulunmuştur. Bir başka interkalasyon ajani olan Valrubisin, BCG'ye dirençli Tis lezyonu olan hastalarda veya acil sistektomiye reddeden/ya da sistektomiye uygun olmayan hastalarda intravezikal kullanımı için FDA onayı alan bir antrasiklin türevidir. Etki mekanizması Topoizomeraz-2 enzimini inhibe etmek ve böylelikle hücre döngüsünün durmasına neden olmaktadır (Söylemez ve Dinçel 2013). İntravezikal uygulanan kemoterapotik ajanlardan biri olan BCG (*Mycobacteriumbovis*'in *attenuae* suşu), anti-tümör etkisini karmaşık immün tepkiyle oluşturur ve bu etkiyi gösterebilmesi için immün sistemin sağlam olması gerekir. Mesane kanserlerinde BCG tedavisi ile progresyon riskinin %26 oranında azaldığı gösterilmiştir. BCG'ye özgü en sık görülen yan etkiler; abakteriyelsistit ve dizüri (%80), hematüri (%40) ve subfebril ateştir (%30) (Brausi vd 2014). Hastaların çok düşük bir grubunda (<%5) ciddi yan etkiler görülmektedir ve asetaminofen, non-steroidal anti- enflamatuarlar ve spazmolitikler yan etkiden kaynaklanan semptomları gidermede genellikle yeterlidirler. Toll-benzeri reseptörler açısından BCG'nin etkinliğini değerlendirmek gerekirse, bakterilerin neden olduğu uriner sistem infeksiyonlarına

yanıtta özellikle bakteriyel ligandlar olan lipopolisakkarit (LPS), fimbria, flagella gibi yapıların tanınmasında rol oynayan TLR'ler (TLR2, TLR4 ve TLR5) MYD88-bağımlı veya MYD88-bağımsız yolla pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olurlar. BCG'ye yanıtta ise TLR2, TLR4 ve TLR9 birlikte görev yaparlar. Mikobakteriyel lipoproteinler ve glikolipidler TLR2'nin ligandlarıdır. Ürotelyal hücrelerde LPS ve diğer mikobakteriyel komponentler TLR4'un ligandları iken unmetile mikobakteriyel DNA TLR9'un ligandıdır. Tüm bu ligandlara yanıtta söz konusu TLR'ler, MYD88-bağımlı yolla pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olarak tümör mikroçevresindeki immun yanıtı güçlendirmektedir (LaRue vd 2013) (Şekil 2.3)



Şekil 2.3 İnsan mesane dokusunda üropatojenlere (a) ve BCG'ye (b) karşı TLR yanıtının şematize gösterimi.

2.2.7.2. Kasa invazive mesane tümörlerinde tedavi

Kasa invazive tümörlerin tedavisinde altın standart yöntem radikal sistektomidir. Performans durumu ve yaş da tedavi seçimini etkilemekte ve sistektomi; eşlik eden hastalığı olmayan daha genç hastalarda tercih edilmektedir (Yenice 2008). Ancak bu tedavi ile hastaların yaklaşık olarak %50'sinde 5 yıllık sağ kalım sağlanabilmektedir. Bu nedenle alternatif tedavi olanakları değerlendirilmeye başlanmıştır. Bu bağlamda kas invazyonu olan mesane kanserli hastalarda mikrometastazları yok etmek, tümörün

evresini düşürmek ve sağ kalım süresini uzatmak amacıyla neoadjuvan sistemik kemoterapi araştırılmaktadır. Bazı hastalar için, gereksiz ve aşırı bir tedavi yöntemi olmasının yanı sıra sistektomi zamanını geciktirmesi, neoadjuvan kemoterapinin önemli dezavantajlarından biridir. Benzer şekilde, MVAC (metotreksat, vinblastin, adriamisin ve sisplatin) kemoterapisinin ciddi granülositopeni, bulantı, kusma, stomatit, diyare veya konstipasyon gibi önemli yan etkileri saptanmış ve toksik etkilerine bağlı mortalite oranı % 3-4 olarak bildirilmiştir. Sisplatin içerikli neoadjuvan kemoterapi ile 5 yıllık sağ kalım süresini % 5-7 oranında arttırılabilmektedir. Ancak performansı kötü ve renal yetmezliği olan hastalarda bu kombine tedavinin kullanımı önerilmemektedir (Abat 2011).

2.2.7.2.1.Radikal sistektomi

Sistektomi için birincil endikasyon, kasa invazive ürotelyal karsinoma (T2-T4a, N0-NX,M0)'dir. Diğer endikasyonlar; yüksek dereceli yüzeysel tümörler (T1 ve BCG-dirençli CIS) ve konservatif yöntemlerle kontrol edilemeyen geniş papiller tümörlerdir. Cerrahi-dışı tedavi yöntemlerine cevap vermeyenlerde, mesane koruyucu tedavi sonrasında relaps olanlarda ve değişici epitelyum hücreli kanser dışı tümörlerde kurtarma sistektomisi endikedir. Eşlik eden ciddi hastalıkları olanlarda ve cerrahi riski kabul etmeyenlerde sistektomi kontrendikedir (Yenice 2008).

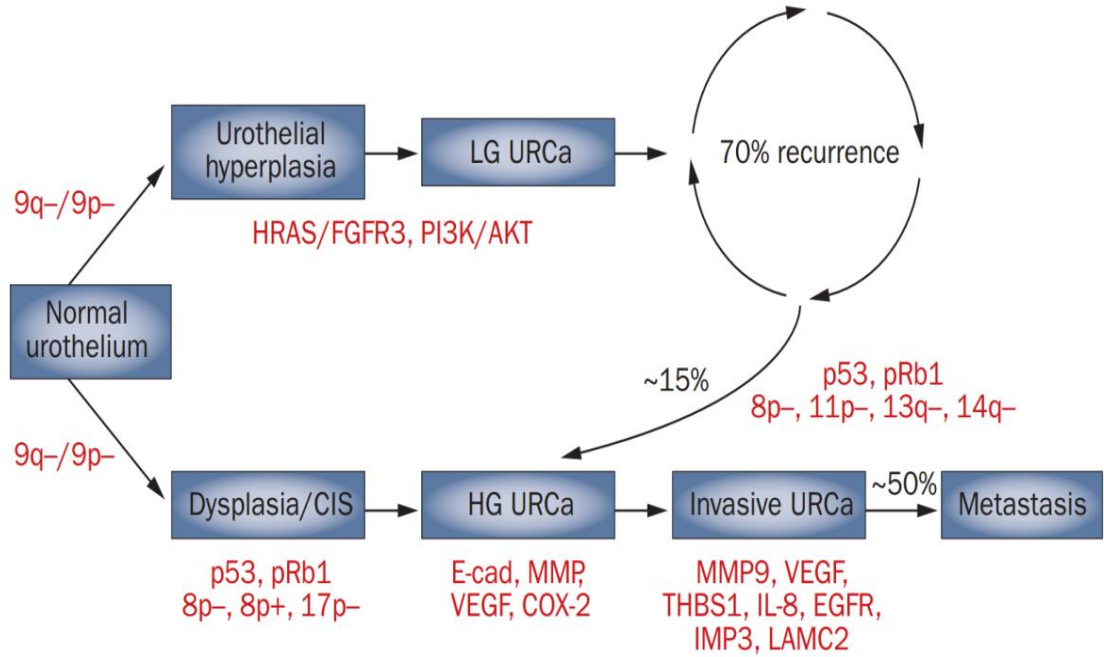
2.2.8. Ürotelyal karsinomanın gelişiminde ve progresyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalar

Ürotelyal karsinoma gelişiminin altında yatan moleküler değişimler, uzun bir süredir birçok çalışmanın ana hedeflerinden biri olmaya devam etmektedir. *S. haematobium* parazitinin endemik olduğu bölgelerde skuamöz tümörler (parazitin bu tümör tipi için predominant etki göstermesi nedeniyle) araştırılırken, bu bölge dışındaki dünya genelinde çalışmalar ürotelyal karsinoma odaklanmıştır (Lokeshwar vd 2011). Ürotelyal karsinomlu hastaların yaklaşık %80'ini uniform çekirdekli hücreleri ve minimal hücre polaritesiyle, morfolojik olarak iyi tanımlanan düşük dereceli tümör tipi oluşturmaktadır. Düşük dereceli tümörler, endoskopik rezeksiyon ile tedavi edilir ve hastaların yaklaşık olarak %70'inde beş yıl içerisinde bir ya da daha fazla rekürrens gözlenirken %15'inde invazyon gerçekleşerek tümör progresyonu meydana gelmektedir (Hussain ve Akhtar 2013). İkinci fenotipi oluşturan yüksek dereceli tümörler ise lamina propria ve buranın ardına hücum eden yüksek proliferatif yeteneğe sahip neoplastik hücrelerden oluşmaktadır. Gelişimin üçüncü fenotipi ise CIS olarak isimlendirilmektedir. Bunlar hiperproliferatif, horizontal olarak yayılan invaziv mesane

kanser hücreleridir (Lokeshwar vd 2011). Yüksek dereceli kasa invaze karsinomaların çoğu yüksek dereceli displazi/karsinoma *in situ* ile intramukozal lezyonlarda oluşmaya başlamaktadır (Tis evresi). Bir süre sonra bu lezyonların çoğu invaziv olur ve klinik olarak yüksek dereceli kasa invaze karsinoma olarak isimlendirilirler (2-4 evresi). Yüksek dereceli kas invaze karsinoma hastalarının yaklaşık %50'sinde metastaz gelişmekte ve tanıdan sonra iki yıl içerisinde hastalığa yenik düşmektedirler (Hussain ve Akhtar 2013). Bu tümör gruplarındaki farklı davranışlar bu tümörlerin moleküler profillerinin farklılıklarını yansıtmaktadır.

Genel anlamda, özel bir hücre klonu içinde, hücre bölünmesi ve genomik bütünlüğün korunmasından sorumlu regülatör mekanizmalardan kaçışa neden olan mutasyonların varlığı karsinogenezin konvansiyonal modelini oluşturmaktadır. Ürotelyumda normal bir hücrede tümör baskılayıcı genlerden herhangi birinde gerçekleşen mutasyon gibi anormal bir moleküler değişim, mesane karsinogenezini başlatabilmektedir. Preneoplastik ürotelyal plak (PUP) oluşumu sonrasında hücrelerin proliferasyonu gittikçe artmakta ve ürotelyumdaki normal komşu hücrelere yavaşça yayılımı gerçekleşmektedir. Birçok ürotelyal karsinoma hastasında PUP formasyonuna sebep olan genetik değişimler arasında 9. kromozomda heterozigosite kaybı (LOH) gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda kritik bölgenin proksimal 9q ve sentromerik 9p bölgelerini içeren geniş bir alanı kapsadığını göstermektedir. Detaylı haritalama çalışmaları sonucunda 9p12 ve 9q34.1 bölgeleri arasında *TSC1* (tuberöz skleroz-1), *DBC1* (deleted in bladder cancer gene 1), *PTCH1* (patched homolog 1), *MSSE* (multiple kendi kendini onaran skuamoz epiteloma) ve *CDKN1B* (encoding P27, siklin bağımlı kinaz inhibitör (CDKI) protein) gibi çeşitli potansiyel tümör baskılayıcı genlerin varlığı gösterilmiştir (Eble vd 2004). Ürotelyal karsinomanın gelişiminde 9. kromozomdaki LOH'un yanısıra yüksek dereceli tümörle karakterize olan p53 mutasyonları da önemli moleküler değişimlerden biridir. Araştırmalar 9. kromozomdaki LOH'un düşük dereceli tümörlerde CIS ve displaziye göre % 34 oranında daha yüksek frekansta gözlendiğini, Ta tümörlerde ancak % 3 oranında mutant p53 gözlenirken CIS ve displazi lezyonlarında bu oranın % 65 olduğunu göstermektedir (Spruck vd 1994, Lokeshwar vd 2011). Grade ve evresine bakmaksızın mesane tümörlerinin %50'den fazlasında 9. kromozomda LOH gözlenmektedir. Bu durum 9. kromozomdaki LOH'un, düşük dereceli ve yüksek dereceli tümörlerde gelişen moleküler değişimlerden çok daha erken bir dönemde gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 2.4). Kromozom 9'da gözlenen bu en erken genetik değişimle birlikte ürotelyal karsinomda birçok farklı sayısal ve yapısal kromozom anomalileri de tanımlanmıştır. Bunlar arasında 3q, 7p ve

17q kazanımları ve 9p21 delesyonları, özellikle tanı ve prognoz açısından potansiyel öneme sahip kromozomal değişimlerdir (Netto 2013).



Şekil 2.4 Kasa invaze olan ve olmayan mesane kanserlerinde farklı moleküler yollar (Netto 2013)

(Kısaltmalar: AKT- v-akt murine thymoma viral onkogeni, CIS- Karsinoma in situ, COX- Siklooksijenaz 2, E-cad- Kaderin 1 (E-kaderin, EGFR-Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü, FGFR3, Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3, HG URCa- invaziv olmayan yüksek-dereceli ürotelyal karsinoma, HRAS, v-Ha-ras Harvey rat sarkoma viral onkogeni, LAMC2- Laminin alt ünitesi gama 2, LG URCa- invaziv olmayan düşük dereceli ürotelyal karsinoma, MMP- matriks metalloproteaz, PI3K- Fosfoinositid-3-kinaz, pRb1- Retinoblastoma-benzeri protein 1, THBS1- Trombospondin 1, URCa- Ürotelyal karsinoma, VEGF- Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, kasa invaze olmayan ve kasa invaze olan mesane kanserlerinin karsinogenez sürecindeki iki farklı moleküler yolak bulunduğunu göstermektedir. Genetik değişimlerin hastalığın progresyonunda anahtar roller oynadıklarından yola çıkarak, hem morfolojik hem de klinik açıdan bu iki farklı karaktere sahip tümörlerde de farklı genetik değişimlerin rol oynadıkları beklenmektedir. Kasa invaze olmayan düşük dereceli ürotelyal karsinomadaki önemli değişimler FGFR3, HRAS ve MTOR yollarına ait genlerdir. Bunun aksine, kasa invaze olmayan yüksek dereceli ve kasa invaze ürotelyal karsinomada tümör mikroçevresindeki değişimler kadar TP53, RBL1 gibi tümör baskılayıcı genlerde meydana gelişimler rol oynamaktadır. Moleküler alanlarda teknolojinin ilerlemesi ile birlikte, ürotelyal karsinomanın moleküler mekanizmalarını aydınlatmak amacı ile, Kanser Genom Atlası Araştırma Ağı 2014 yılında 19 farklı merkezden elde ettikleri kasa invaze yüksek dereceli 131 ürotelyal karsinoma tümör doku örnekleri, 118 periferik kan örnekleri ve tümöre komşu 23 normal mesane doku örnekleri ile detaylı bir

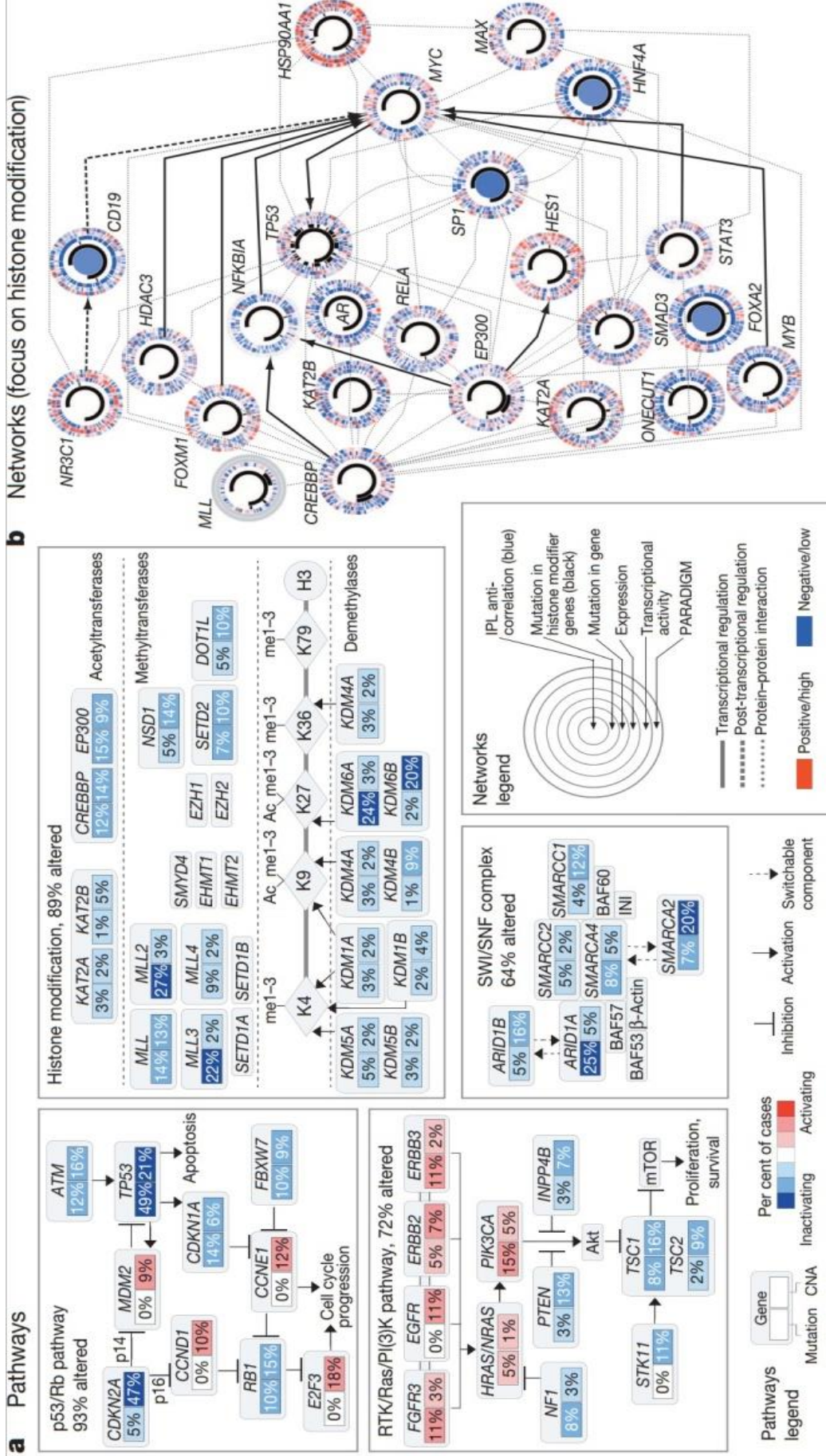
araştırmayı tamamlamıştır. Bu araştırmada DNA kopya sayısı, somatik mutasyonlar, RNA ve miRNA ekspresyonları, DNA metilasyonu, viral integrasyon, yolak analizleri gibi oldukça detaylı veriler analiz edilmiştir. Hücre döngüsü regülasyonu, kromatin regülasyonu ve kinaz sinyal iletim yollarında rol oynayan toplam 32 gendeki mutasyonun anlamlı derecede bu karsinoma ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, yolak analizleri sonucunda tümörlerin %42'sinin fosfatidilinositol 3 kinaz/AKT/mTOR yolağını ve %45'inin de RTK/MAPK yolağını kullandıkları belirlenmiştir. Bu çalışmanın en ilginç sonucu, günümüze kadar çalışılan kanser türleri arasında, ürotelyal karsinomada kromatin düzenleyici genlerde yüksek sıklıkta mutasyonların gözlenmesidir (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014) (Şekil 2.5).

Bu genel veriler eşliğinde, aşağıdaki bölümde kasa invaze olmayan ve kasa invaze olan ürotelyal karsinomadaki moleküler değişimlerle ilgili detaylı açıklamalar yapılacaktır.

2.2.8.1. Kasa invaze olmayan ürotelyal karsinomadaki moleküler değişimler

Ürotelyumda gözlenen karsinomaların yaklaşık olarak %80'i invaziv olmayan düşük dereceli karsinomalardır. Düşük dereceli karsinoma epitelyumu, artmış kalınlığı (>7 hücre katmanı), çeşitli çekirdek pleomorfikliği ve papiller büyüme paterni dışında normal ürotelyum ile benzerlik göstermektedir. Düşük dereceli karsinomalar transkripsiyon için hücre yüzey reseptörlerinde çekirdeğe iletilen aşırı ve anormal transdüksiyon sinyalleri sonucu oluşmaktadırlar. Gen mutasyonlarına bağlı gelişen transdüksiyon yollarındaki anormallikler hücresel proliferasyonu arttırarak hücresel hemeostasinin deregülasyonuna neden olmaktadır (Hussain ve Akhtar 2013).

Düşük dereceli papiller karsinomada Ras-MAPK sinyal kaskadı önemli bir sinyal transdüksiyon yolağıdır. FGFR3 genindeki mutasyon, büyüme faktörü ligandı bağlanmaksızın anormal reseptör dimerizasyonuna ve aktivasyonuna sebep olarak Ras- MAPK transdüksiyon yolağını aktifleştirmektedir. Yaklaşık olarak düşük dereceli karsinomaların %70'inde FGFR3 mutasyonu gözlenmektedir (Hussain ve Akhtar 2013). İnvaziv gelişen mesane kanserlerinin ise %3-5'inde EGFR amplifikasyonu gözlenirken, %30-50'sinde EGFR overekspresyonu belirlenmiştir (Eble vd 2004).



Şekil 2.5 Ürotelyal karinomda moleküler değişimlerin gözlendiği yollar ve ağlar. (a) p53/Rb yolağı, RTK/RAS/PI3K yolağı, Histon modifikasyon sistemi ve SWI/SNF kompleksi componentlerinde gözlenen somatic mutasyonlar ve kopya sayısı değişimleri (Kırmızı: Aktive olan genetik değişimler, Mavi: İnaktive olan genetik değişimler) (b) Mutant histon-modifiye eden genlerin farklı aktivite transkripsiyonal faktörlerle olan ilişkilerini gösteren ağ. “Paradigm” halkalar, biyoinformatik analiz sonrası gen aktivite düzeylerini göstermektedir (kırmızı: yüksek aktivite).

Ras gen ailesi üyelerinden yalnızca H-ras geni ürotelyal karsinomanda önemli role sahiptir. H-Ras mutasyonları 12,13 ve 61. kodonlardaki spesifik değişimler ile sınırlıdır (Eble vd 2004). Düşük dereceli karsinomaların yaklaşık olarak %10'unda H-Ras mutasyonları gözlenmektedir (Hussain ve Akhtar 2013).

Düşük grade Ta papiller ürotelyal karsinomalar genetik olarak stabildirler ve kompleks kromozomal yeniden düzenlenmelerden ziyade sıklıkla nokta mutasyonları ya da kromozom kollarının kaybı ile değişim göstermektedirler. Son yapılan çalışmalarda önemli değişimlerin ve mikroRNA (miRNA) ekspresyonlarının varlığı belirlenmiştir. Sıklıkla karşılaşılan değişimler, kromozom 9'un delesyonu (>%50), FGF reseptör 3 (FGFR3) mutasyonları ve fosfotidilinositol-3- kinaz (PI3K) (PIK3CA)'ın katalitik alt ünite p110 α mutasyonlarıdır. Bu tümörler sıklıkla diploide yakındır. Ta tümörleri de içeren ancak genellikle yüksek grade ve stagedeki tümörleri kapsayan ürotelyal karsinomaların yaklaşık olarak %40'ında, 11p'de heterozigote kaybı gözlenmektedir. 1q, 17 ve 20q kazanımı, 11q'nun amplifikasyonu ve 10q'nun kaybı sıklıkla olmasa da ürotelyal karsinomalarda gözlenmektedir. 11q'nun amplifikasyonu, G1 den S fazına kadar hücre döngüsü progresyonunda görev alan siklin D1 genini (CCND1) de içermektedir (Knowles vd 2011). Düşük grade ve stagedeki ürotelyal karsinoma hastalarının idrar örneklerinden alınan DNA'da APC, CDKN2A (p14ARF) ve RASSF1A genlerinde promotör hipermetilasyonu gösterilmektedir. Bu duruma yüksek grade ve stagedeki tümörlerde daha sık karşılaşılmaktadır. Ta/T1 tümörlerindeki bazı hipermetilasyonlar, progresyon riskinin artmasıyla ilişkilendirilmektedir. DNA kopya sayısındaki lokal gen ekspresyonu ile ilgili bir çalışmada kopya sayısından bağımsız olarak genomik bölgelerde değişen ekspresyonların downregülasyona neden olduğu gösterilmiştir. Ürotelyal karsinomada promotör metilasyonu gösteren, bilinen genlerin bu bölgede yer almaması farklı mekanizmaların genlerin susturulmasında rol oynadığını göstermektedir. Düşük grade Ta tümörleri genetik olarak stabildirler. Bu durum, aynı hastadan alınan sekronöz ve metakronöz tümörlerin zaman içinde klonal yayılım göstermelerine rağmen büyük genetik benzerlik gösterdiklerini açıklamaktadır. Kromozom 9'daki heterozigote kaybı ve FGFR3 genindeki mutasyonlar farklı olaylar olup bu olayların erken genetik değişimleri gösterdiğine inanılmaktadır. Tümör prekrosör belirteci olan yassı ürotelyal hiperplazide, sıklıkla FGFR3 mutasyonundan ziyade kromozom 9 kaybı gözlenmektedir. (Cairns 2007, Yates vd 2007, Cebrian vd 2008).

2.2.8.1.1 FGFR 3

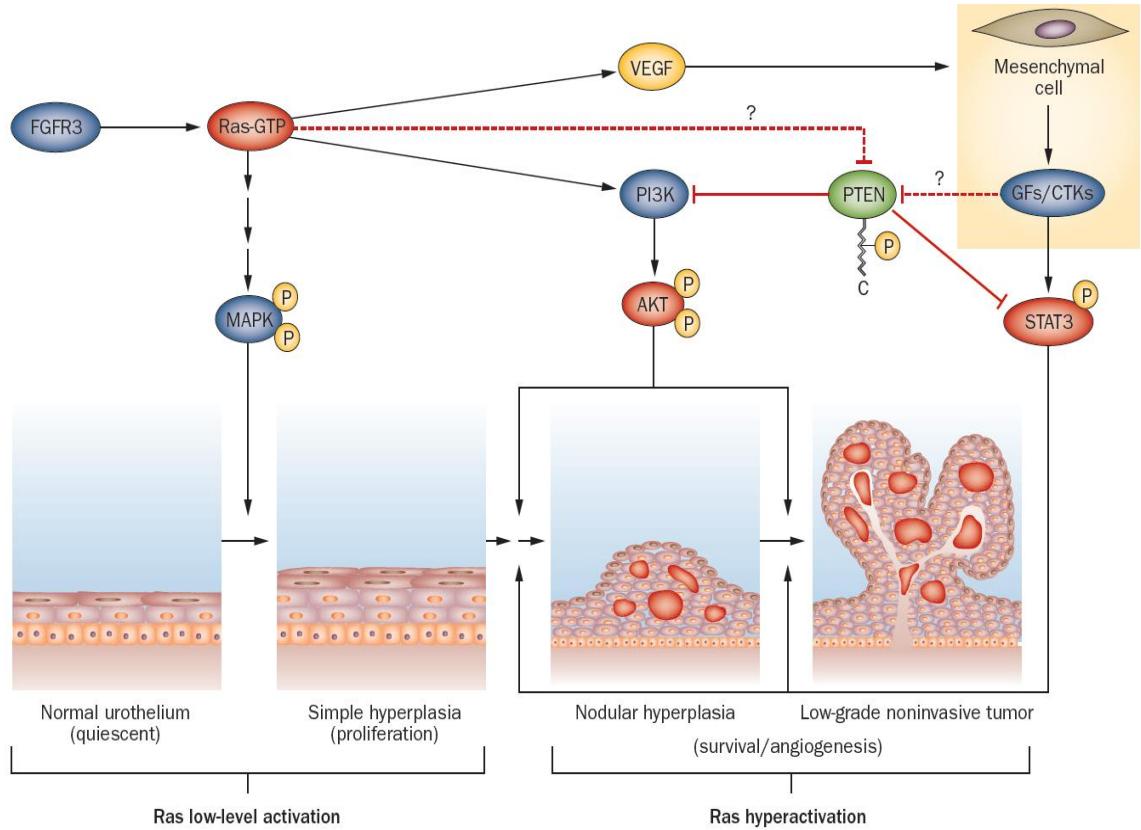
Ürotelyal karsinomalarda 11 farklı FGFR3 mutasyonu belirlenmektedir. Bunlar, ekzon 7, 10 ve 15 de hot-spot kodonlarda bulunmakta ve tümünün esas olarak reseptörleri aktive ettiği gözlenmektedir. %80'in üzerinde düşük grade Ta tümörlerin bu mutasyonlar gösterilmektedir. Yüzeysel ürotelyal karsinoma prekürsörü ürotelyal pallimoda da bu mutasyonlar gösterilmektedir. Ta tümörlerde, mutasyonlar tümör rekürensi ve progresyonu ile ilişkili bulunmamakla birlikte mutant Ta grade 1 tümörlerde bu mutasyonların yüksek rekürrens riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. FGFR3 mutasyonu olan ve mutasyon olmayan birçok tümörde, artan FGFR3 protein ekspresyonu gözlenmektedir. Mutant FGFR3 proteinleri rodent mezenkimal hücrelerde onkogeniktir. Normal ürotelyal kültür hücrelerinde, mutant FGFR3 RAS-MAPK yolağını aktive eder ve hücre sağ kalımını uyarmaktadır. Bu *in vitro* fenotip, FGFR3 mutasyonlarının klonal ekspansiyon ile ya da *in vivo* ürotelyumda hiperplazi gelişimi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. RAS geni ve FGFR3 mutasyonları karşılıklı dışlamalı olaylardır. RAS geni ya da FGFR3 genindeki mutasyonlar düşük grade tümörlerin %82'sinde gözlenmektedir. FGFR3 ve TP53'deki mutasyonlar da karşılıklı dışlamalı olaylardır. Buna zıt olarak, TP53 mutasyonları yüksek grade ve stagedeki ürotelyal karsinomalarda gözlenmektedir. Yüzeysel ürotelyal karsinomalarda FGFR3 iyi bir terapatik hedefdir. Yapılan çalışmalarda, knockdown ya da küçük moleküller veya antibiyotikler kullanılarak inhibisyon oluşturularak mutant FGFR3'ün inhibisyonunun ürotelyal karsinomalı hücre fenotiplerine etki ettiği gösterilmiştir (Cappellen 1999, Billerey vd 2001, Hernandez vd 2006).

2.2.8.1.2 PIK3CA

PI3K, tirozin kinaz reseptörlerinin sinyalizasyonunda önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmalarda, ürotelyal karsinomalarda PIK3CA katalitik alt ünitesi p110 α 'deki mutasyonlar gösterilmiştir. Bir çalışmada düşük tümör grade'i ve stage'inde %13 frekansında mutasyon gözlenmiş iken bir farklı çalışmada ise bu %27 frekansında bulunmuştur (Platt vd 2009, Lopez-Knowles vd 2006). PIK3CA mutasyon spektrumu bu karsinomada diğer kanserlerden farklılık göstermektedir. Diğer kanser türlerinde yaygın olan helikal domaindeki E542K ve E545K mutasyonları (%24-%52) ve H1047R kinaz domain mutasyonu ürotelyal karsinomada nadir olarak (%13) gözlenmektedir (Zhao vd 2008).

2.2.8.1.3 Siklin D1

CCND1 (11q13), bazı yüzeyel ve invaziv ürotelyal karsinomalarda amplifiye olmakta ve overeksprese protein profili göstermektedir. Overekspresyon durumu, MAPK veya PI3K yollarının aktivasyonu gibi farklı değişimlerin sonucunda oluşabilmektedir (Knowles vd 2011).



Şekil 2.6 İnvaziv olmayan papiller ürotelyal neoplazilerin erken onkogenezinde Ras-MAPK, Jak-STAT ve PI3K-AKT-mTOR sinyalizasyon yollarındaki ilişkiler (Netto 2012)

2.2.8.1.4. MikroRNA Ekspresyonu

Ürotelyal karsinomalarda değişen miRNA ekspresyonu ile ilgili çalışmalar rapor edilmektedir. Normal ürotelyumdan ürotelyal karsinomaya değişimler, bu değişimlerin hastalık gelişiminin erken dönemlerinde meydana gelebileceğini göstermektedir. Profil olarak, yüzeyel ve ilerlemiş ürotelyal karsinoma arasında anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Normal ürotelyum ile karşılaştırıldığında Ta tümörlere göre miRNA'ların downregüle oldukları gösterilmiştir. İlginç olarak, downregüle olmuş iki miRNA (miR-

99a ve miR-100)'nın FGFR3'ü regüle ettikleri bulunmuştur. Aynı şekilde miR-7'nin düşük seviyesinin de FGFR3 mutasyonu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. (Veerla vd 2009).

2.2.8.2. Kasa invaze ürotelyal karsinomadaki moleküler değişimler

Ürotelyal karsinoma in situ olarak da adlandırılan PUP'dan ileri gelen yüksek dereceli nonpapiler ürotelyal karsinoma, hücre döngüsünün kontrolünde yer alan p53 ve RB'yi de içeren potent tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar sonucu gelişmektedir (Hussain ve Akhtar 2013).

CIS, kasa invaze olan ürotelyal karsinomanın prekürsör belirteçidir. Genellikle parafine gömülü örneklerde retrospektif çalışmalarda genetik değişimler gözlemlenmiştir. TP53 mutasyon değişimleri, kromozom 9 kaybı, ERBB2 ekspresyonunun upregülasyonunu da içeren değişimler, kasa invaze olan ürotelyal karsinomalarda gösterilmektedir. 5p, 6p22.3, 10p15.1 kazanımı ve 5q ve 13q13-q14 kaybı CIS'de sıklıkla karşılaşılan durumlar arasındadır. FGFR3 mutasyonları CIS'de bulunmamaktadır (Knowles vd 2011).

TP53 geni, 17q23'de hücre döngüsü, DNA hasarına yanıt, hücre ölümü ve neovaskularizasyon gibi hücrel olaylarda rol oynayan 53kDa ağırlığında protein kodlayan bir gendir. TP53 geninde sıklıkla sentral lokasyonda bulunan DNA bağlanma bölgesindeki mutasyonlar invaziv ürotelyal karsinoma ile karakterizedir (Eble vd 2004). P53'ün mutant formları yaban tip P53 ile dimerizasyon yaparak P53 fonksiyonunu bloke edebilmektedir. P53 mutasyonları P21 ekspresyon azalışını da içeren bir seri yolağı uyarabilmektedir. P53'ün downstream hedefi olan bu genin downregülasyonu ürotelyal karsinomaların büyük çoğunluğunda gözlenmektedir (Hussain ve Akhtar 2013). Kanserde Uluslararası Araştırma Temsilciliği (International Agency for Research on Cancer; IARC) verilerine göre invaziv mesane kanserlerinin %40-60'ında TP53 mutasyonları gözlenmektedir. Bu mutasyonların %90'ı 4-9 ekzonlarında bulunmaktadır (Eble vd 2004).

İnsan kanserlerinde ilk tanımlanmış tümör baskılayıcı gen olan retinoblastoma (RB1) 13q14'de lokalize, hücre döngüsünde önemli bir rol oynayan bir gendir. Kasa invaze olan mesane kanserlerinin %30-80'inde RB1 inaktivasyonu gözlenmektedir. Yapılan bazı araştırmalarda da RB ekspresyonundaki değişimlere bağlı olarak hayatta kalım oranının düştüğü gösterilmiştir (Eble vd 2004).

Mesane kanser gelişiminde rol oynayan bir başka gen ise MDM2'dir. MDM2 artan P53 seviyesine bağlı olarak P53'ü degrade etmektedir. Ürotelyal karsinomada yüksek dereceli tümörlerde MDM2 amplifikasyonu gözlenebilmektedir. MDM2 promotöründe gerçekleşen tek nükleotit polimorfizmi (SNP309) mesane kanserlerinde sık rastlanan bir durumdur (Hussain ve Akhtar 2013).

Mesane kanserlerinde amplifiye olan ve overeksprese olan diğer bir molekül ise siklin bağımlı kinazlar ve onların regülatör birimleri olan siklinlerdir. 11q13'de lokalize siklin D1 (CCND1) geni mesane kanserlerinde %10-20 oranında amplifikasyon, %30-50 oranında ise overekspresyon göstermektedir (Eble vd 2004). Hedef geni bilinmeyen ve bilinen birçok genetik değişim kasa invaze olan ürotelyal karsinomada bulunmaktadır (Knowles vd 2011).

2.2.8.2.1. Onkogenler

EGFR gen ailesi üyesi olan reseptör tirozin kinaz, ERBB2 (17q23), invaziv ürotelyal karsinomaların %10-%20'sinde amplifiye olurken %10-%50'sinde ise overeksprese olmaktadır (Latif vd 2003, Caner vd 2008). Bu değişimlerin prognostik anlamı tartışılan bir konudur. Eğer bu reseptör liganda bağlanamıyor ve ERBB3 ile heterodimerizasyonuna inanılıyor ise ERBB3 statüsü ve/veya ligand ekspresyonun anlamlı bir etkisi muhtemeldir. İnvaziv tümörlerin %70'inden fazlası EGFR overekspresyonuna sahiptir ve bu durum zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Hem ERBB2 hem de EGFR, ilerlemiş ürotelyal karsinomalarda potansiyel terapötik hedeflerdir. Bu değişimler RAS-MAPK ve/veya PI3K yollarını aktive edebilmektedirler. RAS gen mutasyonları invaziv ya da yüzeysel hastalıklar ile ilişkili olmamakla birlikte, tümör hücrelerindeki *in vitro* deneylerde HRAS'ın invaziv fenotipi uyardığı gösterilmiştir. Fare ürotelyumunda eksprese olan mutant H-ras, kasa invaze olan tümörden ziyade yüzeysel papiller tümör gelişiminde gözlenmiştir. Bu yüzden, RAS mutasyonu her iki ürotelyal karsinoma gelişiminde de etki göstermektedir. FGFR3 mutasyonlarına yüzeysel ürotelyal karsinomalarda daha nadir karşılaşılmaktadır. Yaklaşık olarak T2 tümörlerinin %15'i bu mutasyonu göstermektedir. Buna zıt olarak, mutant olmayan invaziv ürotelyal karsinomaların %40-%50'sinde protein ekspresyonunun upregülasyonu gerçekleşmektedir (van Rhijn vd 2004, Tomlinson vd 2007).

Tablo 2.6 İnvaziv mesane tümörlerindeki genetik değişimler (Knowles vd 2011)

Gen (Sitogenetik lokasyon)	Değişim	Frekans (%)
Onkogenler		
HRAS (11p15NRAS(1p13)KRAS2 (12p12)	Aktive edici mutasyon	10-15
FGFR3 (4p16)	Aktive edici mutasyon	0-34
ERBB2 (17q)	Amplifikasyon/overekspresyon	10-14 Amplifikasyon
CCND1 (11q13)	Amplifikasyon/overekspresyon	10-20 Amplifikasyon
MDM2 (12q13)	Amplifikasyon/overekspresyon	4 Amplifikasyon
E2F3 (6p22)	Amplifikasyon/overekspresyon	9-11 Amplifikasyon ≥ T1
Tümör Baskılayıcı Genler		
CDKN2A (9p21)	Homozigot delesyon/metilasyon/mutasyon	HD 20-30 LOH 60
PTCH (9q22)	Delesyon/mutasyon	LOH 60 Mutasyon frekans düşük
DBC1 (9q32-33)	Delesyon/metilasyon	LOH 60
TSC1 (9q34)	Delesyon/mutasyon	LOH 60 Mutasyon 12
PTEN (10q23)	Homozigozite delesyon/mutasyon Delesyon	LOH 30-35;mutasyon 17
RB1 (13q14)	Delesyon/mutasyon	
TP53 (7p13)		%37 %70
DNA Kopya Sayısı		
Değişimleri		
2q, 5q, 6q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q, 15q, 16q, 17p, 18q,Y	Delesyon > %12	
1q, 3q, 5p, 7p, 8q, 10p, 17q, 20p, 20q,	Kazanım > %12	
1q22, 3p24, 6p22, 8p12, 8q21- 22 ve q24, 10p13-14, 12q15, 17q21, 20q13	Amplifikasyon < %5 (6p22 için % 5- % 10)	

HD: Homozigot delesyonu LOH: Heterozigosite kaybı

Bazı ürotelyal karsinomalarda (%4-%6) MDM2 (12q14) amplifikasyonu belirlenmiştir. MDM2 p53 düzeyini regüle etmekte ve bu genin overekspresyonu ile p53 fonksiyonunu inaktive etmek için alternatif bir mekanizma sağlanmaktadır. MDM2 upregülasyonu ve tümörün grade, stage ve prognozu arasında her hangi bir ilişki gösterilmemektedir. MYC, mesane tümörlerinin çoğunda upregüle olmasına rağmen bu mekanizma henüz bilinmemektedir. Bazı invaziv ürotelyal karsinomalarda 8q amplifikasyonu bulunmasına karşın, MYC majör hedef olarak gösterilmemektedir. Buna zıt olarak, tüm 8qnun ek kopyaları bulunmakta ve bu durum overekspresyona neden olabilmektedir. MYC aynı zamanda diğer moleküler olaylara (MAPK yolak uyarımı gibi) yanıt olarak da upregüle olabilmektedir. Kasa invaze olan ürotelyal karsinomaların %14'ündeki 6p amplikon ve E2F3 içeren hücre hatları ve fonksiyonel çalışmalar E3F3'ün ürotelyal hücre proliferasyonuna neden olabileceğini göstermektedir (Habuchi vd 1994, Schmitz vd 1997, Oeggerli vd 2004).

2.2.8.2.2. Tümör baskılayıcı genler

Diğer agrasif kanserlerde olduğu gibi, TP53, RB1, CDKN2A ve PTEN tümör baskılayıcı genleri invaziv ürotelyal karsinomalarla ilişkilidir. P53 ve Rb tarafından kontrol edilen yollar, hücre döngüsü progresyonunu regüle ederler ve strese karşı yanıtta rol oynarlar. TP53 mutasyonu invaziv ürotelyal karsinomada yaygın olarak görülmektedir. P53 proteininin immunohistokimyasal deteksiyonu birçok mutant p53 proteinini belirlese de birçok TP53 mutasyonu (~20%) stabil olmamakla birlikte bu yolla detekte edilemeyebilmektedir. Bu yüzden p53 protein varlığı kullanışlı bir prognostik belirteç değildir. Zayıf prognoz ve p53 pozitifliği arasında, yapılan iki meta-analize göre düşük bir ilişki saptanmıştır. Rb yolağı G1'den S fazına kadar hücre döngüsü progresyonun regüle etmektedir. RB1, ürotelyal karsinomalarındaki mutasyonlarda gözlenmemekle birlikte, homozigöz delesyonları, 13q14'ün heterozigözite kaybı ve Rb protein ekspresyon kaybı, yüksek grade ve stage'deki tümörlerde saptanmıştır. P16 ekspresyon kaybı ile ilişkilendirilmiş ekspresyon kaybı ve upregülasyonunu da içeren Rb proteinindeki değişimler, sistektomi tümör örneklerinin %54'ünde bulunmaktadır. CDKN2A, tüm grade ve stage'lerde ürotelyal karsinomaların %50'sinden fazlasında homozigöz silinimi ve homozigöz delesyonu invazyon ile ilişkilidir. PTEN (10q23), PI3K yolağının negatif regülatörüdür ve invaziv ürotelyal tümörlerin %24-%58'inde delesyona uğramıştır. Tutulan kopyada mutasyon nadir görülmekle birlikte HD tümör hücre hatlarında tespit edilmiştir. Azalmış ekspresyon yaygındır ve p53 değişimleri ile ilişkilendirilmiştir. P53 değişimi gösteren çoğu tümörde (%41), PTEN downregülasyonu

gözlenmekte ve bu değişimler zayıf sonuç ile ilişkilendirilmiştir. Fare ürotelyumunda, PTEN delesyonu erken ürotelyal hiperplaziye ve insan papiller yüzeysel tümörlerine benzeyen geç gelişime neden olmuştur. PTEN kaybı proliferasyon, apoptoz ve migrasyona etki edebilmektedir.

Rho ailesi GDP ayrılma inhibitörü RhoGD12, ürotelyal karsinomada tümör baskılayıcı olarak etki etmektedir. Metastazın izojenik hücre hattı modelinde ekspresyonu azalmış ve ekspresyondaki bu azalış ürotelyal karsinoma hastasında sağ kalımın azalması ile ilişkilendirilmiştir (Knowles vd 2011).

2.2.8.3. İnvaziv ürotelyal karsinomadaki diğer genomik değişimler

İnvaziv ürotelyal karsinomada fazla sayıda genomik değişim gösterilmektedir. Bu değişimler, DNA kopya sayısında kayıp ve kazanımları ve yeni onkogenleride kapsayabilen çeşitli yüksek düzeyde amplifikasyonu içeren birçok durumu içine almaktadır. Günümüze kadar birçok bölgeyi içeren hedef genler henüz tanımlanamamıştır. İnvaziv ürotelyal karsinoma, aynı hastadan alınan ilişkili tümörlerde genetik değişiklik sergilemektedir. Bu genellikle mikrosatellit instabilitesinden ziyade kromozomal instabilitedir. 3p22-25 ve 5p kazanımı ve 4p11-15, 5q15-23, 6q22-23 ve 10q24-26 kayıpları T1 tümör progresyonuyla ilişkilendirilmiştir (Knowles vd 2011).

2.2.8.4. MikroRNA ekspresyonu

İnvaziv ürotelyal karsinomada birçok miRNA ekspresyon değişimi gösterilmektedir. Normal ürotelyum ile karşılaştırıldığında, invaziv tümörlerde miRNA'ların downregülasyonundan çok upregülasyonu gözlenmiştir. Yapılan iki çalışmada invaziv ve invaziv olmayan örnekler karşılaştırılmış invaziv fenotipte zayıf prognoz ile birlikte spesifik değişimlerin ilişkisi gösterilmiştir. Fonksiyonel çalışmalarda, miR-145 ve miR-221'in ürotelyal hücre sağ kalımını, miR-200'ün epitelyal-mezankimal trasisyonu, miR145 ve miR-133a'nın sitoskelet gen FSCN1'in regülasyonu ve miR-101'in Polycomb Repressive Complex 2 gen *EZH* 1'in ekspresyonunun modülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Knowles vd 2011).

Tablo 2.7 NMIBC ve MIBC’de yeni moleküler prognostik markerlar (Netto 2012)

Kasa İnvaze Olmayan Ürotelyal karsinoma (NMIBC)
Multitarget FISH
<i>FGFR3</i> mutasyonu/overekspresyonu
<i>HRAS</i> Değişimi
Moleküler grade (mG)
Proliferasyon indeksi (KI67, MIB1)
P53 inaktivasyonu/akümüasyonu
pRb1, p21, p27’nin ekspresyonunun downregülasyonu
Siklin D3 ve Siklin D1’in overekspresyonu
<i>ERBB3/ERBB4</i> overekspresyonu (koruyucu)
E-kaderin kaybı
Multimarker immunoekspresyon analizi (p53, p27, KI67, pRb1, p21)
Gen ekspresyon array panelleri
DNA ploidi durumu ve S faz kinetiği
Anjiyogenez marker overekspresyonu (<i>VEGF, HIF1A, THBS1</i>)
Promotör hipermetilasyonu (<i>RASSF1, DAPK, APC, CDH1, EDNRB</i>)
Kasa İnvaze Ürotelyal karsinoma (NMIBC)
P53 inaktivasyonu/akümüasyonu
pRB1’in ekspresyonunun değişimi
P21 ekspresyon kaybı
P16 ekspresyonunun değişimi
Proliferasyon indeksi (KI67, MIB1)
E-kaderin kaybı
<i>EGFR</i> overekspresyonu
Anjiyogenez marker overekspresyonu (<i>VEGF, HIF1A, THBS1</i>)
<i>ERBB2</i> overekspresyonu/amplifikasyonu
mTOR değişimi
Fos S6 ekspresyonu (koruyucu)
Gen ekspresyon array panelleri
Promotör hipermetilasyonu (<i>RASSF1, CDH1, EDNRB</i>)

2.3. Ürotelyal karsinomada sinyal yolları

Ürotelyal karsinomada, *RAS-MAPK* ve *PI3K* yolak aktivasyonuna dair baskın kanıtlar gösterilmiştir. Yüzeysel ürotelyal karsinomada, *FGFR3* ve *RAS* mutasyonları hemen hemen tüm çalışmalarda *RAS-MAPK* yolak aktivasyonuna bağlı olarak gösterilmiştir. Normal ürotelyum kültür hücrelerinde *FGFR3* aktivasyonu, *PI3K* yolağını aktive etmemektedir. Yüzeysel ürotelyal karsinomada *PIK3CA* mutasyonlarının varlığında, ek *PI3K* yolak aktivasyonu gerekmektedir. Ras mutasyonu her iki yolağı da aktive etmektedir. Yüzeysel ve invaziv ürotelyal karsinomada, *TSC1*’in inaktivasyonu ve *AKT1*’in aktive edici mutasyonları ve invaziv ürotelyal karsinomada *PTEN* inaktivasyonu da *PI3K* yolağını aktive edebilmektedir. ERBB reseptörlerini de içeren yolağın upstream aktivatörleri de bu duruma katkıda bulunabilmektedir. Yolaktaki

anahtar üç gendeki (PIK3CA, TSC1, PTEN) değişimlerden ziyade kombine mutasyon birikimler veya sinerjistik etkiler kritik önem arz etmektedir. Bu durum kısmen TSC1 için önemlidir. Yapılan TSC1 ve TSC2 fonksiyon çalışmalarında, mTOR aktivitesini regüle eden TSC1/TSC2 kompleksi gözlenmiştir. TSC2'nin bağımsız fonksiyonları açıklanabilirken, TSC1'in bağımsız fonksiyonları açıklanamamaktadır. TSC1 mutasyonları mesane kanserlerinde gözlenirken diğer kanserlerde bu mutasyonlar gözlenmemektedir ve PIK3CA ve PTEN değişimleriyle birlikte ürotelyumda bağımsız TSC1 fonksiyonunu gösterebilmektedir (Knowles vd 2011).

2.3.1. Ürotelyal tümör-başlatıcı hücreler

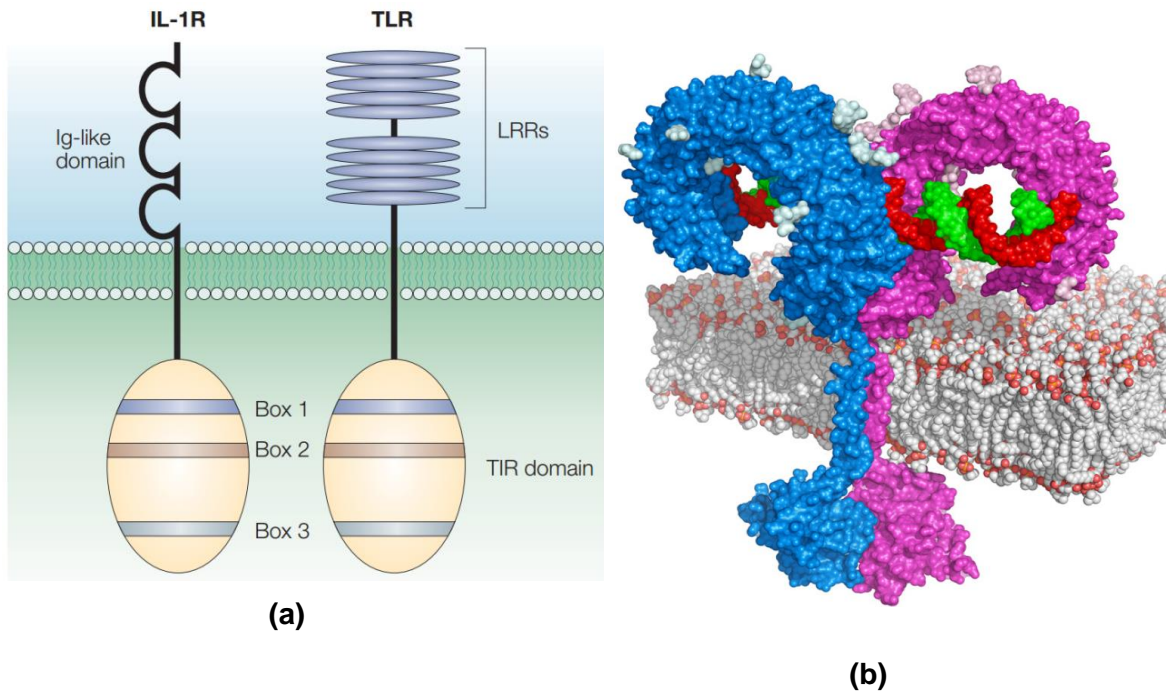
Heterojenik ürotelyal hücre populasyonları, yüksek tümörojenik altpopülasyon özelliğine sahiptirler. Diğer kanser tiplerindeki kök hücreler, kemoterapi ajanlarına direnç göstermekte ve tedavi sonrası hastalığın nüksetmesine neden olabilmektedirler. Yapılan çalışmalarda ürotelyal kanserlerdeki bu populasyonların varlığı kanıt olarak gösterilmiştir (Knowles vd 2011).

2.4. Toll-benzeri Reseptör (TLR)'ler

Toll reseptörü ilk kez, *Drosophila* embriyosunda dorsoventral pozisyon için önemli olan reseptör olarak tanımlanmıştır. Sonraki yıllarda (1996), bu reseptörün yetişkin sineklerde mantarlara karşı doğal immun yanıtta da görev aldığı keşfedilmiştir. Bu gelişmeleri takiben, Toll reseptörlerinin doğal bağışıklıktaki rolleri yalnızca böceklerde değil aynı zamanda memelilerde de araştırılmaya başlanmıştır. Bu araştırmalar sonucunda hem yapısal hem de fonksiyonel olarak Toll reseptörlerine benzeyen reseptörlerin varlığı belirlenmiş ve bu benzerlikten dolayı memelilerdeki Toll reseptörleri "Toll-benzeri reseptör" (TLR) adını almıştır. İlk memeli Toll homoloğu, 1997'de hToll olarak adlandırılmıştır ve bu reseptörün günümüzdeki adı TLR4'tür (Konat 2008).

Bugüne kadar insanda 10 TLR (TLR1-10), farede ise 12 TLR (TLR1-9, TLR11, TLR12, farede TLR10 ekspresyonu yoktur) ailesi üyesi tanımlanmıştır (Oliveira-Nascimento vd 2012). Memelilerde bulunan tüm TLR'ler, ekstraselüler alanda ligand-bağlama bölgelerinde ortak yapısal özelliklere sahiptirler. Bu reseptörlerin amino-terminal ekstraselüler domain'leri lösinden zengin tekrar motiflerini içermektedir ve bu bölüm lösinden-zengin tekrarlar (leucine-rich repeats, LRRs) olarak adlandırılmaktadır.

Bu motifler tek bir transmembran domaini ile devam eder ve sonrasında Toll/interlökin 1 reseptör (TIR) domaini olarak adlandırılan globüler bir sitoplazmik domain ile sonlanır (Şekil 2.7. a). Kristallografi çalışmalarında LRR'lerin, reseptörün ekstraselüler domain'inin at nalı görünümünde olmasına neden olduklarını, ligand bağlanmasını takiben iki ekstraselüler domain'in "m" şeklinde bir dimer yapı oluşturdukları belirlenmiştir. Bu dimer yapılanmayı takiben her iki reseptörün transmembran ve sitoplazmik domain'leri de sinyal iletim kaskadını başlatmak üzere birbirine oldukça yakın devam etmektedir (Şekil 2.7. b). Tüm TLR ailesi üyeleri evrimsel süreçte sıkı korunmuşlardır ve bu da, TLR'lerin normal fizyolojik süreçte ne kadar önemli olduklarını göstermektedir.



Şekil 2.7 (a) TLR'ün şematize edilmiş yapısal modeli (Akira 2004) ve (b) TLR'lerin dimer yapısının kristallografi modeli (Botos 2011).

Doğal bağışıklık sistemi, patojen tehditlerini tanıyan ve onlara karşı yanıtı harekete geçiren germ-line şifreli Pattern Tanıma Reseptör (PRR)'leri içermektedir. PRR'ler, mikrobiyal patogenez, sağ kalım ve replikasyonda kritik role sahip olan, Patojenle- İlişkili Moleküler Patern (PAMP)'ler olarak adlandırılan mikrobiyal komponentleri tanımada görev almaktadırlar. İntegral hücre membranı ve hücre duvarı komponentleri, bakteriyel toksinler, DNA, RNA vb moleküller PAMP'lara en iyi örneklerdir. PRR'lerin PAMP'ları tanıma kaskatı, enfeksiyonu önleyen ya da

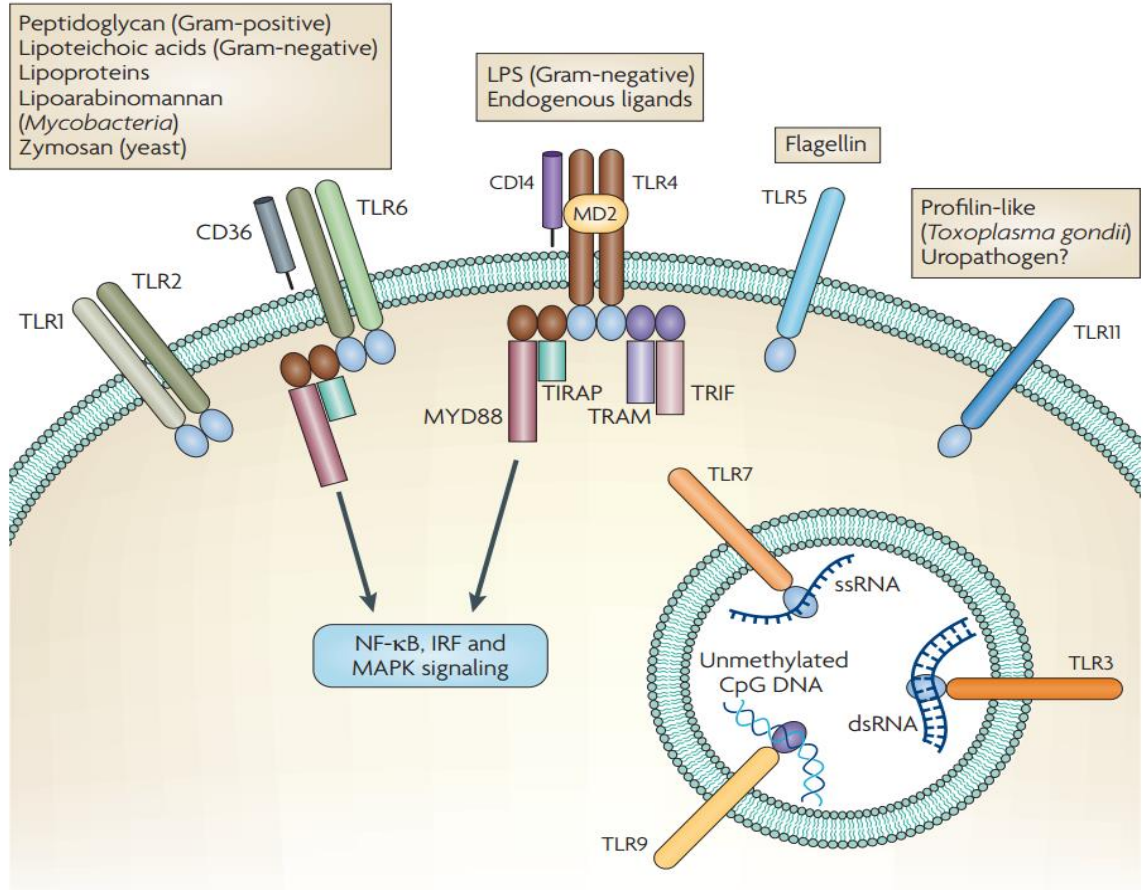
enfeksiyonla savaşan ve kazanılmış immun yanıtı harekete geçiren konak defansını aktive eder (Oliveira-Nascimento vd 2012). PRR'le; TLR, Nükleotit bağlayan Oligomerizasyon Domain (NOD)- benzeri reseptörler (NLR), Retinoik Asit ile Uyarılan Gen I (RIG-I) benzeri reseptörler (NLR) ve DNA sensörleri olmak üzere dört aileden oluşmaktadır (Gautagny vd 2012). PRR'lerin en iyi bilinen grubunu, yukarıda da bahsedildiği üzere birçok memeli hücresinde eksprese edilen TLR'ler oluşturmaktadır. Her bir TLR, mikrobiyal komponentlerin spesifik patternlerini tanımaktadır. Mikrobiyal komponentlerin TLR'ler tarafından tanınması farklı genlerin ekspresyonlarını uyararak doğal immunitenin aktivasyonunu tetiklemektedir. Doğal immunitenin TLR-aracılı aktivasyonu, antijen spesifik kazanılmış bağışıklığın gelişimi için zorunlu gözükmektedir (Konat 2008). TLR'ler yalnızca ekzojen PAMP'lar ile değil ayrıca tehlike sinyalleri olarak adlandırılan endojen ligandlar ile de aktive olabilmektedirler. Bu konak-kökenli TLR ligandları Tehlike ile İlişkili Moleküler Pattern (DAMP)'lar olarak adlandırılmaktadır (Muzio vd 2012).

2.4.1. TLR'lerin lokalizasyonları ve ligandları

TLR'ler, Tip I transmembran proteinlerdir ve hücre içerisinde farklı lokalizasyonlarda bulunmaktadır. TLR1, TLR2, TLR4 ve TLR6 hücre yüzeyinde eksprese edilirken, TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 ise endozom gibi hücre içi komponentlerde eksprese olmaktadır (Konat 2008). (şekil 2.8).

TLR'lerin keşfinin ardından yapılan birçok genetik çalışmada bu reseptörlerin ilgili ligandları araştırılmıştır. Tablo 2.8' de her bir TLR'ye özgün ligandlar ve bu ligandların köken aldıkları orijinler özetlenmiştir. TLR1 ya da TLR6 ile heterodimer oluşturan TLR2, gram pozitif bakterilerin ve mikoplazmanın peptidoglikan, lipopeptit ve lipoproteinlerini içeren çeşitli bakteriyel komponentleri tanımaktadır. TLR3'n ligandı replike olan virüslerin ürettiği çift-zincir RNA (dsRNA) molekülüdür. Gram negatif bakterilerde bulunan LPS'nin TLR4'n ligandı ve bakteriyel flagellin ise TLR5 ligandı olduğu belirlenmiştir. TLR7; sentetik imidazoquinolin-benzeri molekülleri, guanozin analoglarını (loxoribine, tip I human immunodeficiency virus veziküler stomatitis virus ve influenza viruslarından köken alan ssRNA) ve bazı siRNA'ları tanır. TLR8, farelerde fonksiyonel değildir ancak imidazoquinolinleri ve ssRNA'yı tanıdıkları düşünülmektedir. Bakteriyel ve viral CpG-içeren DNA, TLR9'un ligandlarıdır. TLR10'un henüz bilinen bir ligandı yoktur ancak, doğal bağışıklıkta TLR1 ile aynı mekanizmayı paylaşdığı

bilinmektedir. Farelerde fonksiyonel olan TLR11 *Toxoplasma gondii* gibi protozoa kökenli profilin-benzeri molekülleri ve üropatojenik bakteri komponentlerini tanır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 TLR'lerin hücre içi lokalizasyonları ve fizyolojik fonksiyonları (Rakoff-Nahoum 2009)

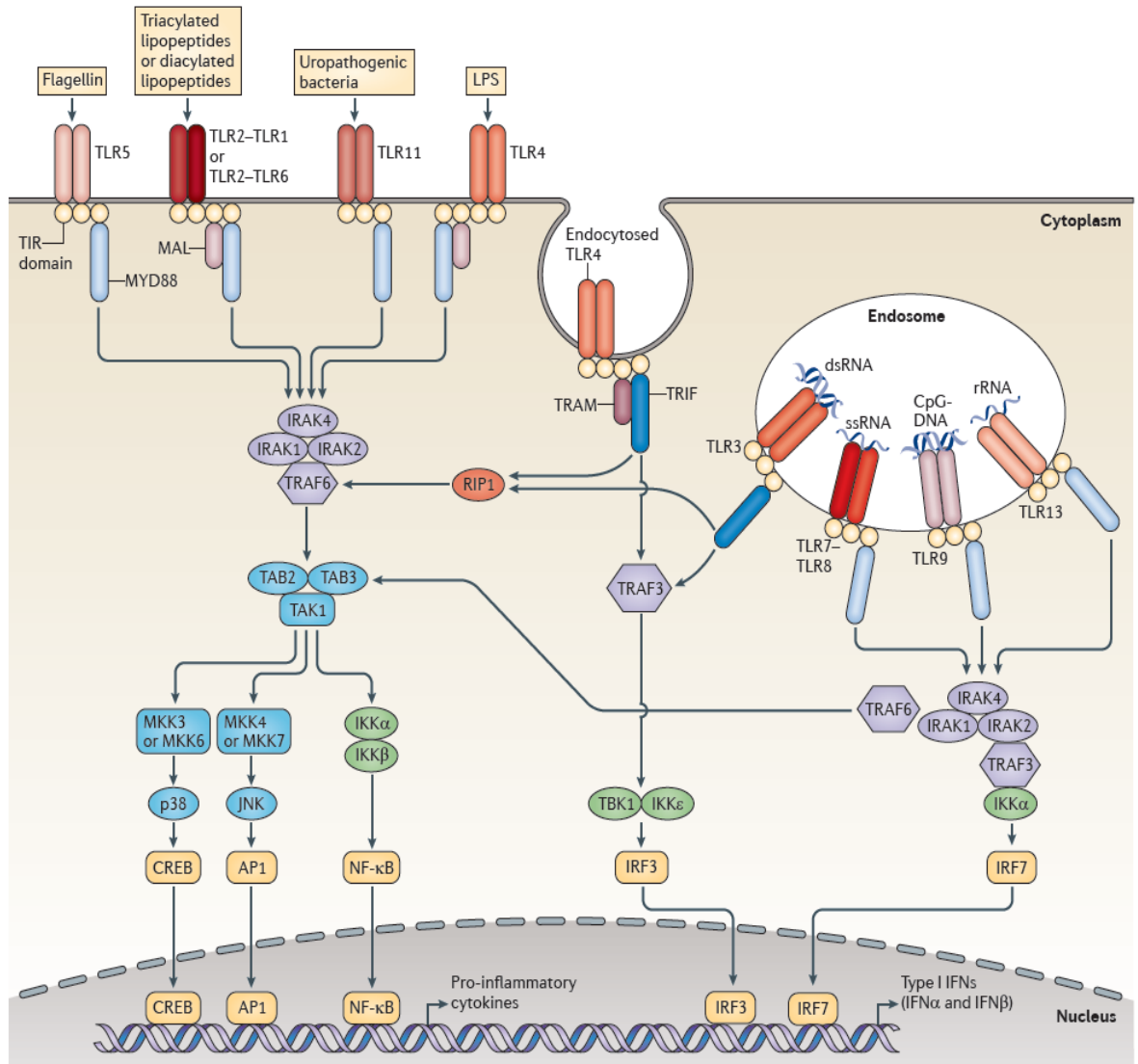
Mikrobiyal ligandlara ek olarak, birçok endojen ligandların da TLR'leri uyardıkları belirlenmiştir. Bu endojen ligandlara ısı-şok proteinleri (HSP) (HSP60 ve HSP70), hiyaluronan oligosakkaritleri, sürfektan protein A ve heparan sülfat, fibronektin, endoplazmin gibi farklı ekstraselüler matris ürünleri ve bu matris ürünlerinin fragmanları verilebilir (Ahmed vd 2013).

Tablo 2.8 TLR'ler ve ligandları (Akira 2004)

Reseptör	Ligand	Ligand Orijini
TLR1	Triaçil lipopeptidler Soluble faktörler	Bakteri ve mikobakteri <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoprotein/lipopeptidler Peptidoglikan Lipoteikoik asit Lipoarabinomannan Fenol-soluble modulin Glikoinositolfosfolipidler Glikolopidler Porinler Atipikal lipopolisakkarit Atipikal lipopolisakkarit Zimosan Isı şok protein 70	Çeşitli Patojenler Gram pozitif bakteri Gram pozitif bakteri Mikobakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Fungi Konak
TLR3	Çift zincirli RNA	Virus
TLR4	Lipopolisakkarit Taksol Füzyon Protein Zarf Protein Isı şok protein 60 Isı şok protein 70 Fibronektin Tip 3 Tekrarlı Ekstra Domain A Hyaluronik asit oligosakkaritleri Heparan sülfat polisakkarit fragmentleri Fibronojen	Gram negatif bakteri Bitkiler Respiratory Syncytial virus Fare tümör virusu <i>Chlamydia pneumoniae</i> Konak Konak Konak Konak Konak
TLR5	Flagellin	Bakteri
TLR6	Diaçil lipopeptidler	Mikoplazma
TLR7	Lipoteikoik asit Zimosan Imidazokuinolin Laksoribin Bropirimin Tek iplikli RNA	Gram pozitif bakteri Fungi Sentetik bileşikler Sentetik bileşikler Sentetik bileşikler Viruslar
TLR8	Imidazokuinolin Tek iplikli RNA	Sentetik bileşikler Viruslar
TLR9	CpG -içeren DNA	Bakteri ve Viruslar
TLR10	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış
TLR11	Tanımlanmamış	Üropatojenik bakteri

2.4.2. TLR sinyal iletimi

Son 15 yıldır memelilerde TLR sinyal iletiminin nasıl gerçekleştiği ile ilgili çalışmalar yapılmış ve önemli veriler elde edilmiştir. TLR'lerin ekstraselüler N-terminal domaini ligand bağlama spesifikliği yüksek olan lösin tekrarlarından oluşmaktadır. TLR5, TLR11, TLR4 ve TLR2-TLR1 veya TLR2-TLR6 heterodimerleri hücre yüzeyindeki özgün ligandlarına bağlanırlar. Oysa, TLR3, TLR7-TLR8 ve TLR9 endozomlarda lokalizedir ve mikrobiyal ya da konak-kökenli nükleik asitler tanırlar. TLR4 hem plazma membranında hem de endozomlarda lokalizedir. TLR sinyal iletimi, ligandların TLR'lerini dimerize etmesi ile başlar. Bunu takiben, TLR'lerin oldukça sıkı korunmuş sitoplazmik domainleri olan TIR domainlerine TIR-domaini içeren adaptör molekülleri bağlanır. TIR domain'i downstream adaptör molekülleri için bağlanma bölgesi olarak görev yapmaktadır. TLR sinyal iletiminde, TIR domain'ine bağlanan Myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88), Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN (TRIF), TRIF-related adaptor molecule (TRAM), MyD88 adaptor-like protein (MAL) ve Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein (SARM)'dan oluşan beş adaptör molekül yer almaktadır (Şekil 2.9). TLR3 dışındaki tüm TLR'ler, sinyal iletimi için MYD88 molekülüne ihtiyaç duyarlar. TLR'ler içinde TLR4, sinyal iletimini MYD88'den TRIF'e aktarmak için plazma membranından endozoma geçer. Adaptör moleküllerin bağlanması, IL-1R-ilişkili kinaz (IRAK)'lar ve TNF reseptör-ilişkili faktör (TRAF)'lar arasında etkileşime neden olur ve sonrasında bu etkileşimler mitogen-activated protein kinase (MAPK)'lar (JUN N-terminal kinase (JNK) ve p38) ve birçok farklı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olur. TLR sinyal iletiminin downstream'inde aktive olan 2 önemli transkripsiyon faktör ailesi bulunmaktadır. Bunlar nüklear faktör κ B (NF- κ B) ve interferon-regulatory factor (IRF) ailesidir. Bu iki aile dışında cyclic AMP-responsive element-binding protein (CREB) ve aktivatör protein 1 (AP1) gibi transkripsiyon faktörleri de önemli rol oynamaktadır. TLR sinyal iletiminin major sonucu pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimidir. Özellikle endozomal TLR sinyal iletimi tip I interferon üretimi ile sonuçlanır (O'Neill vd 2013, Gautagny vd 2012).



Şekil 2.9 Memeli TLR sinyal iletim yolları (O'Neill vd 2013)

Özetle, TLR'ler MYD88-bağımlı ve MYD88-bağımsız olmak üzere iki sinyal iletim yolağını kullanmaktadırlar. Aşağıdaki bölümde bu iki yolla ilgili daha detaylı bilgiler yer almaktadır.

2.4.2.1. MYD88- bağımlı yolak

MYD88, bir C-terminal TIR domaini ve bir N-terminal ölüm domaine sahip TLR'lerin TIR domainlerine bağlanan bir adaptör moleküldür ve MYD88-bağımlı yolakta önemli rol oynamaktadır. MYD88 molekülü bulunmayan farelerin TLR3 dışındaki ligantlara yanıt olarak, TNF-α ve IL-12p40 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini gerçekleştirmediği bilinmektedir (Konat 2008). MYD88-bağımlı yolakta TLR'ler TIR domainleri ile MYD88 ve MAL proteinleriyle etkileşirler. Bu etkileşim sonucu TIR

domainlerine IRAK'lar toplanır ve bu kinazlar TRAF6/IKK (Inhibitor of nuclear factor kappa-B) kompleksini ve MAPKK'leri uyarır. Sonuçta ERK, JNK ve p38 gibi MAP kinazlar, NF- κ B ve AP-1 aktive olur. İnhibitör κ B-kinaz, inhibitör κ B'yi fosforillediğinde, NF- κ B sitoplazmadan nükleusa geçer ve TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 ve adezyon molekülleri gibi sitokinlerin ve kemokinlerin transkripsiyonunu aktive eder (Maiorov vd 2013). NF- κ B aktivasyonu ve sitokin ekspresyonu ile karakterize bu normal immun yanıt, akut inflamasyona neden olur. Ancak bu aktivasyon ve ekspresyonlar devam ederse kanser oluşum sürecine katılabilirler.

AP-1 ve NF- κ B'ye ek olarak, çeşitli interferon regülasyon faktör (IRF) ailesi üyeleri de MYD88 bağımlı yolak ile aktive edilmektedirler. IRF-5 ve IRF-7 direkt olarak MYD88 ile etkileşirler ve inflamatuvar sitokinlerin ve tip I IFN'ların TLR bağımlı uyarımını regüle ederler. IRF4, MYD88 ile etkileşerek MYD88-IRF-5 aracılı gen uyarımının negatif regülasyonu olarak etki ederler. IFN- α ile uyarılan IRF-1'de MYD88 ile kompleks oluşturularak nükleusa geçerek IFN- β , nitrik oksit sentaz, IL-12 ve p35 uyarımına sebep olmaktadır. IRF-8 ise TRAF6 ile etkileşerek inflamatuvar mediatörlerin üretimini regüle etmektedir (Konat 2008).

2.4.2.2. MYD88-bağımsız ya da TRIF-bağımlı yolak

MYD88 geni susturulmuş makrofajlarda, ligand varlığında TLR4 aracılığı ile inflamatuvar sitokin üretiminin olmadığı, ancak NF- κ B aktivasyonunun gecikmeli de olsa gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu durum, TLR4 aracılı inflamatuvar sitokin üretiminin MYD88 yolağına bağımlı olmasına rağmen, TLR4 sinyal iletiminde MYD88-bağımsız bir yolağın da var olduğunu göstermiştir. Bu yolak aynı zamanda TRIF-bağımlı yolak olarak da adlandırılmaktadır. TLR3 ve TLR4 TRIF-bağımlı yolağı kullanılmaktadır. TLR4 uyarımı, IRF-3 transkripsiyon faktörünün ve ayrıca NF- κ B'nin TRIF-bağımlı yolak ile geç faz aktivasyonuna sebep olmaktadır. TLR4 ile uyarılmış IRF-3 aktivasyonu sonucunda IFN- β üretimi gerçekleşir. Ardından IFN- β , "signal transducer and activator of transcription 1" (STAT1)'i aktive ederek IFN ile uyarılan çeşitli genlerin ekspresyonlarında artışa neden olmaktadır. TLR3 uyarımı ile de IRF-3 aktivasyonu gerçekleşmekte ve TRIF-bağımlı yoldan IFN- β 'nin uyarımı sağlanmaktadır (Konat 2008).

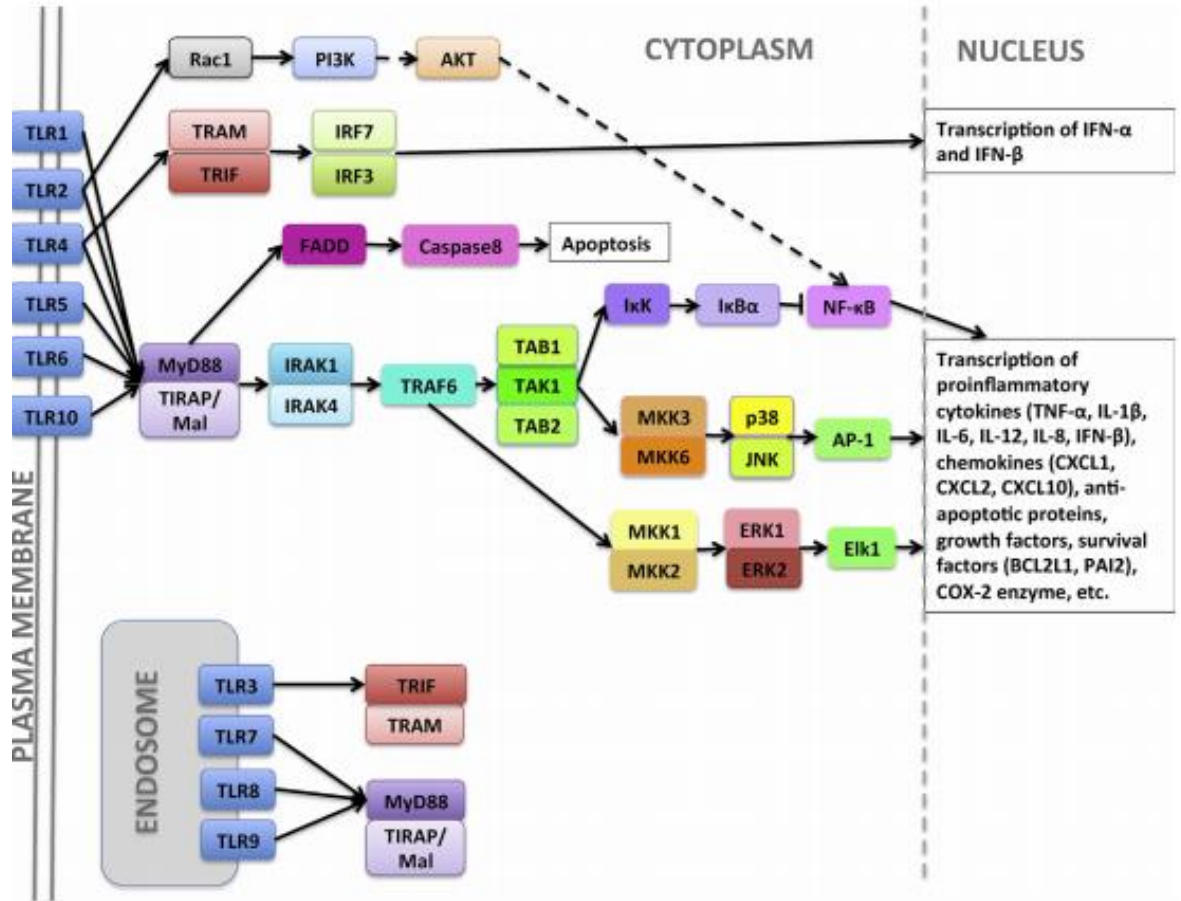
MYD88 ve TIRAP/MAL gibi TIR domaini içeren moleküller MYD88-bağımlı yolda önemli rol oynarken, diğer TIR domain içeren moleküller de TRIF-bağımlı yolağı düzenlerler. TIR domaini içeren adaptör moleküllerden biri de TRIF (TICAM-1 olarak da adlandırılmaktadır) molekülüdür. TRIF molekülünün uyarılmasıyla IFN- β

üretimi gerçekleşir. TRIF molekülü TLR3 ve TLR4 ile ilişkili TRIF-bağımlı yolak için esansiyeldir (Konat 2008). Örneğin, TLR'lerin bir diğer TIR domaini içeren TRIF-ilişkili adaptör molekülü (TRAM) (TICAM-2 olarak da adlandırılmaktadır) ise TLR4 ile ilişkili TRIF bağımlı yolak için elzemdir. TRIF, "receptor-interacting protein 1" (RIP1) ile etkileşerek TRIF bağımlı NF-κB aktivasyonunu gerçekleştirmektedir (Konat 2008).

2.4.3. TLR'ler ve kanser

Enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattını doğal bağışıklık sistemi oluşturmaktadır. Germ-line şifreli PRR'leri stres altındaki ya da enfekte olan hücreleri hızlıca tanıyarak potansiyel efektör mekanizmaları tetiklerler. Doğal bağışıklık sinyallerinin mikroorganizmaları tanımadaki rollerinin yanı sıra, yapılan moleküler ve klinik mekanizmalar doğal bağışıklık ile birlikte TLR'lerin onkogenik stres ile iletişime geçerek karsinogenezi düzenledikleri gösterilmiştir (Junishi 2012).

Mikrobiyal enfeksiyonlarla savaşan ve doku hemeostazını sürdüren doğal bağışıklık sistemi ile gerçekleşen inflamasyon, eğer kontrol edilemezse kanser gelişimine de neden olabilmektedir. Yapılan birçok çalışmada inflamasyonun tümör başlangıcı, tümörün ilerlemesi, invazyon, metastaz gibi tümör gelişiminin tüm evrelerinde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. İnflamasyon hücresel strese neden olarak DNA hasarını ve genetik instabiliteyi tetikleyebilmekte ve dolayısıyla kronik inflamasyon, malign hücre transformasyonunu başlatan genetik mutasyonlara ve anormal epigenetik mekanizmalara sebep olabilmektedir. İnflamasyon yalnızca karsinogenezi uyarmak ile kalmayıp aynı zamanda immun sistem hücrelerini, tümör hücreleriyle savaşmakta etkisiz hale getirebilmektedir. İnflamasyona neden olan yollardan birini de TLR yolağı oluşturmaktadır. Şekil 2.10'da inflamasyonda TLR'lerin rolü şematize edilmiştir (Mairov vd 2013).



Şekil 2.10 İnflamasyonda TLR yolu (Maiorov 2013)

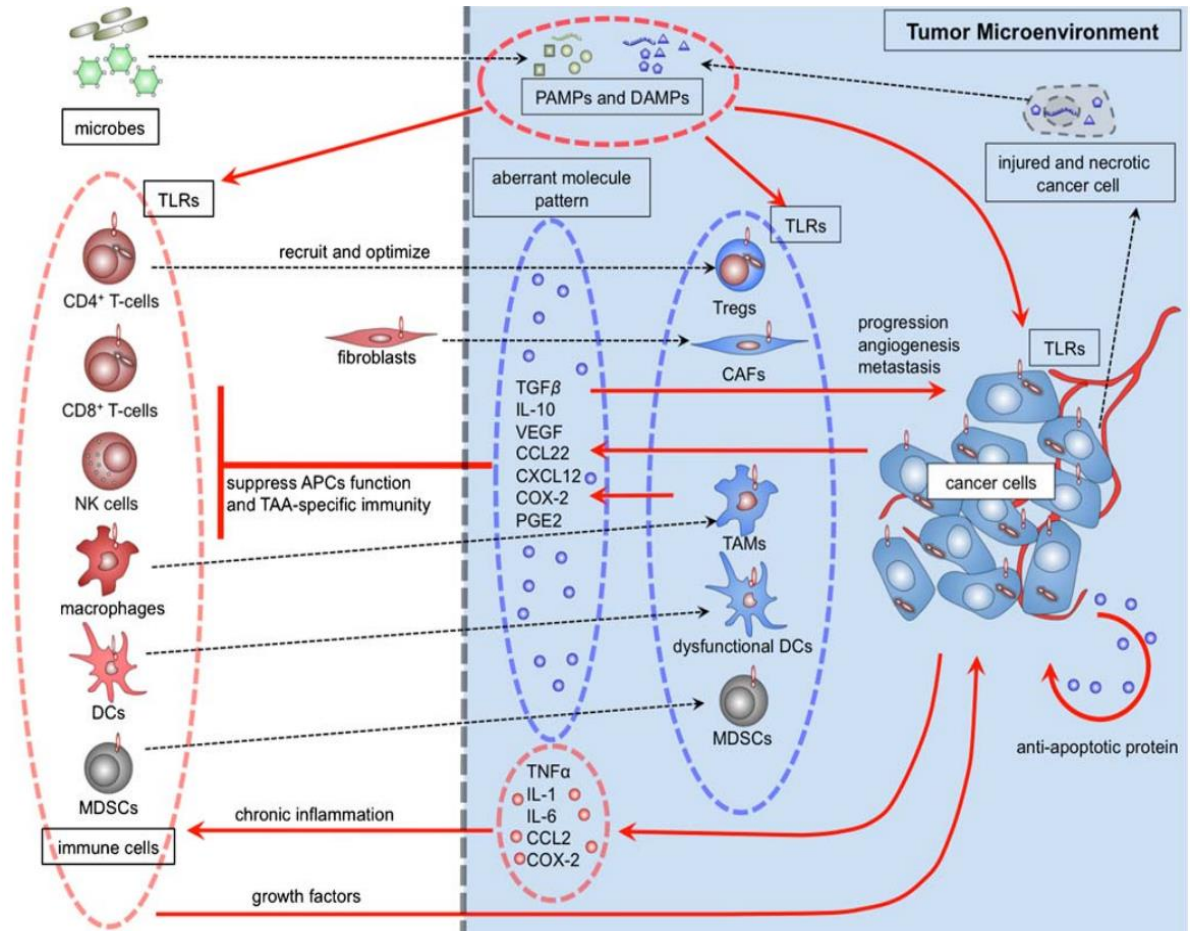
TLR'lerin ekspresyonu ilk olarak immun sistem hücrelerinde gösterilmiştir. TLR1 ve TLR6 insan lökositlerinde eksprese olmaktadır. TLR2/4/5 ekspresyonu myelomonosit hücreleriyle sınırlı kalırken, TLR3 ekspresyonu myeloid dentritik hücrelerde ve B hücrelerinin bazı alt gruplarında gerçekleşmektedir. B hücreleri ve plasmastoid dentritik hücreler spesifik olarak TLR7/9/10'u eksprese etmektedirler. TLR'ler primer olarak immun sistem hücrelerinde eksprese olmakla birlikte aynı zamanda insan keratinositlerinde, intestinal hücrelerin epitellerinde, ürogenital ve solunum sistemi bez hücrelerinde, endotelial hücrelerde, mezenkimal kök hücrelerde ve çeşitli sinir sistemi hücrelerinde de eksprese olabilmektedirler (Gautagny vd 2012).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kronik inflamasyon sürecinde karsinojenik değişimlere uğrayan epitelyum hücrelerinde TLR sinyallerinin anormal upregulasyonları rapor edilmiştir. Bir başka önemli veri de dünya genelinde kanserlerin %15'inden fazlası direkt enfeksiyon orijinli olmasıdır. Kronik inflamasyon ve kanser arasındaki ilişkiye en iyi örnekler kolorektal kanser (otoimmun hastalıklar ya da mikrobiyal enfeksiyonlar), gastrik kanser (*Helicobacter pylori*), servikal kanser (human papilloma

virüs), karaciğer kanseri (hepatit B ve C virüsleri) ve hematolojik malignansiler (sitomegalavirüs ve Epstein-Barr virüs). Kronik inflamasyon immunolojik olarak akut enfeksiyondan farklılık göstermektedir. Akut faz enfeksiyonları CD8+T-hücrelerinin ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin aktivasyonu ile karakterizedir. CD8+ efektör T-hücreler, tümör-ilişkili antijen (TAA)-spesifik immunitede ve dolayısıyla tümörlerin eliminasyonunda merkezi bir rol oynamaktadırlar. Aktive olan NK hücreleri dentritik hücrelerin maturasyonunu stimule eder ve adaptif anti-tümör immunité yanıtını hızlandırır. Kronik inflamasyon sırasında bu fonksiyonların yok olması ya da azalması tümör toleransını, karsinogenezi ve tümör mikroçevresinin gelişimini uyarabilmektedir (Şekil 2.11). Kanser hücrelerinde ekprese olan TLR'ler, NF-κB kaskadının aşırı uyarımına neden olarak kanser gelişimine ve kanser hücre proliferasyonuna katkıda bulunan anti-apoptotik proteinlerin üretimini uyarabilmektedirler. Aynı zamanda TLR ligandları kanser hücrelerinde TLR ekspresyonlarını arttırmaları ve böylelikle aktive olan kanser hücreleri tümör mikroçevresinin önemli bir komponenti olan sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını başlatırlar. Bu sitokinlerle aktive olan immun sistem hücreleri, tümör immuntoleransına neden olacak daha fazla sitokin salınımına neden olurlar. Bu yeni salınan sitokinler aynı zamanda pro-anjiyogenik faktörlerin ve büyüme faktörlerinin salınımını başlatarak tümör progresyonuna da katkıda bulunurlar (Sato vd 2009).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, meme, kolorektal, melanoma, akciğer, prostat, glioma, pankreas, karaciğer ve özofagal kanserlerinde farklı TLR'lerinin ekspresyonlarında artışlar rapor edilmiştir. Meme kanser hücrelerinde TLR3 ekspresyonunun artarken, mononükleer tümörü infiltre eden hücrelerde (MIC) TLR4 ve stromal fibroblastlarda TLR9 ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir (Ridnour vd 2013). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda farklı kanser türlerinde farklı TLR'lerin eksprese oldukları belirlenmiştir (Tablo 2.9).

Genel olarak özetleyecek olursak, mikroorganizma-kökenli PAMP'lar ve nekrotik kanser hücre-kökenli DAMP'lar TLR'leri tarafından tanınarak hem immun sistem hücrelerinden ve kanser hücrelerinden TLR ekspresyonuna neden olurlar. Aynı zamanda bazı TLR'lerin aktivasyonu tümör gelişimini desteklerken bir bölümü anti-tümöral aktivite gösterebilmektedir. Örneğin, TLR9 aktivasyonu meme kanser hücrelerinin proliferasyonuna ve aynı zamanda invaziv yeteneğinin artmasına neden olabilirken, nöroblastoma hücrelerinde in vitro ve in vivo hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve hücre ölümünü uyararak etki gösterebilmektedir. TLR ekspresyonunun, tümör gelişimine ve konak immun yanıtına etki eden tümör hücreleri üzerinden modüle



Şekil 2.11 Tümör mikroçevresinde TLR'ler ile tümör progresyonu arasındaki ilişki (Sato, 2009)

edilmesi bu zıtlığı ortaya koymaktadır. Aynı şekilde TLR9 ekspresyonu, baş ve boyun kanserleri ve servikal kanserlerde anti-tumoral özellik gösterirken, meme kanserinde tam zıt etkiye sahiptir (Gautagny vd 2012). Dolayısıyla TLR'lerin kanserde çift yönlü rol oynadıkları karmaşıklığı sözkonusudur ve bu konu hala güncel çalışmaların önemli hedefleri arasında yer almaktadır.

2.4.4. Mesane kanseri tedavisinde TLR'lerin rolü

Tümör mikroçevresinde TLR ekspresyon değişimleri, bu molekülleri sitotoksik yanıtta terapötik hedefler haline getirmiştir. Yapılan birçok çalışmada, TLR agonistlerinin klinik uygulamalarda, tek terapi olarak kullanıldıklarında etki göstermedikleri gözlenmiştir. Ancak TLR agonistleri, radyasyon, kemoterapi ya da konak immunitesinde T hücrelerin aktive olmasına neden olan kanser aşılı ile kombine olarak adjuvan şeklinde kullanıldıklarında çok başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Günümüzde adjuvan veya tek kullanımlık ajanlar olarak terapide kullanılan onaylı TLR agonistleri bulunmaktadır.

Tablo 2. 9 Farkli tipteki kanserlerde aşırı ekspresyonları rapor edilen TLR'ler (Sato 2009)

Kanser Tipi	TLR
Gastrik kanseri	TLR2/4/5/9
Kolorektal kanseri	TLR2/3/4/5/9
Over kanseri	TLR2/3/4/5
Servikal kanseri	TLR3/4/5/9
Akciğer kanseri	TLR2/3/4/9
Prostat kanseri	TLR4/9
Melanoma	TLR2/3/4
Beyin kanseri	TLR2/4
Meme kanseri	TLR2/3/4/9
Hepatoselüler karsinoma	TLR2/3/4/6/9
Larinks kanseri	TLR2/3/4

Son otuz yıldır BCG (TLR2/4 agonisti) ürotelyal karsinoma tedavisinde kullanılmakta ve başarılı sonuçlar vermektedir. Aylık olarak kullanılan BCG'nin beş yıl içinde rekürrensi %64.4 oranında azalttığı ve sağ kalımı %39.4 oranında arttırdığı gösterilmiştir. Rekürrensin önlenmesinde BCG ile intravezikal immunoterdavide 3 farklı TLR (TLR2, TLR4 ve TLR9) agonistlerinin rol oynadığı belirlenmesine karşın son yıllarda bu 3 TLR'nin yanı sıra TLR7 agonistinin de in vitro ve in vivo antitümöral etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Ridnour vd 2013).

Tablo 2.10 Ürotelyal karsinomanda TLR-aracılı immunoterapi için önerilen ligandlar (LaRue vd 2013)

Ligand	TLR'ler	Klinik faz
BCG	TLR2;TLR4;TLR9	Standart kullanılan
BCG CWS (SM-105)	TLR2;TLR4	Preklinik
MCC	TLR9	Faz III
CpG ODN	TLR9	Preklinik
HP-NAP	TLR2	Preklinik
Imiquimod (R-837;TMX-101;TMX-202)	TLR7	Faz II

Kısaltmalar: CWS, hücre duvarı iskeleti; HP-NAP, *Helicobacter pylori* nötrofil aktiveedici protein; MCC, mikobakteriyel hücre duvarı DNA kompleksi; ODN, oligodeoksinükleotitler; TLR, toll-benzeri reseptör

Özetle, son yıllardaki çalışmalarda TLR'lerin tümör hücrelerinde de yüksek oranda eksprese edildikleri, kemoterapiye dirençle ilişkili oldukları ve immun yanıtı kaçıran tümör gelişimini uyardıkları gösterilmiştir. Aynı zamanda, henüz net mekanizmaları tanımlanmamış olmakla birlikte TLR'lerin kanserde zıt yönlü rol oynadıkları da rapor edilmiştir. Tüm bu veriler kanser hücrelerinde TLR aktivasyonunun kompleksliğini ve kamaşıklığını açıkça göstermektedir. Bu tez çalışmasında ürotelyal karsinomlu olguların kanserli olmayan olgulara göre farklı TLR ekspresyonlarına sahip oldukları ve bu ekspresyon profillerinin ürotelyal karsinomanın patogenezinde rol oynayabileceği hipotezinden yola çıkarak, ürotelyal karsinomlu olan (yeni tanı alan) ve olmayan olgulardan alınan mesane doku örnekleri ve idrar örneklerinde TLR1-10 olmak üzere 10 farklı TLR'lerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon profilleri belirlemeyi ve bu ekspresyon düzeylerinin tümörün grade ve evresi başta olmak üzere olgulara ait patolojik verilerle olan olası ilişkilerini belirlemeyi amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Çalışma grubu

Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniği'ne 2012-2014 tarihleri arasında başvuran ve ilk kez primer ürotelyal karsinoma tanısı alan 24 hasta dahil edildi. Bu hastalardan transüretal rezeksiyon (TUR)'la elde edilen taze tümör doku örnekleri, hücrel RNA'nın stabilize edilmesi ve korunması amacıyla RNAlater solusyonuna (Life Tech., USA) aktarıldı ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı. TUR materyalleri TLR'lerinin ekspresyon analizleri amacı ile değerlendirildi. Aynı zamanda, TUR materyalleri rutin olarak, olgulara ait patolojik grade ve evrelerinin belirlenmesi amacı ile PAÜ Tıp Fakültesi Patoloji AD'na gönderildi. Bu rutin analiz dışında, çalışmada patolojik analiz açısından herhangi bir ek tetkik yapılmadı.

Çalışmada primer ürotelyal karsinoma olgularının yanı sıra kontrol grubu olarak kanser dışındaki diğer nedenlerden (mesane taşı vb.) PAÜ Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniği'ne başvuran 46 olguya ait non-tümöral mesane doku örnekleri alındı. Taze doku örnekleri RNAlater solusyonuna aktarıldı ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı. Kontrol grubuna ait doku örnekleri TLR'lerinin ekspresyon analizleri amacı ile değerlendirildi. Analiz öncesinde, bu olgulara ait doku örneklerinin patolojik analiz raporları incelendi ve tümör dokusu içermedikleri ve inflamasyonun olmadığı teyit edildi.

Çalışmada olgu ve kontrol grubunu oluşturan hastalardan ayrıca doku materyallerinin alınmasından hemen önce 10 ml idrar örnekleri alındı ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı. Alınan idrar örnekleri TLR ekspresyonları açısından doku örnekleri ile karşılaştırma yapmak ve pro-inflamatuar sitokinlerin konsantrasyonlarını belirlemek amacı ile kullanıldı.

Olgulara ait klinikopatolojik bilgiler Üroloji ve Patoloji Anabilim Dalı hasta dosyalarından elde edildi.

Bu çalışma için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Komisyonundan onay alındı (25.09.2012 tarihli 2012/04 sayılı kurul toplantısı).

3.2. Doku ve İdrar örneklerinden Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

3.2.1.Total RNA izolasyonu

Çalışmaya dahil edilen olgu ve kontrol grubuna ait mesane doku örneklerinden ve idrar örneklerinden total RNA izolasyonu ticari kit (Pure link RNA Mini kit, Cat No 12183018A, Ambion) yardımı ile yapıldı. İdrar örnekleri önce 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, süpernatant kısmı pro-inflamatuar sitokin konsantrasyonunu belirlemek amacı ile -20°C'de saklanırken, pelet kısmı da *TLR* gen ekspresyon analizleri için ayrıldı. Pelete RNAlater solüsyonu eklendi ve total RNA izolasyonuna kadar -80°C'de saklandı.

Total RNA izolasyonu için uygulanan protokolde temel basamaklar aşağıda verildi:

- 1- Doku örnekleri (her biri en fazla 30 mg) kitle birlikte sağlanan 1000 µl "Lizis tamponunda (β-merkaptoetanol eklenmiş)" homojenizatör (Heidolph RZR 2021, Almanya) yardımı ile maksimum hızda 90-120 sn lize edildi ve steril RNaz-içermeyen 1.5 mL'lik tüplere aktarıldı.
- 2- Tüplerdeki bu homojenat 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant mikropipet yardımı ile alınarak yeni steril tüplere aktarıldı.
- 3- Bu tüplere toplam hacimleri kadar %70'lik etanol (Merck) ilave edildi ve mikropipet yardımı ile homojenize edildi.
- 4- Bu karışımlardan 700 µl alındı ve kitle birlikte sağlanan 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş olan spin kolonlara aktarıldı ve 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpleri uzaklaştırıldı.
- 5- Spin kolonlara kitle birlikte sağlanan Yıkama Tamponu 1'den 700 µl ilave edildi ve 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi.
- 6- Spin kolonlara kitle birlikte sağlanan Yıkama Tamponu 2'den 500 µl ilave edildi ve 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi.
- 7- Her bir spin kolon tekrar 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Her bir spin kolon steril, RNaz-içermeyen 1.5 ml'lik tüplere yerleştirildi ve üzerlerine kitle birlikte sağlanan RNaz-içermeyen sudan 35 µl eklendi. 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- 8- Elde edilen total RNA örnekleri, aynı gün cDNA sentezinde kullanıldı.

3.2.2. Total RNA örneklerinin konsantrasyonlarının ve saflık derecelerinin belirlenmesi

Olgu ve kontrol grubuna ait mesane doku örnekleri ve idrar örneklerinden izole edilen total RNA örneklerinin cDNA sentezi öncesi konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrik yöntemle (NanoDrop, Thermo Sci., USA) belirlendi. Aynı zamanda izole edilen örneklerde RNA bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

3.2.3. Total RNA örneklerinden cDNA sentezi

İzole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi, ticari kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) yardımı ile yapıldı. cDNA sentezi için uygulanan protokolda temel basamaklar aşağıda verildi:

1. Her örnek için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı:

Komponent	Miktar
Reverse transkriptaz (RT)	1 µl
RT tamponu	2 µl
RT primer karışımı	2 µl
dNTP karışımı	0.8 µl
RNase-free su	Xµl (herbir örnek için ayrı hesaplandı)
Template RNA	X µl (20 µl'lik reaksiyon hacminde 2 µg total RNA olacak şekilde herbir örnek için ayrı hesaplandı)
Toplam hacim	20 µl

2. Hazırlanan reaksiyon karışımı 42°C'de 15 dk inkübe edildi.
3. Reverse transkriptazı inaktive etmek için, örnekler 95°C'de 3 dk inkübe edildi.
4. Bu aşamaların sonunda 20 µl miktarında cDNA elde edildi.
5. Örnekler, gerçek-zamanlı PCR ile analiz edilmek üzere -20°C'de saklandı.

3.3. Gerçek-zamanlı PCR

TLR1-TLR10 (hedef genler) ve *β-aktin* (referans gen) için relatif kantitasyon analizi, gerçek-zamanlı PCR sistemi (LightCycler 480 Gerçek-zamanlı PCR Sistemi, Roche Diagnostics) kullanılarak yapıldı. Hedef genlerin ve referans genin mRNA düzeyinde ekspresyon analizi için kullanılan primer ve prob setleri "Universal Probe Library

(UPL)"den (Roche) seçildi. Gerçek-zamanlı PCR analizinde kullanılan bu setlere ait diziler ve UPL numaraları Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1 *TLR1-10* ve *β-aktin* mRNA ekspresyon analizlerinde kullanılan özgün primer dizilimleri (5'→3') ve UPL numaraları

TLR1

Primer seti	CCTAGCAGTTATCACAAGCTCAAA (Forward)
	CCTTGGGCCATTCCAAATA (Reverse)
UPL numarası	Probe no: #79 (04689020001)

TLR2

Primer seti	GGCCAGCAAATTACCTGTGTG (Forward)
	AGGATCAGCAGGAACAGAGC (Reverse)
UPL numarası	Probe no: #56 (04688538001)

TLR3

Primer seti	GTGGCCCTTAAAAATGTGGA (Forward)
	GTGTTTCCAGAGCCGTGCTAA (Reverse)
UPL numarası	Probe no: #151 (04694376001)

TLR4

Primer seti	TCATTGTCCTGCAGAAGGTG (Forward)
	TCC CAC TCC AGG TAA GTG TT (Reverse)
UPL numarası	Probe no: #62 (04688619001)

TLR5

Primer seti	TGAGGGACTTTCTCATCTTCAAGT(Forward)
	CCTTAATGCAGTCAGATGGCTA (Reverse)
UPL numarası	Probe no: #151 (04694376001)

TLR6

Primer seti	TTTGGATTTATCTCATAATCAGTTGC(Forward)
	GATCTAAATGCCTGAAACTCACAA(Reverse)
UPL numarası	Probe no: #121 (04693558001)

TLR7

Primer seti GTCTAAAGAACCTGGAACTTTGG(Forward)
TCTCAGGGACAGTGGTCAGTT (Reverse)

UPL numarası Probe no: #102 (04692209001)

TLR8

Primer seti CAGAATAGCAGGCGTAACACATCA(Forward)
TGTTGTCATCATCATTCCACAA (Reverse)

UPL numarası Probe no: #59 (04688562001)

TLR9

Primer seti CTGGGACCTCTGGTACTGCT(Forward)
CTGCGTTTTGTCTGAAGACCA (Reverse)

UPL numarası Probe no: #98 (04692152001)

TLR10

Primer seti TGTCACCATTGTGGTTATTATGC(Forward)
GCAGATCAAAGTGGAGACAGC(Reverse)

UPL numarası Probe no: #76 (04688996001)

 β -aktin

Primer seti ATTGGCAATGAGCGGTTC(Forward)
CGTGGATGCCACAGGACT(Reverse)

UPL numarası Probe no: #11 (04685105001)

TLR1-10 genlerinin mRNA düzeyinde relatif ekspresyonlarını analiz etmek için, her bir hedef gen için optimize edilen gerçek-zamanlı PCR karışımı ve protokolü uygulandı (Tablo 3.2 ve Tablo 3.3). Her bir hedef gene ait PCR protokolü aynı zamanda referans gen için de uygulandı. Her bir örnek için gerçek-zamanlı PCR analizleri 2 farklı reaksiyonda 3 kez tekrar edildi ve floresan değeri olarak 3 analizin ortalaması alındı. Şekil 1'de çalışmada kullanılan örneklere ait bir pleyt örneği verilmiştir.

Tablo 3.2 *TLR1-10* ve *β -aktin* genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı

Komponent	Miktar
Master karışımı (5X)*	4 μ l
Primer-Probe karışımı (single assay)	1 μ l
PCR-grade su	13 μ l
cDNA örneği	2 μ l

*:Master karışımı olarak, "Hot FirePol probe qPCR mix plus (Solis Biodyne)" kiti kullanıldı.

Tablo 3.3 *TLR1-10* ve *β -aktin* genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü*

Analiz Modu	Döngü	Segment	Isı	Süre	Isı artışı	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon	1		95°C	10 dk	4.4	-
		Denatürasyon	95°C	10 sn	4.4	-
Amplifikasyon	55	Annealing	60°C	30 sn	2.2	-
		Ekstensiyon	72°C	1 sn	4.4	Tek okuma
Soğutma	1		40°C	30 sn	2.2	

*: Gerçek-zamanlı PCR Protokolü; Pre-inkübasyon: Enzim aktivasyonu ve kalıp cDNA'nın denatürasyonu, Amplifikasyon: Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması ve özgün probler yardımı ile ürünün belirlenmesi, Soğutma: Sistemde yer alan rotorun soğutulması basamaklarını içermektedir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TLR1 örn 1	TLR2 örn 1	TLR3 örn 1	TLR4 örn 1	TLR5 örn 1	TLR6 örn 1	TLR7 örn 1	TLR8 örn 1	TLR9 örn 1	TLR10 örn 1	BACT örn 1	NC örn 1
B	TLR1 örn 2	TLR2 örn 2	TLR3 örn 2	TLR4 örn 2	TLR5 örn 2	TLR6 örn 2	TLR7 örn 2	TLR8 örn 2	TLR9 örn 2	TLR10 örn 2	BACT örn 2	NC örn 2
C	TLR1 örn 3	TLR2 örn 3	TLR3 örn 3	TLR4 örn 3	TLR5 örn 3	TLR6 örn 3	TLR7 örn 3	TLR8 örn 3	TLR9 örn 3	TLR10 örn 3	BACT örn 3	NC örn 3
D	TLR1 örn 4	TLR2 örn 4	TLR3 örn 4	TLR4 örn 4	TLR5 örn 4	TLR6 örn 4	TLR7 örn 4	TLR8 örn 4	TLR9 örn 4	TLR10 örn 4	BACT örn 4	NC örn 4
E	TLR1 örn 5	TLR2 örn 5	TLR3 örn 5	TLR4 örn 5	TLR5 örn 5	TLR6 örn 5	TLR7 örn 5	TLR8 örn 5	TLR9 örn 5	TLR10 örn 5	BACT örn 5	NC örn 5
F	TLR1 örn 6	TLR2 örn 6	TLR3 örn 6	TLR4 örn 6	TLR5 örn 6	TLR6 örn 6	TLR7 örn 6	TLR8 örn 6	TLR9 örn 6	TLR10 örn 6	BACT örn 6	NC örn 6
G	TLR1 örn 7	TLR2 örn 7	TLR3 örn 7	TLR4 örn 7	TLR5 örn 7	TLR6 örn 7	TLR7 örn 7	TLR8 örn 7	TLR9 örn 7	TLR10 örn 7	BACT örn 7	NC örn 7
H	TLR1 örn 8	TLR2 örn 8	TLR3 örn 8	TLR4 örn 8	TLR5 örn 8	TLR6 örn 8	TLR7 örn 8	TLR8 örn 8	TLR9 örn 8	TLR10 örn 8	BACT örn 8	NC örn 8

Şekil 3.1 Hedef genlerin mRNA ekspresyonlarının kantitatif analizlerinde kullanılan bir pleyt örneği (Kırmızı: 8 adet doku örneğine ait TLR1 hedef geni için reaksiyon karışımı, Mavi: 8 adet doku örneğine ait TLR2 hedef geni için reaksiyon karışımı, Yeşil: 8 adet doku örneğine ait TLR3 hedef geni için reaksiyon karışımı, Mor: 8 adet doku örneğine ait TLR4 hedef geni için reaksiyon karışımı, Pembe: 8 adet doku örneğine ait TLR5 hedef geni için reaksiyon karışımı, Gri: 8 adet doku örneğine ait TLR6 hedef geni için reaksiyon karışımı, Açık Yeşil: 8 adet doku örneğine ait TLR7 hedef geni için reaksiyon karışımı, Koyu Yeşil: 8 adet doku örneğine ait TLR8 hedef geni için reaksiyon karışımı, Turkuaz: 8 adet doku örneğine ait TLR9 hedef geni için reaksiyon karışımı, Kahverengi: 8 adet doku örneğine ait TLR10 hedef geni için reaksiyon karışımı BACT: β - aktin referans geni, NTC: Negatif template kontrol (cDNA örneği yerine PCR-grade su kullanıldı)).

Optimize edilen protokollerle örneklerin gerçek-zamanlı PCR aşamaları tamamlandı ve “relatif kantitatif” olarak örneklerin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Bu amaçla, her bir örneğin hedef gene ait mRNA ekspresyon düzeyi, aynı örneğin referans gen olan β -aktin (aynı zamanda, relatif kantitasyonda eksternal standart) ekspresyon düzeyi gerçek-zamanlı PCR sisteminde varolan yazılım programı (LightCycler Relatif Kantitasyon Yazılım Programı) kullanılarak hesaplandı ve relatif olarak kantite edildi. Eksternal standart, gerçek-zamanlı PCR ile kantitasyon sırasında hedef ve referans cDNA miktarları arasındaki farklılığı, örnek yüklemedeki varyasyonları ve PCR inhibitörlerinin etkisini dengelemede yardımcı olması amacı ile seçildi.

3.4. Pro-inflamatuvar Sitokinlerin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen olgu ve kontrol grubunu oluşturan bireylerden alınan idrar örneklerinden pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-1 β , IL-6 ve IL-8 konsantrasyonları ticari kitler (Boster, Immunoleader) kullanılarak ELISA ile belirlendi. Her bir sitokin için kullanılan standartlar Tablo 3.4'de özetlendi.

Tablo 3.4 Pro-inflamatuvar sitokinlerin konsantrasyonlarını belirlemede kullanılan standartlara ait konsantrasyon değerleri

Sitokin	Konsantrasyon (pg/ml)							
IL-1 β	0.0	3.9	7.8	15.6	31.2	62.5	125	250
IL-8	0.0	15.6	31.2	62.5	125	250	500	1000
IL-6	0.0	4.69	9.38	18.75	37.5	75	150	300

IL-1 β , IL-6 ve IL-8 konsantrasyonlarını belirlemek için uygulanan protokolde temel basamaklar aşağıda verildi:

- 1- 100 μ L olacak şekilde standart solüsyonlar ve idrar örnekleri 96 kuyulu mikroplyt'lere dağıtıldı.
- 2- Mikroplyt'in üzeri kapatılarak 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.
- 3- Mikroplyt üzerindeki kapatici çıkartılarak plyt içeriği kurutma kağıdı yardımıyla uzaklaştırıldı.
- 4- Her bir kuyuya 100 μ L biotinli anti-human antikor solüsyonları eklenip 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
- 5- Mikroplyt 0,01M PBS ile üç kez yıkandı.
- 6- Her bir kuyuya taze hazırlanan ABC çalışma solüsyonundan 100 μ L eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 7- Mikroplyt 0,01M PBS ile beş kez yıkandı.
- 8- Her bir kuyuya TMB renk değiştirici solüsyondan 90 μ L eklendi ve plyt karanlıkta 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 9- Her bir kuyuya 100 μ L TMB stop solüsyonu eklendi.
- 10- Örneklerin OD değerleri 450nm'de mikroplyt okuyucu (Architec I1000 SR, Abbott Diagn., USA)'da okutularak kaydedildi.

Her bir sitokine ait olan ve kitle sağlanan standard örnekle rin OD değerleri ile oluşturulan kantitasyon eğrisine göre, idrar örnekle rinde var olan IL-1 β , IL-6 ve IL-8 konsantrasyonları hesaplandı.

3.5. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 20.0 paket programı kullanarak yapıldı. Bütün değerler ortalama \pm standart hata şeklinde verildi. İkili grupların karşılaştırılması için bağımsız t-testi ile klinikopatolojik verilerde ilişkinin gücünü belirlemek için ise Kendall T testi yapıldı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ değer i istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmanın istatistiksel gücü “Post-hoc Statistical Power Calculator for a Student t-Test” (www.danielsoper.com/statcalc3/) kullanılarak belirlendi.

4.BULGULAR

Çalışmada yaklaşık 30 ürotelyal karsinoma olgusunun değerlendirilmesi hedeflenmişti. Ancak tez süresini içeren dört yarıyılık süreçte, Üroloji Polikliniğine 24 adet primer ürotelyal karsinomali olgu başvurduğundan, elde edilen bulguların tartışılabilir yeterlilikte olduklarından emin olmak için çalışmanın istatistiksel gücü hesaplandı ve 0.86 (two-tailed hypothesis) (>0.75) olarak belirlendi. Bunun bir diğer anlamı, %95 güven aralığında bu olgu sayısı istatistiksel açıdan yeterlidir ve elde edilen analiz sonuçları istatistiksel açıdan önemlidir. Bu sonucun elde edilmesinden sonra olgu grubu için örnek alımına devam edilmedi.

4.1. Olgulara Ait Demografik ve Patolojik Parametreler

Bu çalışmada ilk kez primer ürotelyal karsinoma tanısı alan 24 olgu ile tümör-dışı nedenlerle opere edilen ve kontrol grubunu oluşturan 46 olgu değerlendirmeye alındı. Ürotelyal karsinoma olgularında ortalama yaş 64.91 ± 12.36 (45-90) olarak bulundu. Kontrol grubunu oluşturan örneklerinin ortalama yaşı ise 52.21 ± 17.35 (24-81) olarak belirlendi. Ürotelyal karsinoma olgularının 1 (%4.1)'i kadın ve 23 (%95.9)'ü erkek hasta iken kontrol grubunu oluşturan bireylerin 34 (%69.3)'ü kadın ve 15 (%30.7)'i erkek hasta idi. Toplam 24 adet ürotelyal karsinoma olgularının %29.4'ünün çiftçi olduğu (diğer olgular sırası ile memur, kimya fabrika işçisi, nakliyecisi, ev hanımı, marangoz ve fırıncı), %53'ünün sigara kullandığı ve sadece 1 olguda (%5.9) aile öyküsünde ürotelyal karsinoma öyküsünün bulunduğu kaydedildi.

Ürotelyal karsinomali olgular patolojik evre, derece (grade), tümör büyüklüğü ve tümör sayılarına göre gruplandırıldı (Tablo 4.1). Ürotelyal karsinomlu olgulardan sadece 6 (%25)'si düşük-dereceli, diğer olgular 18 (%75) yüksek-dereceli tümöre sahipti. Olgularda lenf nodu tutulumu yoktu. Aynı zamanda pT1 tümöre sahip 16 olgunun 9 (%56.3)'una ait patolojik preparatta kas tabakasının varlığı belirlenmişken, 7 (%43.7)'sinde bu tabaka gözlenmemiştir.

Tablo 4.1 Ürotelyal karsinoma olgularına ait patolojik parametreler

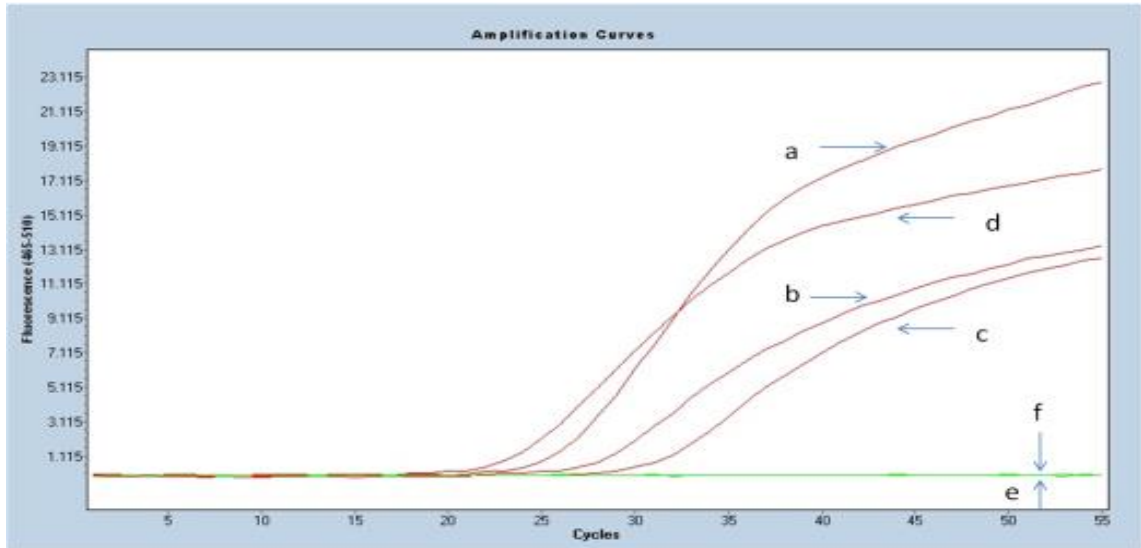
Patolojik parametre	Olgu sayısı (%)
Evre	
pTa	4 (16.6)
pT1	16 (66.6)
pT2a	1 (4.1)
pT2	3 (12.5)
Grade	
Düşük-dereceli	6 (25)
Yüksek-dereceli	18 (75)
Tümör Büyüklüğü	
< 5cm	17 (70.8)
≥ 5 cm	7 (29.2)
Tümör Sayısı*	
Tek	16 (66.7)
2	2 (8.3)
Multiple	6 (25)

* İstatistiksel analizlerde tümör sayısı “tek” ve “2 ve üzeri” olmak üzere 2 grupta değerlendirildi.

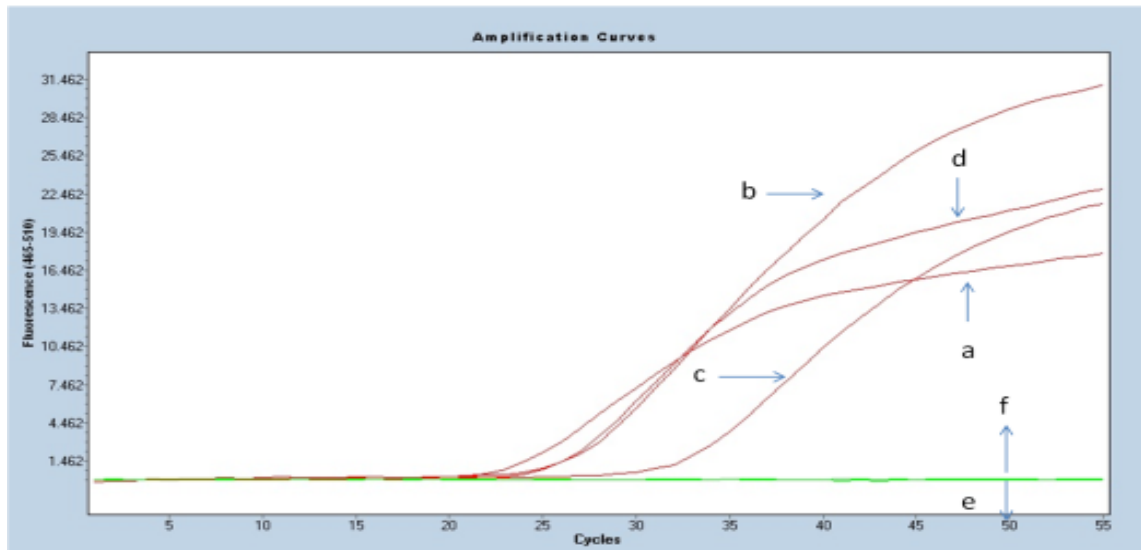
4.2. Olgulara ait *TLR1-10* mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Çalışmaya dahil edilen tüm ürotelyal karsinoma doku örnekleri ve idrar örneklerinden TLR genlerinin ekspresyon düzeyleri için informatif veriler alındı. Gruplara ait mesane doku örnekleri ve idrar örneklerinde *TLR* genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri β -*aktin* geni düzeyine göre relatif olarak belirlendi. Şekil 4.1’de ürotelyal karsinomlu doku örneklerinde relatif kantitasyon sonrası tüm *TLR* genlerinde mRNA düzeyinde ekspresyon artışı belirlenen ve belirlenmeyen olgulara ait amplifikasyon eğrileri örnekleri yer almaktadır. Şekil 4.2 ise ürotelyal karsinomlu olgulardan alınan idrar örneklerindeki amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.

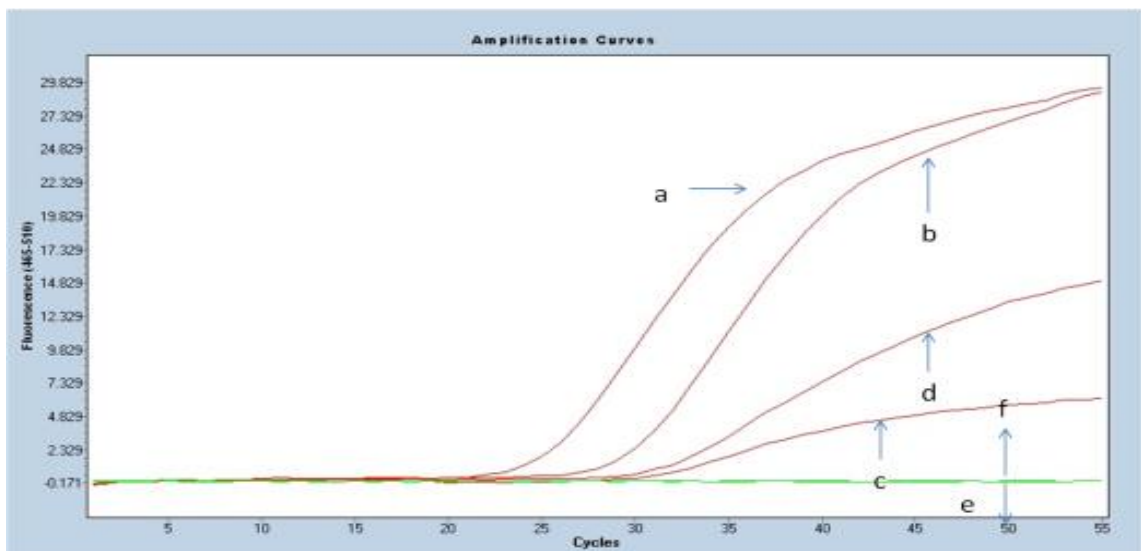
Dokuda TLR1 Amplifikasyon Eğrileri



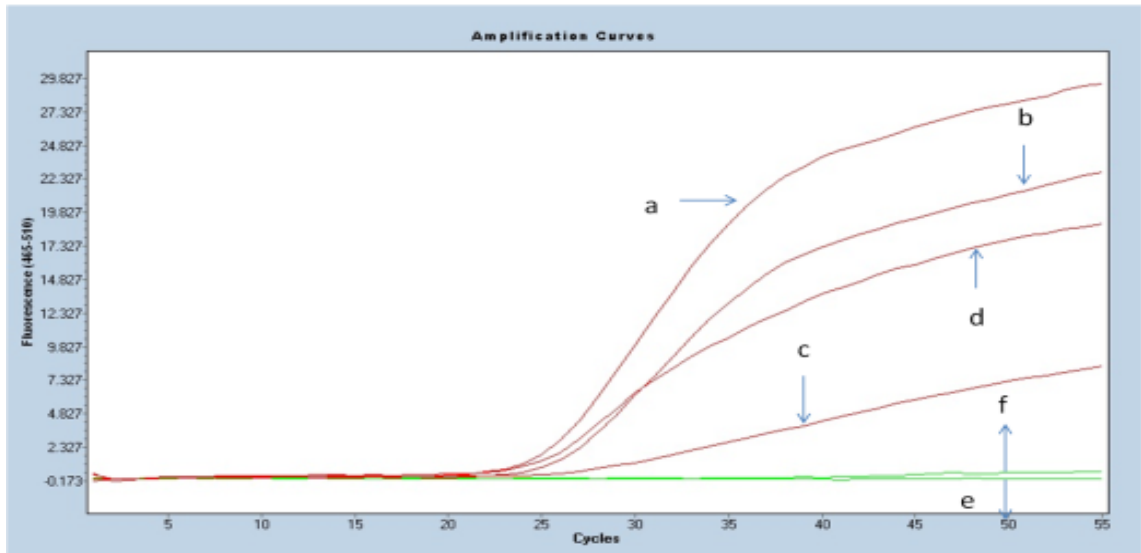
Dokuda TLR 2 Amplifikasyon Eğrileri



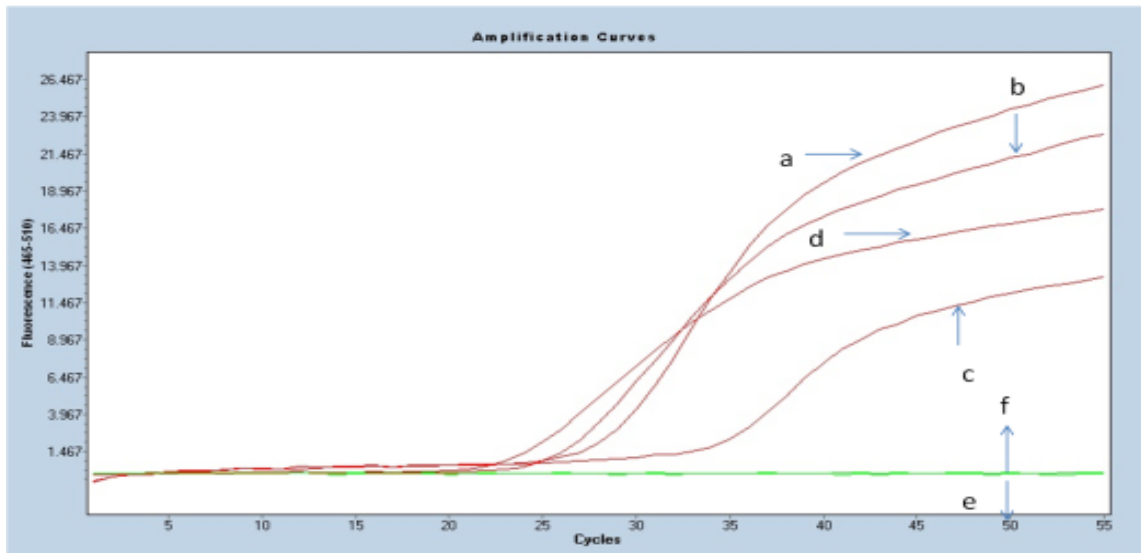
Dokuda TLR 3 Amplifikasyon Eğrileri



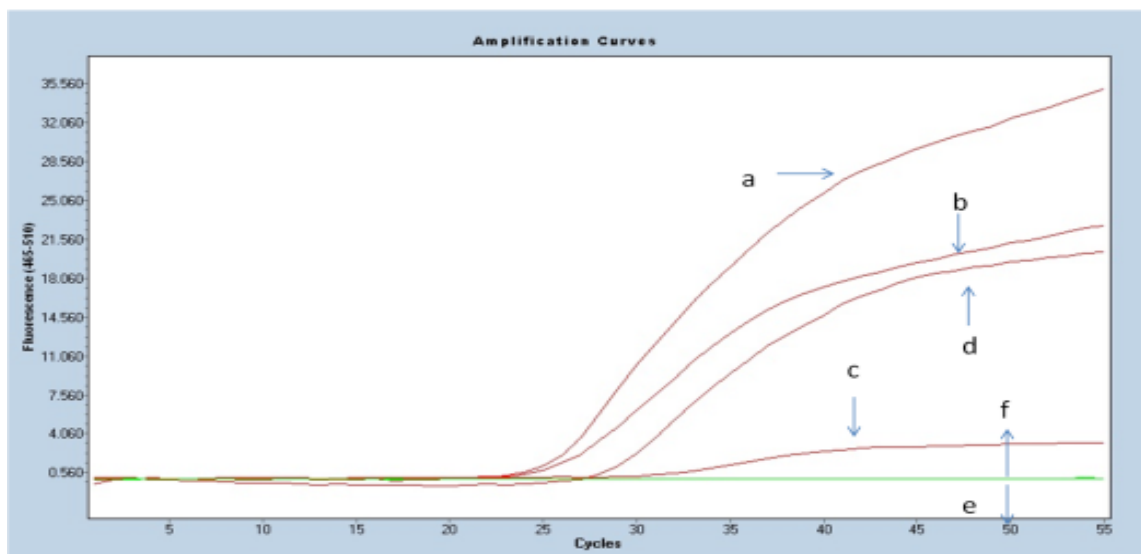
Dokuda TLR 4 Amplifikasyon Eğrileri



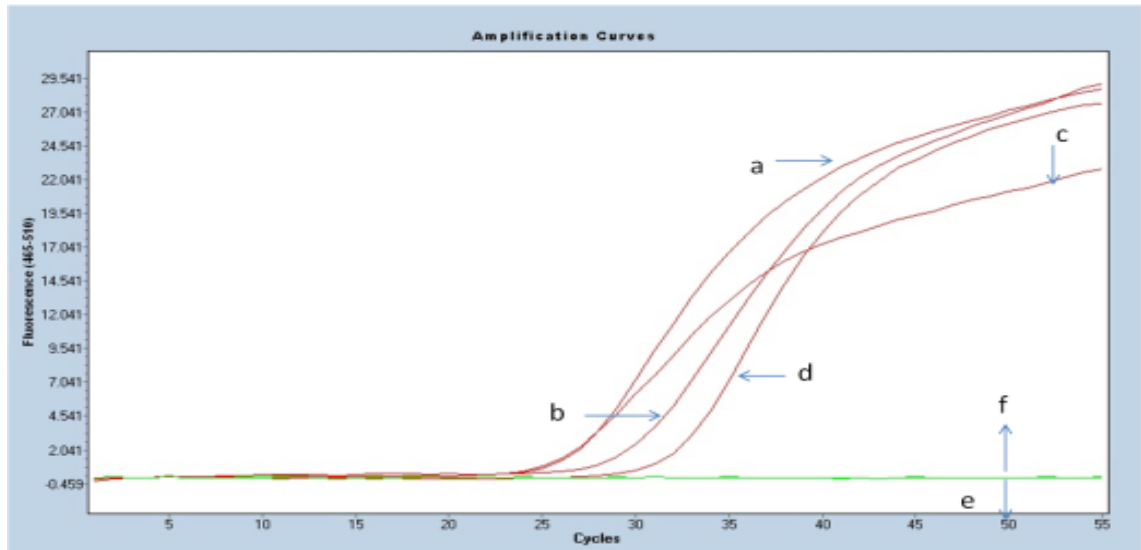
Dokuda TLR 5 Amplifikasyon Eğrileri



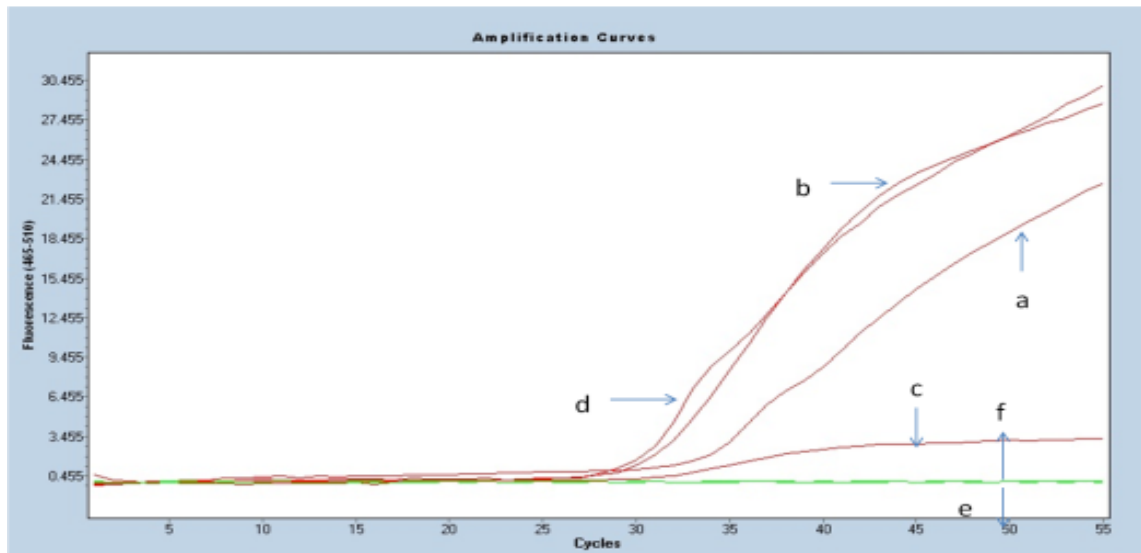
Dokuda TLR 6 Amplifikasyon Eğrileri



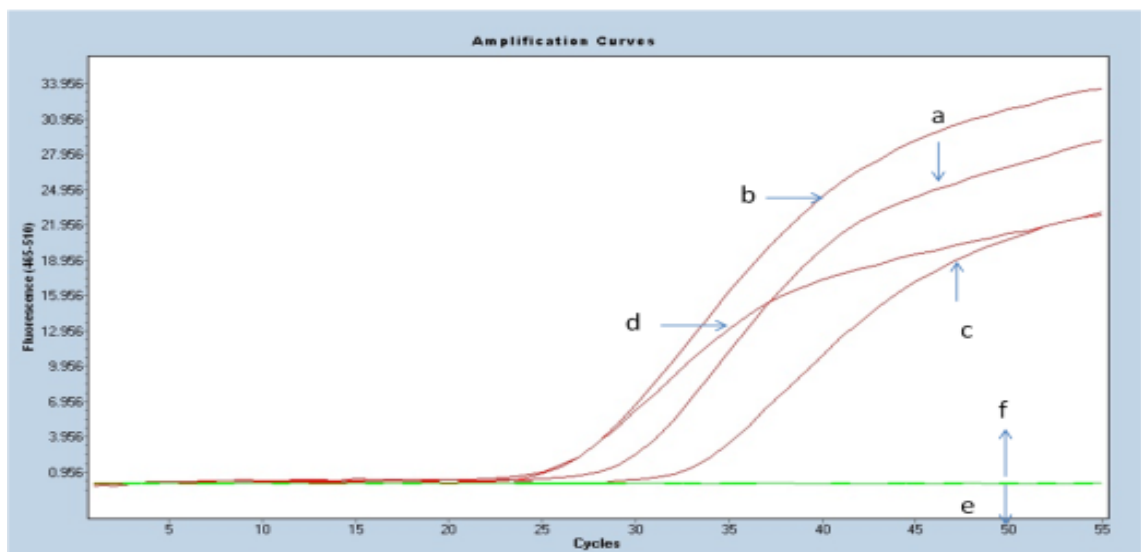
Dokuda TLR 7 Amplifikasyon Eğrileri



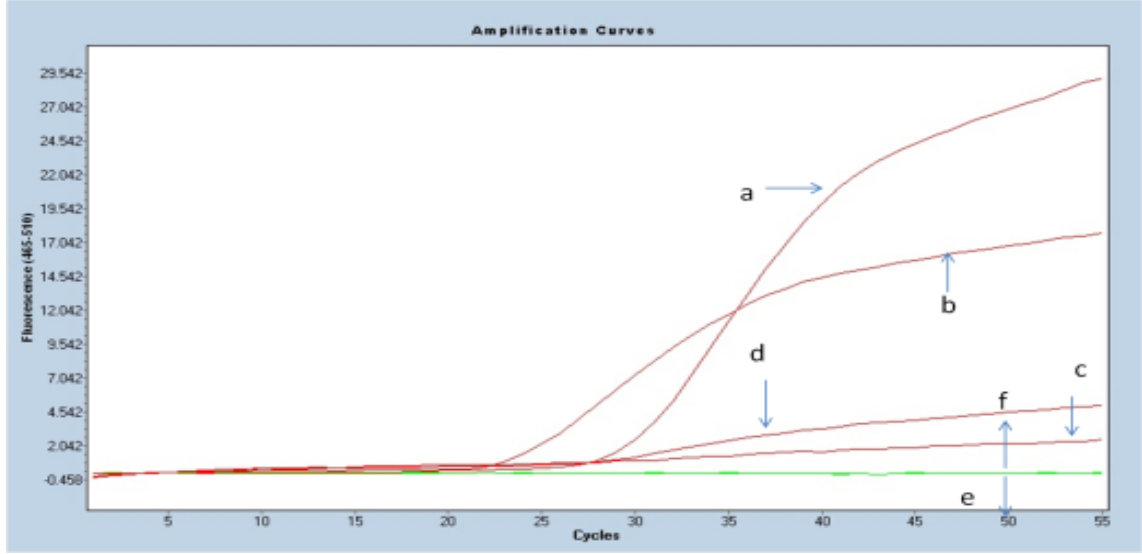
Dokuda TLR 8 Amplifikasyon Eğrileri



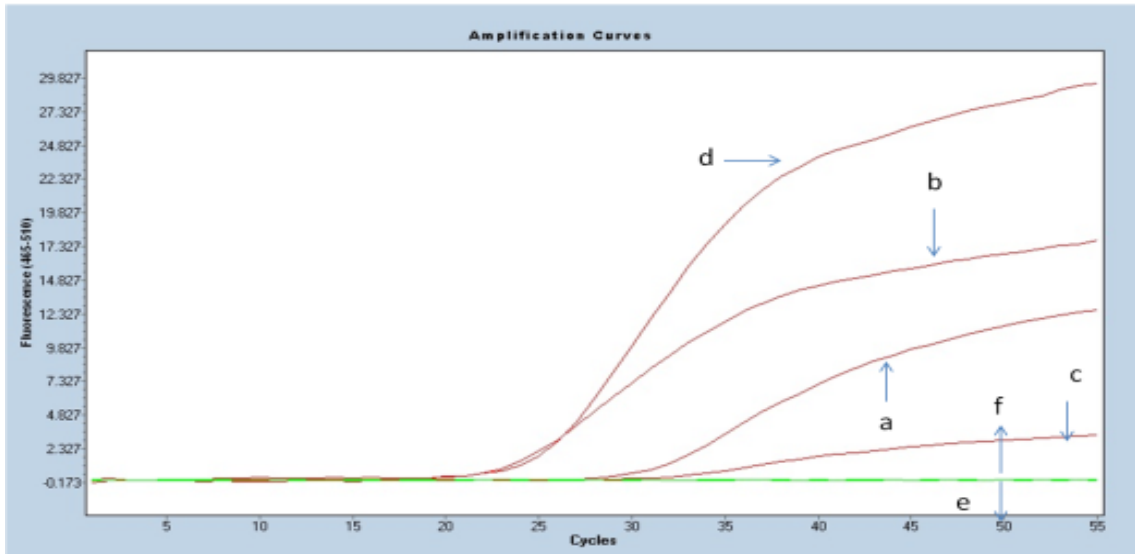
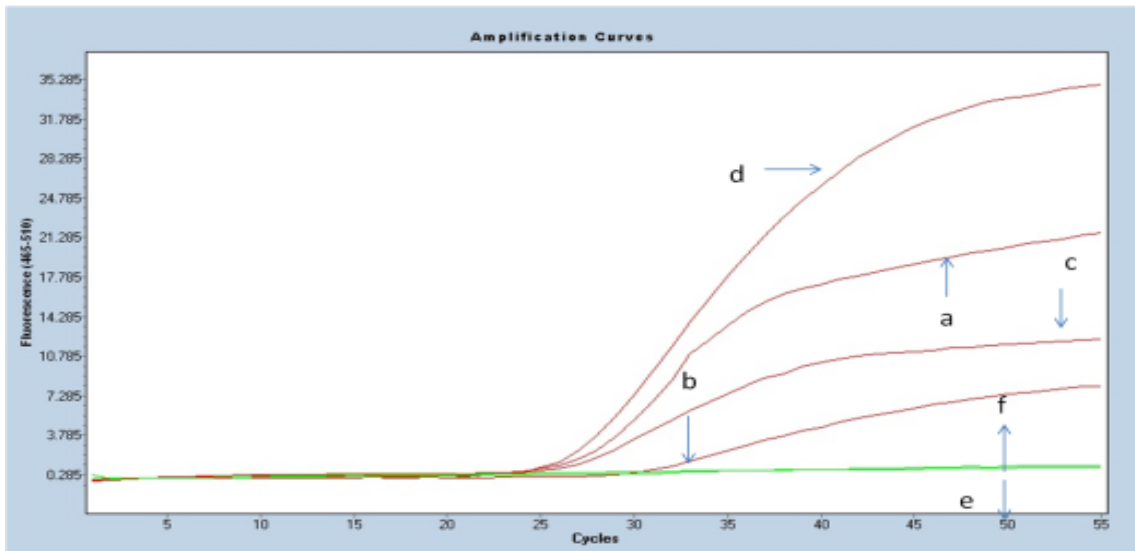
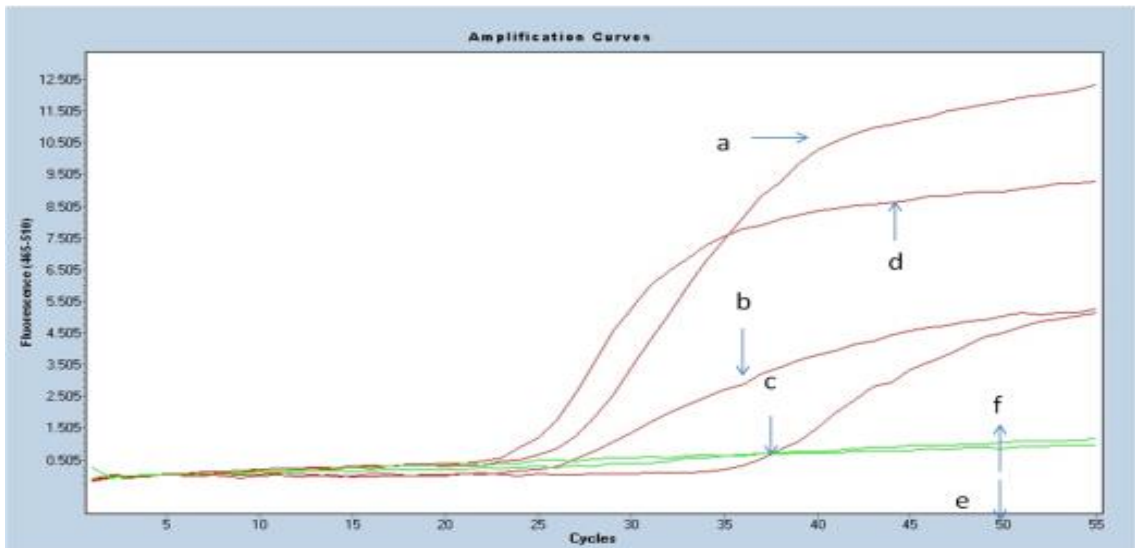
Dokuda TLR 9 Amplifikasyon Eğrileri

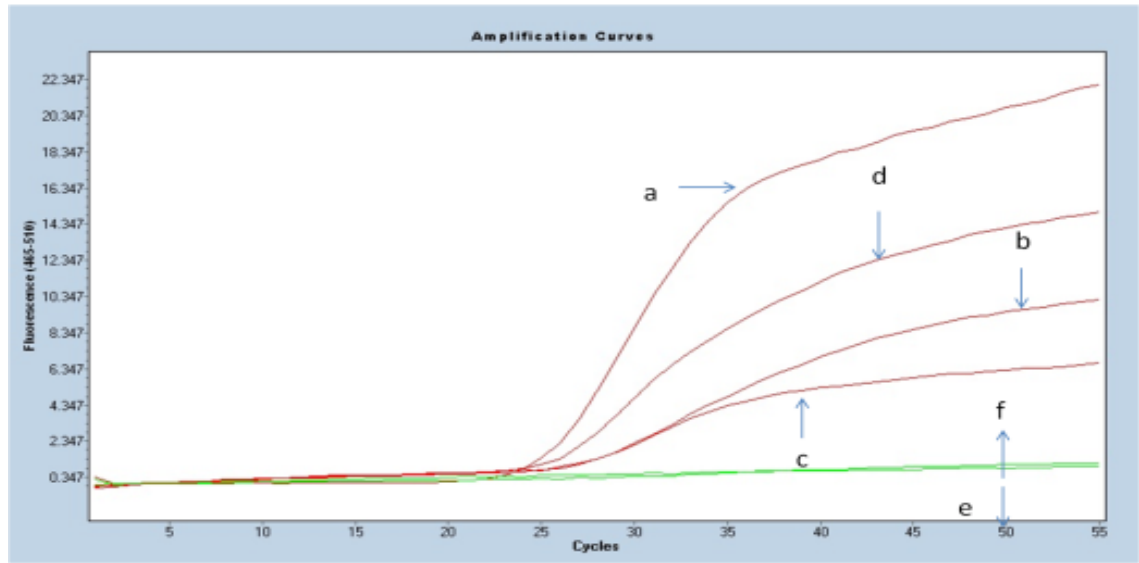
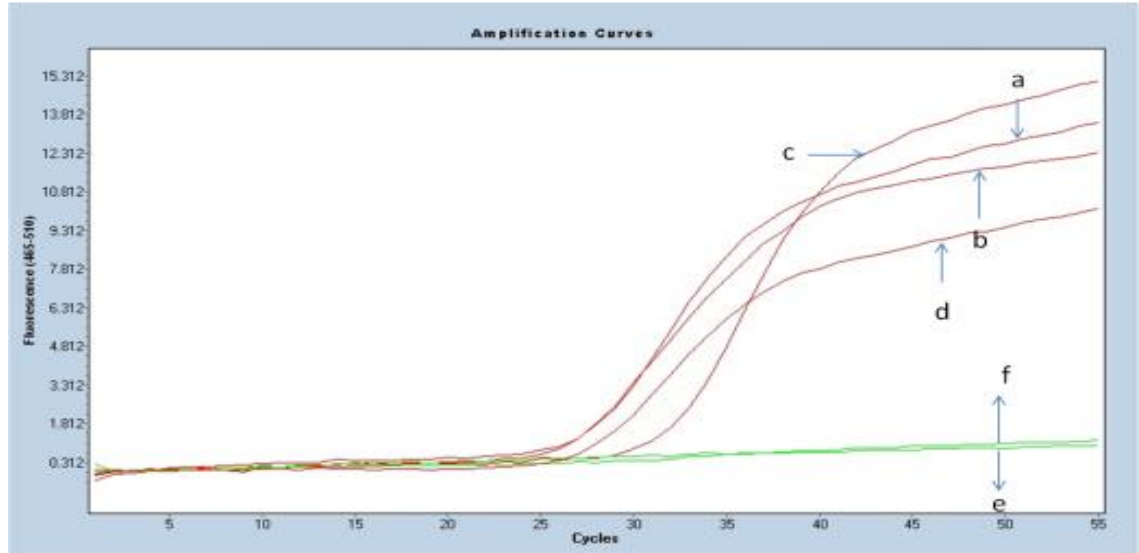
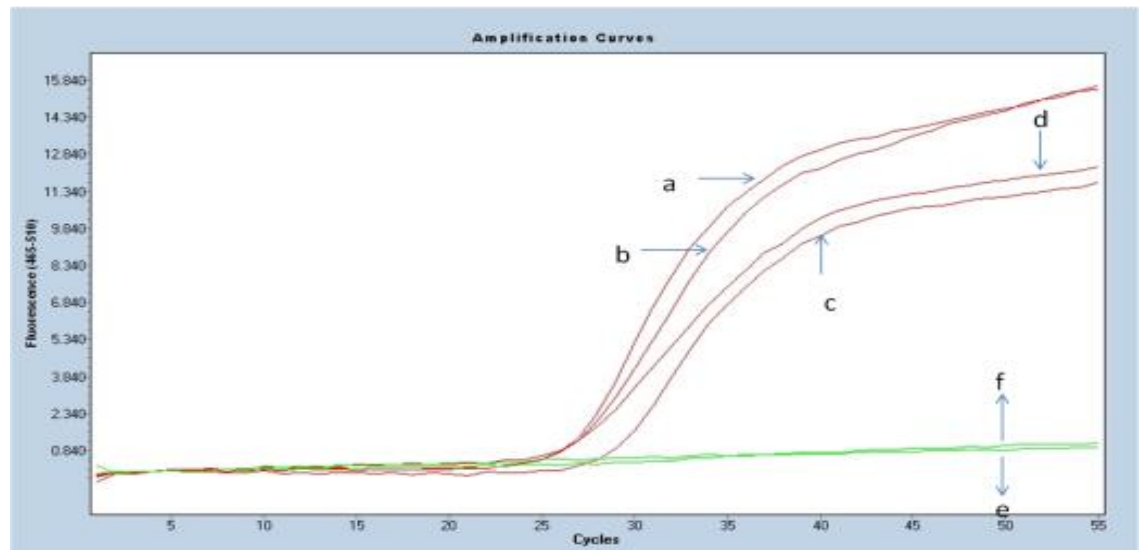


Dokuda *TLR 10* Amplifikasyon Eğrileri

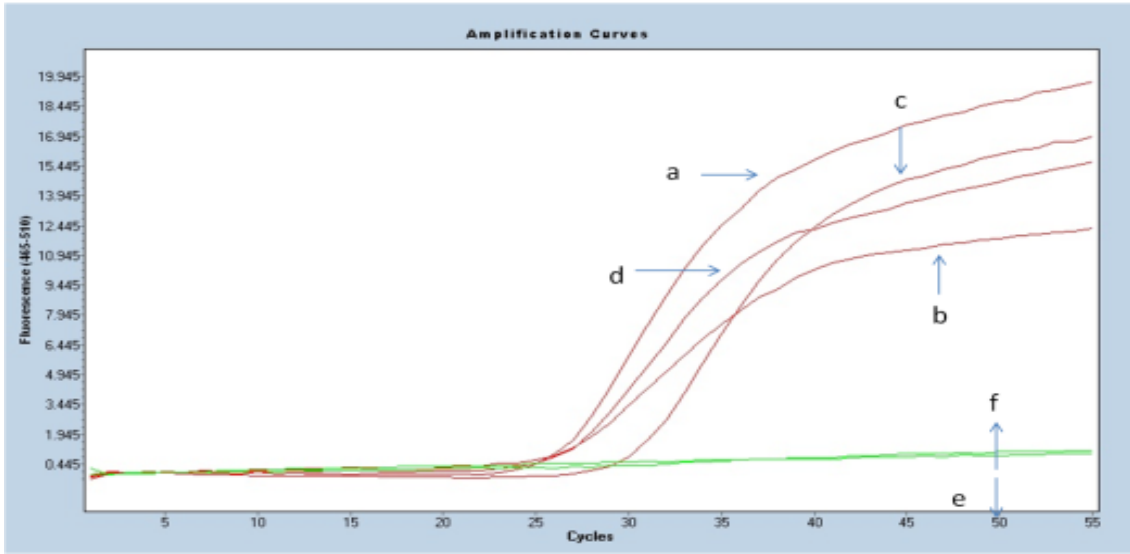


Şekil 4.1 Ürotelyakarsinomlu doku örneklerinde *TLR1-10* ve β -aktine özgün amplifikasyon eğrileri. Herbir grafikte (a) ve (b) sırası ile mRNA düzeyinde ekspresyonu artışı belirlenen olguda hedef gene ve β -aktine ait özgün amplifikasyon eğrilerini, (c) ve (d) sırası ile ekspresyonu artışı belirlenmeyen olguda hedef gene ve β -aktine ait özgün amplifikasyon eğrilerini, (e) ve (f) sırası ile hedef gene ve β -aktine özgün reaksiyona ait negatif kontrol örneklerinin amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.

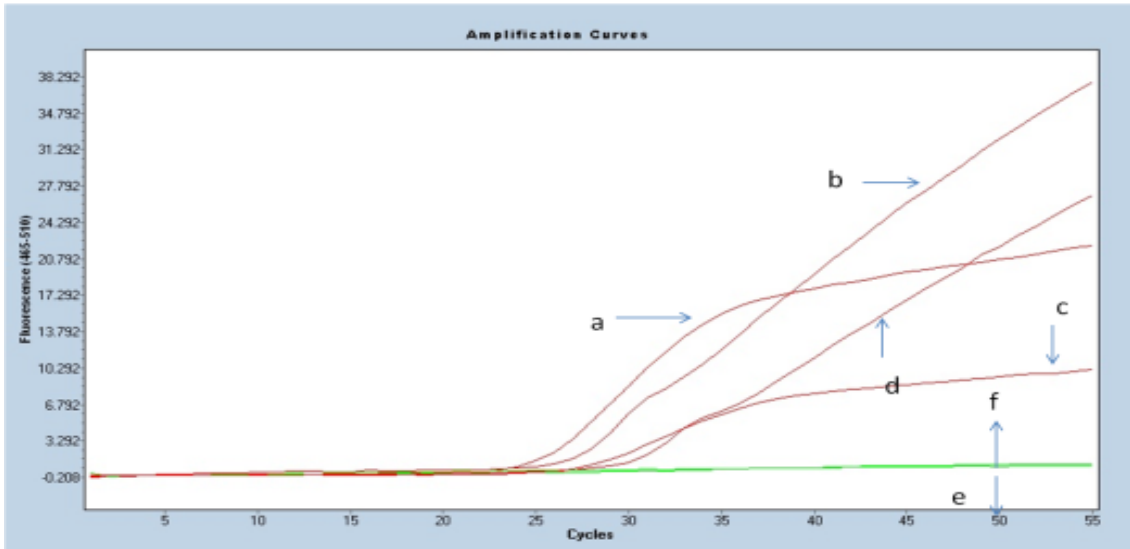
İdrarda *TLR 1* Amplifikasyon Eğrileriİdrarda *TLR 2* Amplifikasyon Eğrileriİdrarda *TLR 3* Amplifikasyon Eğrileri

İdrarda *TLR 4* Amplifikasyon Eğrileriİdrarda *TLR 5* Amplifikasyon Eğrileriİdrarda *TLR 6* Amplifikasyon Eğrileri

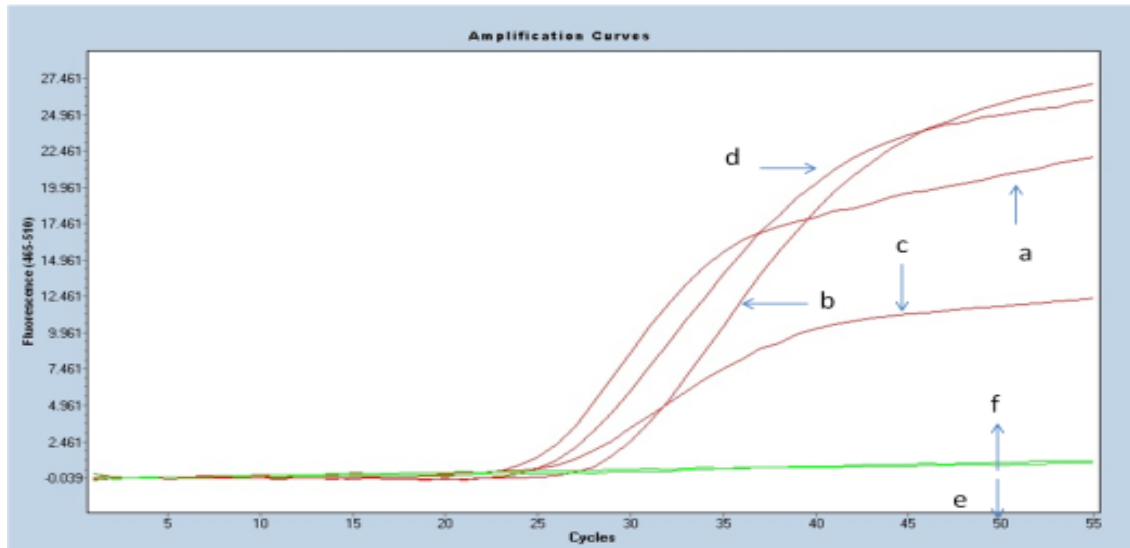
İdrarda TLR 7 Amplifikasyon Eğrileri

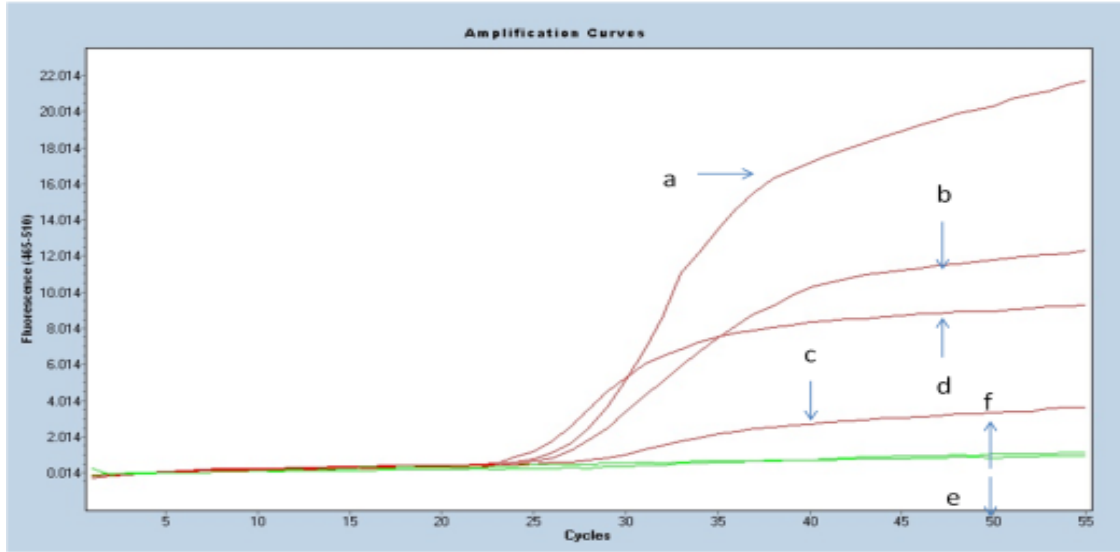


İdrarda TLR 8 Amplifikasyon Eğrileri



İdrarda TLR 9 Amplifikasyon Eğrileri



İdrarda *TLR 10* Amplifikasyon Eğrileri

Şekil 4.2 Ürotelyal karsinomlu idrar örneklerinde *TLR1-10* ve β -aktine özgün amplifikasyon eğrileri. Herbir grafikte (a) ve (b) sırası ile mRNA düzeyinde ekspresyonu artışı belirlenen olguda hedef gene ve β -aktine ait özgün amplifikasyon eğrilerini, (c) ve (d) sırası ile ekspresyonu artışı belirlenmeyen olguda hedef gene ve β -aktine ait özgün amplifikasyon eğrilerini, (e) ve (f) sırası ile hedefgene ve β -aktine özgün reaksiyona ait negatif kontrol örneklerinin amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.

Ürotelyal karsinomlu olgu ve kontrol grubuna ait doku örnekleri ve bu olgulardan alınan idrar örneklerinde TLR ekspresyon düzeyleri sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verildi. Ürotelyal karsinomlu doku örnekleri için, *TLR1* mRNA düzeyinin, olgu grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte arttığı belirlendi ($p=0.214$). İdrar örneklerinde ise *TLR1* mRNA düzeyinin, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte arttığı belirlendi ($p=0.471$).

Ürotelyal karsinomlu doku örnekleri için, *TLR2* mRNA düzeyinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, olgu grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p=0.020$). İdrar örneklerinde ise *TLR2* mRNA düzeyinin, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.000$).

Ürotelyal karsinomlu doku örnekleri için, *TLR3* mRNA düzeyinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, olgu grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p=0.010$). İdrar örneklerinde ise *TLR3* mRNA düzeyinin, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.000$).

Ürotelyal karsinomlu doku örnekleri için, *TLR4* mRNA düzeyinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, olgu grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı

belirlendi ($p=0.009$). İdrar örneklerinde ise *TLR4* mRNA düzeyinin, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.000$).

Ürotelyal karsinomalı doku örnekleri için, *TLR5* mRNA düzeyinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, olgu grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p=0.000$). İdrar örneklerinde ise *TLR5* mRNA düzeyinin, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.000$).

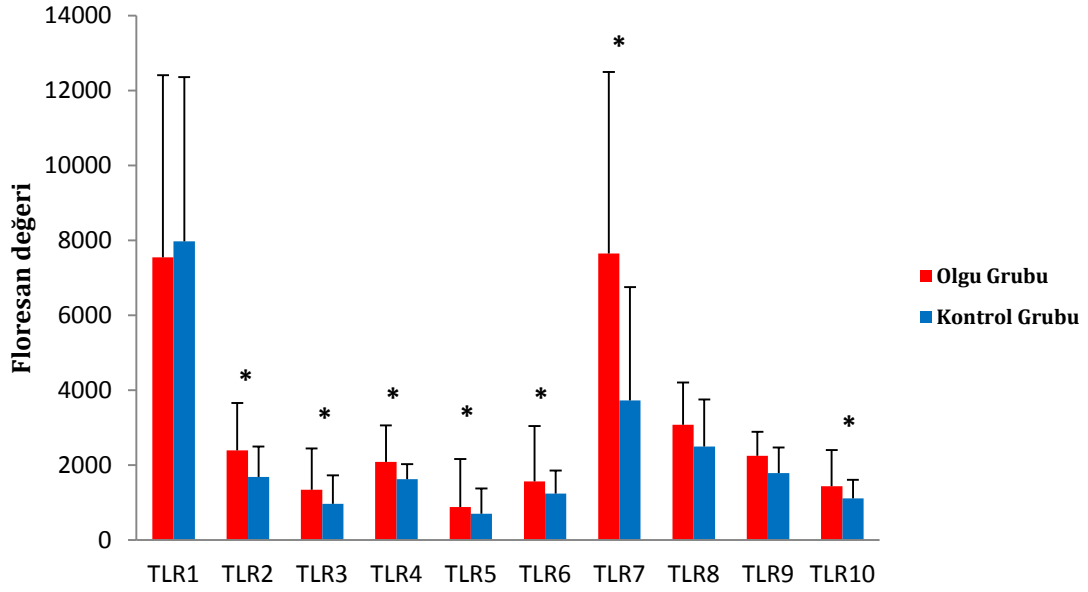
Ürotelyal karsinomalı doku örnekleri için, *TLR6* mRNA düzeyinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, olgu grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p=0.000$). İdrar örneklerinde ise *TLR6* mRNA düzeyinin, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.000$).

Ürotelyal karsinomalı doku örnekleri için, *TLR7* mRNA düzeyinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, olgu grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p=0.001$). İdrar örneklerinde ise *TLR7* mRNA düzeyinin, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.000$).

Ürotelyal karsinomalı doku örnekleri için, *TLR8* mRNA düzeyinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, olgu grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte arttığı belirlendi ($p=0.872$). İdrar örneklerinde ise *TLR8* mRNA düzeyinin, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.000$).

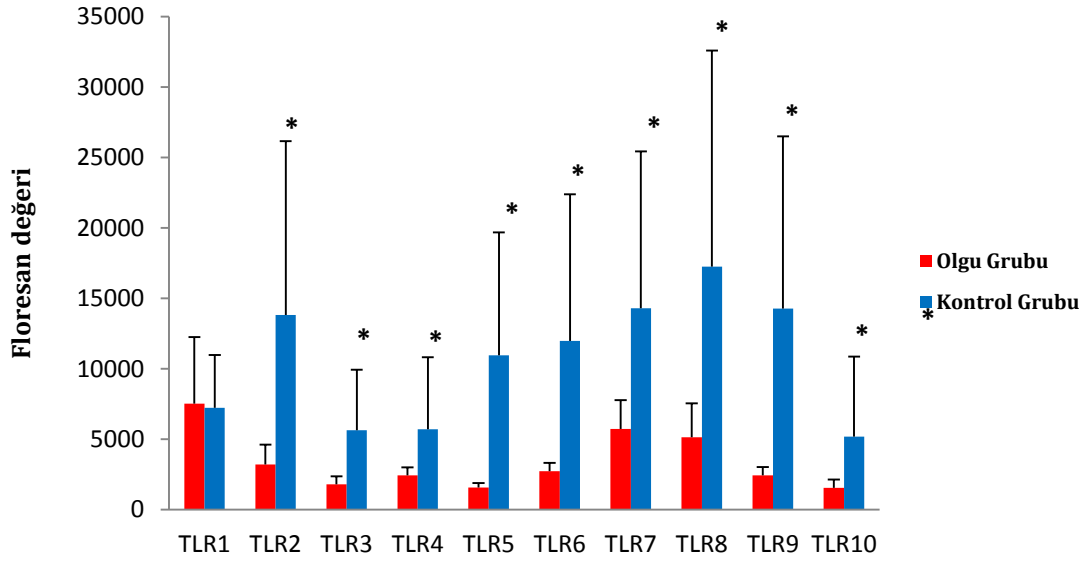
Ürotelyal karsinomalı doku örnekleri için, *TLR9* mRNA düzeyinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, olgu grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte arttığı belirlendi ($p=0.917$). İdrar örneklerinde ise *TLR9* mRNA düzeyinin, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.000$).

Ürotelyal karsinomalı doku örnekleri için, *TLR10* mRNA düzeyinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, olgu grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p=0.012$). İdrar örneklerinde ise *TLR10* mRNA düzeyinin, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.000$).



Şekil 4.3 Olgu ve kontrol grubuna ait mesane doku örneklerinde *TLR* ekspresyonları

*: İstatistiksel olarak anlamlı artışın görüldüğü *TLR*'ler



Şekil 4.4 Olgu ve kontrol grubuna ait idrar örneklerinde *TLR* ekspresyonları

*: İstatistiksel olarak anlamlı artışın görüldüğü *TLR*'ler

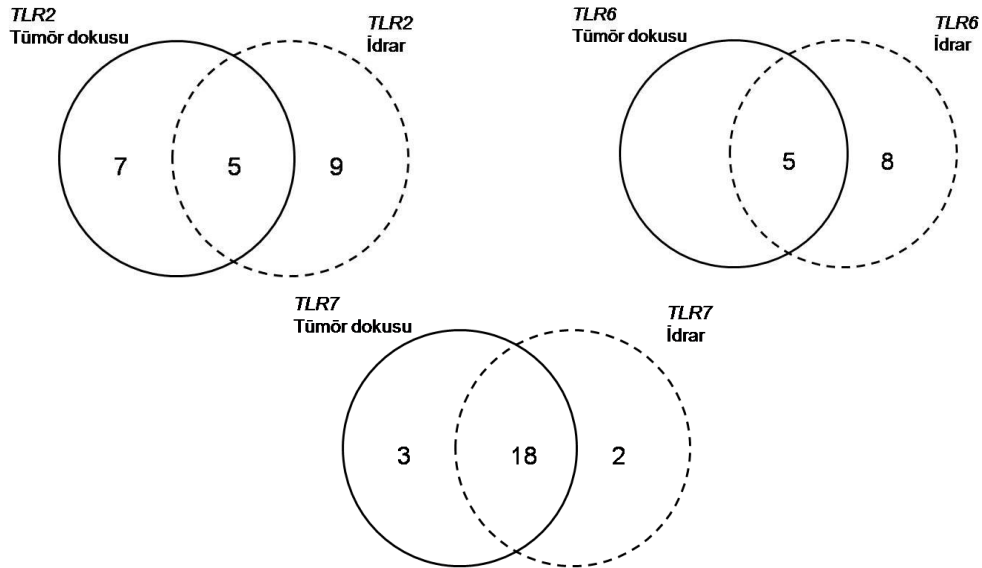
TLR1-10 ekspresyon profilleri (artış/azalış) olgulara ait klinikopatolojik parametrelerle karşılaştırıldı ve sonuçlar Tablo 4.2'de özetlendi. Olgu grubuna ait mesane dokularında *TLR1* mRNA düzeyinin, tümör büyüklüğü ≥ 5 cm olan hastalarda,

5 cm'den küçük olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.001$). Benzer şekilde, olgu grubuna ait mesane dokularında *TLR7* mRNA düzeyinin tümör büyüklüğü ≥ 5 cm olan hastalarda, 5 cm'den küçük olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p=0.043$). Bir başka dikkat çekici bulgu da olgu grubuna ait mesane dokularında *TLR9* mRNA düzeyinin, yüksek-dereceli tümörlerde, düşük-dereceli olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmasıdır ($p=0.057$).

Tablo 4.2 Ürotelyal karsinoma olgularında *TLR1-10* ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik verilerin karşılaştırması

Evre	Olgu Sayısı	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10
pTa	4	4 (%100)	2 (%50)	0 (%0)	1 (%25)	0 (%0)	0 (%0)	3 (%75)	1 (%25)	3 (%75)	1 (%25)
pT1	16	11 (%68)	11 (%68)	3 (%18)	0 (%0)	4 (%25)	4 (%25)	14 (%87)	10 (%62)	8 (%50)	4 (%25)
pT2	3	3 (%100)	2 (%66)	2 (%66)	1 (%33)	0 (%0)	1 (%33)	3 (%100)	1 (%33)	0 (%0)	0 (%0)
pT2a	1	1 (%100)	1 (%100)	1 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%100)	1 (%100)	1 (%100)	0 (%0)
p değeri		<i>0.271</i>	<i>0.580</i>	<i>0.602</i>	<i>0.705</i>	<i>0.337</i>	<i>0.826</i>	<i>0.787</i>	<i>0.717</i>	<i>0.580</i>	<i>0.271</i>
Grade											
Düşük- dereceli	6	5 (%83)	3 (%50)	0 (%16)	1 (%16)	0 (%16)	1 (%16)	6 (%100)	3 (%50)	0 (%0)	1 (%16)
Yüksek- dereceli	18	14 (%77)	13 (%72)	4 (%22)	4 (%22)	4 (%22)	4 (%22)	15 (%83)	10 (%55)	11 (%61)	4 (%22)
p değeri		<i>0.207</i>	<i>0.899</i>	<i>0.271</i>	<i>0.487</i>	<i>0.271</i>	<i>0.960</i>	<i>0.757</i>	<i>0.360</i>	<i>0.057</i>	<i>0.960</i>
Tümör Sayısı											
1	18	14 (%77)	10 (%55)	3 (%16)	2 (%11)	3 (%16)	4 (%22)	16 (%88)	7 (%38)	6 (%33)	3 (%16)
>2	6	5 (%83)	6 (%100)	1 (%16)	3 (%50)	1 (%16)	1 (%16)	5 (%83)	6 (%100)	5 (%83)	2 (%33)
p değeri		<i>0.164</i>	<i>1.000</i>	<i>0.705</i>	<i>0.764</i>	<i>0.448</i>	<i>0.487</i>	<i>0.394</i>	<i>0.252</i>	<i>0.08</i>	<i>0.728</i>
Tümör Büyüklüğü											
<5	16	16 (%100)	13 (%81)	3 (%18)	3 (%18)	2 (%12)	4 (%25)	14 (%87)	11 (%68)	9 (%56)	4 (%25)
≥5	8	3 (%37.5)	3 (%37.5)	1 (%12.5)	2 (%25)	2 (%25)	1 (%12)	7 (%87)	2 (%25)	2 (%25)	1 (%12)
p değeri		<i>0.001</i>	<i>0.08</i>	<i>0.129</i>	<i>0.134</i>	<i>0.448</i>	<i>0.487</i>	<i>0.043</i>	<i>0.152</i>	<i>0.381</i>	<i>(0.487)</i>

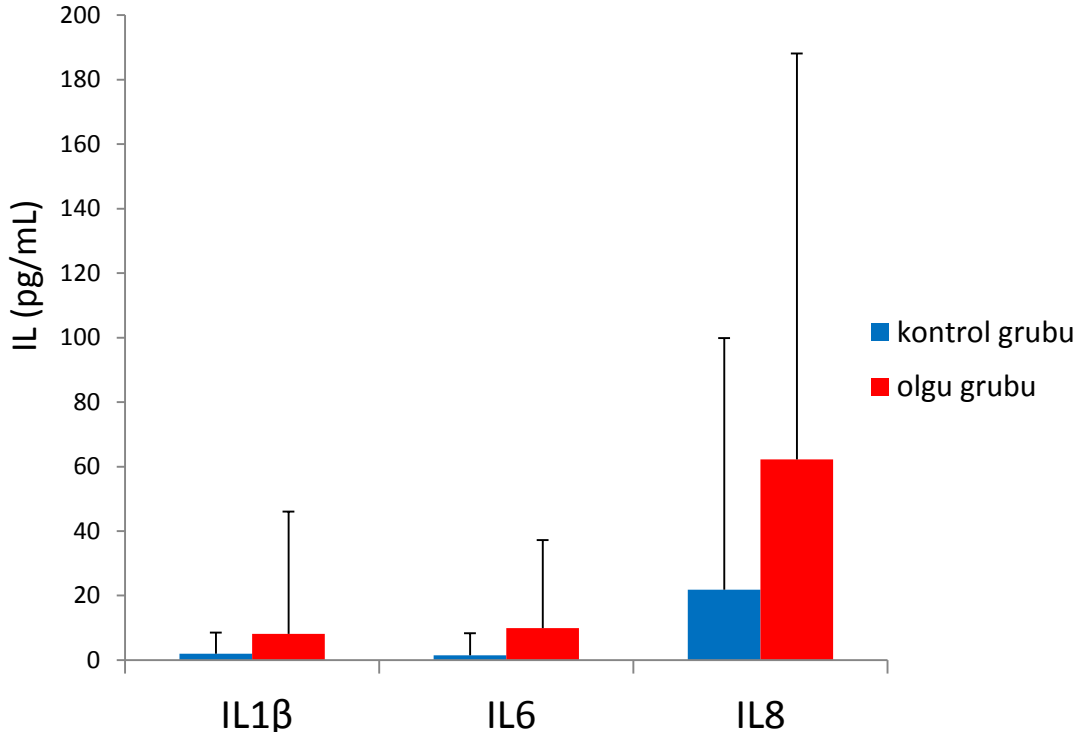
Ürotelyal karsinomlu olgu grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ekspresyon artışı belirlenen *TLR*'lerin (*TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR6*, *TLR7* ve *TLR10*) doku ve idrar örneklerinde *TLR* ekspresyon uyumlarını belirlemek amacı ile Venn diagramları oluşturuldu (Şekil 4.5). *TLR3*, *TLR4*, *TLR5* ve *TLR10* ekspresyon profili açısından doku ve idrar örneklerinde herhangi bir uyuma rastlanmadığından, bu *TLR*'lere ait Venn diagramları Şekil 4.5'de yer almamaktadır. Geride kalan *TLR2*, *TLR6* ve *TLR7* için uyum sırasıyla %23.8, %6.7 ve %78.3 olarak belirlendi. Ürotelyal karsinomlu olguların grade'leri gözönü alındığında, 4 adet yüksek-dereceli ürotelyal karsinoma tanısı alan olguların doku ve idrar örneklerinde ise, ekspresyon profili (artış/azalış) açısından sadece *TLR5* (tümünde azalış), *TLR7* (tümünde artış), *TLR8* (2 olguda artış ve 2 olguda azalış) ve *TLR10* (tümünde azalış)'da tam uyum (%100) gözlenmiştir.



Şekil 4.5 Ürotelyal karsinomlu doku ve idrar örneklerinde farklı *TLR* ekspresyon profillerini gösteren Venn diagramları.

Ürotelyal karsinomlu olgu grubu ve kontrol grubu bireylerine ait idrar örneklerinde ELISA ile belirlenen pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonlarını Şekil 4.5'de grafik halinde sunuldu. Buna göre, ürotelyal karsinomlu olguların idrar örneklerinde IL-1 β (8.1 \pm 37.8), IL-6 (9.8 \pm 27.3) ve IL-8 (62.2 \pm 125.8) konsantrasyonu,

kontrol grubuna ait IL-1 β (2 \pm 6.5), IL-6 (2 \pm 6.8) ve IL-8 (16 \pm 78.5) konsantrasyonlarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p= 0.033$, $p= 0.001$ ve $p=0.008$).



Şekil 4.6 Ürotelyal karsinoma ve kontrol grubu bireylerde pro-inflamatuvar sitokinlerin ortalama konsantrasyonları

Pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonları, aynı zamanda ürotelyal karsinomlu olgulara ait patolojik parametrelerle de karşılaştırıldı (Tablo 4.3). Tüm pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonlarının, tümör sayısına paralel olarak anlamlı derecede arttıkları belirlendi. Aynı zamanda, IL-8 konsantrasyonunun tümör büyüklüğü 5 cm'den büyük olan olgularda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p=0.045$). IL-1 β , IL-6 ve IL-8 ve konsantrasyonlarının birlikte yüksek olduğu olguların ($n=4$), tümör sayısı açısından multiple oldukları gözlemlendi.

Tablo 4.3 Pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonlarının klinikopatolojik verilerle karşılaştırılması

	IL-1β	IL-6	IL-8
Evre			
T1-T1a	(9.75 \pm 41.4)	(11.6 \pm 29.7)	(49.1 \pm 114.6)
T2- T2a	(0 \pm 0)	(1.2 \pm 2.4)	(127.9 \pm 176.8)
<i>p</i> değeri	0.337	1.000	0.717
Grade			
Düşük-dereceli	(0 \pm 0)	(4.3 \pm 10.6)	(94.8 \pm 209.2)
Yüksek-dereceli	(10.8 \pm 43.7)	(11.7 \pm 31)	(51.3 \pm 89.8)
<i>p</i> değeri	0.271	0.776	0.056
Tümör sayısı			
Tek	(0 \pm 0)	(1.9 \pm 6.1)	(63.2 \pm 143.4)
>2	(32.1 \pm 75.3)	(33.6 \pm 49.1)	(59.1 \pm 53.8)
<i>p</i> değeri	0.002	0.050	0.045
Tümör büyüklüğü			
<5 cm	(0 \pm 0)	(2.2 \pm 6.5)	(40.5 \pm 92.8)
\geq 5 cm	(1.1 \pm 1.6)	(25.2 \pm 44.3)	(105.6 \pm 174.2)
<i>p</i> değeri	0.058	0.328	0.045

5. TARTIŞMA

TLR'lerin keşfi immunoloji araştırmaları için önemli bir olaydır ve bu keşif 2011 yılında Jules Hoffmann, Bruce Beutler ve Ralph Steinman'ın doğal immunitenin başlamasındaki moleküler mekanizmaları aydınlatmaları nedeniyle Tıp ve Fizioloji alanında Nobel ödülü almaları ile daha da anlam kazanmıştır. TLR'ler başlıca dendritik hücreler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler gibi doğal immun yanıt hücrelerinde eksprese olurlar. Bu hücrelerdeki aktivasyonları, doğal immun yanıtın aktivasyonunu başlatmakla birlikte pro-inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin üretimine de neden olarak adaptif immun yanıtın aktivasyonunu kolaylaştırır. Son yıllardaki çalışmalar, TLR'lerin immun sistem hücrelerinin yanı sıra hem normal epitel hücrelerde hem de tümör hücrelerinde eksprese olduklarını göstermektedir (Gautagny vd 2012). Normal epitel hücrelerdeki ekspresyolara örnek olarak TLR1-9'un barsak epitel hücrelerinde, TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un mide epitel hücrelerinde ve TLR2 ile TLR5'in over yüzey epitel hücrelerinde ekspresyonları verilebilir (Ridnour vd 2013). Günümüze kadar, üriner sistem enfeksiyonlarına yanıtta rol oynayan TLR'ler (insanda TLR4 ve TLR5) dışında ürotelyal hücrelerde TLR ekspresyonunu rapor eden oldukça sınırlı çalışma bulunmaktadır (Zhang vd 2004, Song ve Abraham 2008, Qian vd 2008)

Tez çalışmasının ana hipotezlerinden biri normal mesane dokusu ile kanserli dokunun farklı *TLR* ekspresyonlarına sahip olduklarıdır. Bu hipotez eşliğinde, çalışmada 24 ürotelyal karsinomlu doku örneği ile 46 non-tümöral normal mesane doku örneği karşılaştırıldı. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmemişse de normal doku örneklerinde en belirgin değişimler *TLR1* ve *TLR7*'nin aşırı ekspresyonları ve *TLR3-5* ve *10*'un düşük düzeydeki ekspresyonlarıdır. Normal ürotelyal hücrelerde düşük düzeyde eksprese olan *TLR4* ve *TLR5*'in çalışmaya dahil edilen olgularda herhangi bir uriner enfeksiyonun olmadığını teyit etmesinin yanısıra *TLR4* ve *TLR5*'in ekspresyon düzeylerinin üriner patojenlere karşı doğal immun yanıtta aktif rolleri ile uyumlu olduğu değerlendirilebilir. Tümör doku örneklerinde ise istatistiksel bir anlamlılık belirlenmemekle birlikte, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, *TLR1* ekspresyonunda belirgin bir azalma gözlenirken, *TLR2-7* ve *TLR10*'un ekspresyon düzeyinin anlamlı derecede arttığı belirlendi. Bilgilerimiz dahilinde literatürde normal ürotelyal hücrelerde ve ürotelyal karsinomlarda TLR'lerin ekspresyon düzeylerini belirlemeyi hedefleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, benzer amaçları hedefleyen ve farklı örnekleri değerlendiren sadece bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada mRNA düzeyinde TLR ekspresyonları sağlıklı

donörlerden elde edilen ürotelyal hücrelerden hazırlanan 4 adet primer kültürde ve 15 adet ürotelyal karsinoma hücre hatlarında (MGH-U3, MGH-U4, JON, VMCUB-1, VMCUB-3, SW780, SW1710, SW800, 575A, 253J, RT4, 639V, 5637, T24 ve J82) belirlenmiştir. Sağlıklı ürotelyal hücrelerden hazırlanan 4 primer hücre kültüründe TLR1-6 ve TLR9'un mRNA düzeyinde ekspresyonlarının arttığı (en yüksek ekspresyonun TLR4'te gözlenmiştir) ancak TLR7, 8 ve 10'da ekspresyon artışının olmadığı rapor edilmiştir. Yukarıda belirtilen ürotelyal karsinoma hücre hatlarında ise, genel olarak TLR düzeylerinin normal ürotelyal hücrelerden hazırlanan primer kültürlerdeki sonuçlara benzemekle birlikte düşük ve yüksek dereceli hücre hatlarında bir farkın belirlenmediği gözlenmiştir. Hücre hatlarında TLR3 ve TLR4 ekspresyonun genel olarak daha yüksek, TLR7 ve TLR8 ekspresyonlarının oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Primer kültürlerle karşılaştırıldığında ise, TLR5 ve TLR6 ekspresyonlarının kanser hücre hatlarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda yine sağlıklı donörlerden elde edilen 11 mesane FFPE doku örnekleri ile 11 adet kas-invaziv olmayan tümörlere ait TUR materyalleri ve 15 adet kas-invaziv tümörlere ait sistektomi sonrası doku örnekleri TLR'lerin (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 ve TLR9) ekspresyonları açısından immunohistokimyasal (IHC) yöntemle analiz edilmiştir. Normal ürotelyumda TLR4 ve TLR9'un güçlü, TLR2, TLR3 ve TLR7'nin orta düzeyde ve TLR5'in zayıf ekspresyonu olduğu gözlenmiştir. Kas-invaziv olmayan tümörlerde TLR5 dışında değerlendirmeye alınan tüm TLR'lerin ekspresyonlarının anlamlı derecede azaldığının belirlenmesinin yanı sıra kas-invaziv tümörlerde bu ekspresyonların daha da azaldığı ve bu boyanma şiddetinin normal ürotelyumda gözlenenenden daha düşük olduğu belirlenmiştir (Ayari vd 2011). Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerle söz konusu bu çalışmadan elde edilen veriler arasındaki uyumsuzluk, değerlendirmeye alınan örnek türlerinin farklı olmasından ve kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Özellikle TLR ekspresyon düzeylerini belirlemede kullanılan IHC, semikantitatif bir yöntemdir ve hedef olarak protein düzeyinde ekspresyonu göstermektedir. Aynı zamanda, normal ürotelyal hücrelerden primer kültür hazırlığında kullanılan büyüme faktörleri, shigella toksini gibi supplementlerin de TLR ligandları olma olasılığı değerlendirilmelidir. Benzer şekilde, kültürdeki tümör hücrelerinde antijen ekspresyonunda değişimler olduğu birçok çalışma da rapor edilmiştir (LaRue vd 1997, Zietarska vd 2007).

Ürotelyal karsinoma gibi birçok farklı solid tümörlerde ve hematolojik malignansilerde TLR ekspresyonlarının kanser gelişimi ve progresyonundaki rollerini hedefleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Over kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada, TLR ekspresyon düzeyleri açısından kanserli doku ile normal sağlıklı doku

karsılaştırılmış ve kanserli dokularda TLR2, TLR3 ve TLR4'un mRNA düzeyinde ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir (Chen vd 2008). Bu çalışmanın yayınlanmasından 1 yıl sonra bir başka araştırma grubu normal over epitel dokusunda TLR2, TLR3, TLR4 ve TLR5'in aşırı eksprese olduğunu, TLR2-5 ekspresyon düzeylerinin ise benign ve malign duruma göre farklılık göstermediğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde benign ve malign olgularda TLR1, TLR7 ve TLR9'un ekspresyonun zayıf olduğu, ancak tümör dokusundaki vasküler endotelyal hücrelerde, makrofajlarda ve fibroblastlarda TLR ekspresyonlarının yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu alışma, bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularla da uyumlu olacak şekilde, normal epitel hücrelerinde ve tümör hücrelerinde farklı TLR'lerin eksprese olabildiklerini ve epitel kökenli tümörlerin tümör progresyonunu kolaylaştırmak için TLR'lerin rol oynadığı ve henüz net olarak aydınlatılamayan bir mekanizma ile inflamatuvar yolakları uyatabildiklerini göstermektedir (Zhou vd 2009).

Son yıllarda yapılan bir çalışma, kolon kanserlerinde TLR2 ve TLR4 ekspresyonuna odaklanmış ve normal kolon epitelinde TLR4 ekspresyonu gözlenmezken kanserli dokuda TLR4 ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Aynı çalışmada, tümör dokularından elde edilen kolon kanser hücre hatları da kullanılmış ve TLR2 mRNA ekspresyonunun sadece LPS ile uyarılmış kolon kanser hücrelerinde gözlendiği bildirilmiştir (Tcho'rzewski vd 2014). Samara ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise, küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarının bronkoalveolar lavaj sıvılarında TLR2, TLR7 ve TLR9 mRNA ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (Samara vd 2012). Solid tümörlerin aksine literatürde hematolojik malignansilerde TLR ekspresyonlarını araştıran çalışma verileri oldukça sınırlıdır. B ve T-hücreli Non-Hodgkin lenfomalarla ilgili yapılan bir çalışmada ise TLR1-9 mRNA ekspresyonlarına odaklanılmış ve reaktif lenfoid doku örnekleri ile lenfoma (Folikuler lenfoma, Diffuz Büyük B-hücreli lenfoma ve periferal T-hücreli lenfoma) doku örnekleri karşılaştırılmıştır. Folikuler lenfomanın aksine diğer iki lenfomada TLR2'nin aşırı eksprese olduğu, TLR8'in sadece Diffuz Büyük B-hücreli lenfomada aşırı düzeyde eksprese olduğunu ve TLR5 ekspresyonunun Folikuler lenfomada düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Özetle bu çalışmada da, solid tümörlerde olduğu gibi lenfoma alt tiplerinde de TLR ekspresyonlarının oldukça değişken olduğu, ancak farklılık gösteren TLR'lere odaklanarak yeni tedavi stratejileri açısından değerlendirilmeleri gerektiği vurgulanmıştır (Smith vd 2010). B hücre prekürsör akut lenfoblastik lösemi (BCPALL) hücrelerinde TLR1-9 ekspresyonları gözlenirken, TLR3-5 ekspresyonları gözlenmemiştir. Primer myeloma hücrelerinde ise TLR1, 7 ve 9 ekspresyonları rapor edilmiştir (Harsini vd 2014).

Solid ve hematolojik malignensilerde tümör oluşumunun yanısıra TLR'lerle ilgili çalışmaların önemli bir bölümünü, progresyon ve rekurrense olan ilişkiler oluşturmaktadır. Prostat kanserli 133 olguya ait tümör doku örneklerinde TLR'lerin mRNA düzeyinde ekspresyonlarına odaklanan bir çalışmada, rekurrens gösteren tümörlerde TLR3, TLR4 ve TLR9 ekspresyonunun anlamlı derecede arttıkları ve aynı zamanda bu artış düzeylerinin yüksek olasılıkla biyokimyasal rekurrense de ilişkili olduğu gösterilmiştir (González-Reyes vd 2011). Finlandiya'da 1996-2003 yılları arasında radikal sistektomi yapılan 186 prostat kanserli olgunun arşiv materyallerinde TLR9 protein ekspresyon düzeyleri analiz edilmiş ve TLR9'un rekurrense anlamlı derecede ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda istatistiksel anlamlılık belirlenmemişse de TLR9 aşırı ekspresyonunun yüksek Gleason skoru ile de ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Väisänen vd 2013). Prostat adonarsinomlarında Gleason skoru ve TLR ekspresyonları arasında anlamlı bir ilişki 2009 yılında bir çalışmada belirlenmiş ve Gleason skoru yüksek olgularda TLR4 ekspresyonunun anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir (Gatti vd 2009). Gonzales ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada, meme kanserli dokularda (n=74) TLR3, TLR4 ve TLR9'un mRNA düzeyinde ekspresyonlarının arttığını ve aynı zamanda bu artışın rekurrens gösteren tümörlerde göstermeyen tümörlere oranla daha yüksek olduğunu belirlemiştir (González-Reyes vd 2010). Meme kanserleri ile ilgili 2014 yılında yayınlanan bir çalışmada, hem meme kanser hücre hatlarında hem de klinik meme kanseri doku örneklerinde TLR9 mRNA ve proteininin ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu ve sentetik TLR9 ligantlarının *in vitro* kanser hücre invazyonunu uyardıkları rapor edilmiştir. Araştırmacılar, bu verilere dayanarak TLR9 ekspresyonunun tümör immunofenotipinde etkili olabileceğini ve kemoterapinin immunojenik yararlarına katkı sağlayabileceğini değerlendirmişlerdir (Sandholm vd 2014).

TLR'lerin tümör progresyonu ile olan ilişkileri de, bu alandaki çalışmaların önemli bir bölümünü kapsamaktadır. Dolaşımda tümör hücre (CTC)'lerine sahip metastatik meme, kolorektal ve prostat kanserli olguların doğal immun sistem fonksiyonlarını karşılaştıran bir çalışmada, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında TLR2 ve TLR4 ekspresyonlarının tüm metastatik olgularda anlamlı derece azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışmanın önemli ilgi çekici bir bulgusu da, her bir metastatik grupta CTC sayısı arttıkça her iki reseptörün ekspresyon düzeyinin azalmasıdır (Santos vd 2014). Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak TLR7 ekspresyonunun tümör hücrelerinin sağ kalımında önemli bir etkiye sahip olduğu, bir başka ifade ile yüksek ekspresyon düzeyinin kötü overall sağ kalımla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada ilk kez neoadjuvan kemoterapisi alan

hastalarda TLR7 ekspresyon artışının tedaviye yanıtı da etkilediği ve kemoterapiye dirençte bir belirteç (marker) olarak kullanılabilceği gösterilmiştir (Chatterjee vd 2014). Tüm bu veriler doğrultusunda, TLR'lerin ekspresyonlarındaki azalmaya bağılı olarak, tümör spesifik antijenlerin tanınmasındaki düzensizlikler ve doğal öldürücü hücrelerin fonksiyonunun bozulması gibi durumlar ortaya çıkabileceği ve böylelikle TLR'lerin tümör progresyonuna katkıda bulunabilecekleri öngörülebilir. Benzer şekilde, kemoterapi tedavilerine dirençten sorumlu mekanizmaların anlaşılmasında TLR'lerin önemli etkilere sahip olabilecekleri hatırlanması gereken önemli noktalardan biri olabilir.

Tümör doku örneklerinin yanısıra farklı kanser hücre hatlarında da TLR ekspresyonları araştırılmıştır. Rezania ve arkadaşlarının, LNCaP, DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarını kullanarak yaptığı bir çalışmada, LNCaP hücre hattında TLR7 ve TLR8 ekspresyonu fark edilebilir şekilde gözlenmez iken çok az seviyede TLR2 ekspresyonu gözlenmiştir. Du145 hücre hattında TLR4, TLR7 ve TLR9 dışındaki tüm TLR'ler eksprese edilirken, PC3 hücre hattında ise TLR7 dışında tüm TLR ekspresyonları gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca TLR4 ligandı olan LPS ve TLR2 ligandı olan LTA ile muamelesi sonucunda, tüm prostat kanser hücre hatlarında LTA aktivasyonunun hücre proliferasyonunu anlamlı derecede arttırdığı belirlenmiştir. DU145 hücre hattında, TLR4 ekspresyonu olmadığı halde LPS muamelesine yanıt olarak proliferasyonun artarken LPS, LNCaP hücrelerinin invazivliğinin artmasına neden olduğu gözlenmiştir. Oysa, PC3 hücre hattının invaziv kapasitesinin ise LPS veya LTA ile uyarılmanın ardından anlamlı derecede azalmıştır. Aynı zamanda, tüm prostat tümör hücrelerinin LTA ile uyarımının, IL-8 üretiminin ve hücre adezyonunun artışı ile ilişkili olduğu belirlenmişken, prostat tümör hücrelerinde IL-6 üretiminin LPS uyarımı ile farklı şekilde düzenlendiği saptanmıştır (Rezania vd 2014). Tüm bu veriler, kanser hücrelerinin aynı histolojik orjinden köken alması durumunda dahi, aynı TLR ligandlarına heterojen yanıtlar verebildiklerini ve pro-inflamatuvar sitokinlerin artışına neden olduklarını göstermektedir.

Yukarıda açıklamaya çalıştığımız verilere paralel olarak, son yıllardaki çalışmalar TLR'lerin karsinogenezdeki moleküler mekanizmalarına odaklanmışlardır. Wang ve arkadaşları SKOV3, OVCAR3, A2780 ve 3AO olmak üzere 4 over kanser hücre hattında yaptıkları çalışmada, MYD88'in downstream faktörü olarak etki ettiğini ve TLR4 ile birlikte over kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığını göstermişlerdir (Wang vd 2014). Benzer bir başka çalışma ise, TLR4 ekspresyonunun, over epitelyum hücrelerinde TLR4/MYD88 sinyal yolağı ile ilişkili olarak hastanın sağ kalımı ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (Kim vd 2012). Kolon kanserleri ile ilgili yapılan bir çalışmada

IHC analiz ile kolon karsinoma hücre hatlarında TLR3 ve TLR9 ekspresyonlarının arttığını, ayrıca bu hücre hatlarının TLR ligantı Poly I:C ile uyarımı sonucunda apoptozda önemli bir düşüşün gözlemlendiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, TLR9 ligantı olan CpG-oligodeoksinukleotid (CpG-ODN)'lerin ise hücre proliferasyonunu uyardıkları ve bu ligandın, kemoterapotik ajan olarak kullanılan adriamisinin sitotoksik etkisini azalttığını rapor etmişlerdir. Özetle bu çalışmada TLR3 ve TLR9'un NF- κ B'yi aktive ettikleri, dolayısıyla bu TLR'lerin hücre ölümü ve sağ kalımı ile yakından ilişkili oldukları gösterilmiştir (Nojiri vd 2013). Bu veriler eşliğinde, TLR3 ve TLR9'un hem regulasyonlarının hem de olası rollerinin aydınlatılması hücre ölümünün, proliferasyonun ve tümör hücrelerinin immun gözetimden kaçışının kontrolünde kritik öneme sahip olacaktır ve bu alanda daha detaylı çalışmalara gereksinim vardır.

CTC'lere sahip olan ve olmayan metastatik meme kanserli hastaların dendritik hücreler ve sitotoksik T lenfosit (Tc)'lerindeki TLR (2, 3, 4, 8) ekspresyonlarını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, CTC'lere sahip meme kanserli hastaların dendritik hücrelerinde TLR3 ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı, Tc 'lerde ise TLR2 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Green vd 2014). Metastatik potansiyeli yüksek bir meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231'de yapılan bir çalışmada ise en yüksek ekspresyonunun TLR4'de gözlenmekle birlikte, TLR1-TLR10'un hem mRNA hem de protein seviyesinde eksprese olduğunu bildirilmiştir (Yang vd 2010). Berger ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada ise, TLR9 ekspresyonunun meme ve over kanserlerinde kötü diferansiyasyon ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir ve TLR9 aşırı ekspresyonu ile hipometile DNA ile uyarımının bu kanser hücre hatlarında migrasyon kapasitesini arttırdığını göstermişlerdir (Berger vd 2010). TLR5'in yüksek ekspresyonunun küçük hücre dışı akciğer kanserinde iyi prognozla ilişkili olduğunu gösteren bir çalışmada, TLR5'in flagellin ile aktivasyonu sonucunda, bu kanser hücrelerinde *in vitro* hücre proliferasyonunun, migrasyonun ve invazyonun inhibe olduğu saptanmıştır (Zhou vd 2014). İnsan primer akciğer hücrelerinde, TLR7 veya TLR8 agonistleri ile uyarımının NF κ B'nin aktivasyonunun yanısıra anti-apoptotik protein Bcl-2'nin ekspresyonunda, tümör hücre sağ kalımında ve kemoterapotik ajanlara dirençte artışa neden olduğu rapor edilmiştir. Bu raporda ayrıca çalışma verilerine dayanılarak, akciğer kanserinde immunoterapide TLR7 veya TLR8 agonistlerinin adjuvan olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (Vicini vd 2010).

Literatürde diğer kanser hücre hatlarının yanı sıra, TLR'lerin karsinogenezdeki moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasını amaçlayan ürotelyal karsinoma hücre hatlarında yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. Oldukça malign ve evre III olan mesane kanseri hücre hattı (T24)'ün kullanıldığı bir çalışmada, TLR4 aktivasyonunun

B7-H1 ekspresyonunu regüle ederek, T24 hücrelerini Tc'lerden koruduğu belirlenmiştir. B7-H1 ya da ERK yolağının bloke edilmesiyle T24 hücrelerinin Tc-aracılı ölüm duyarlılığının düzenlenebileceği de bu çalışmanın verileri arasında yer almaktadır (Wang vd 2014). Bu veriler, ürotelyal karsinomada TLR4 ve B7-H1'in tümör hücrelerinin immun kaçışına katkıda bulunduğunu ve var olan immunoterapilerin güçlendirilmesinin yanı sıra yeni tedavi hedeflerinin bulunmasında da rol oynayabileceklerini göstermektedir. Shimizu ve arkadaşlarının T24, 5637, UMUC3, HT1197 mesane kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmada, TLR2 ve TLR4 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (Shimizu vd 2004). Bir başka önemli çalışmada da mesane kanser hücrelerinde TLR4 sinyalizasyon aktivasyonunun, tümörle-ilişkili IL-6 ekspresyonunu, p38 ve ERK aktivasyonu aracılığıyla uyardığı gösterilmiştir (Qian vd 2009). TLR4'ün tümör immunitesindeki rolü oldukça önemli bir konudur. TLR4'ün dentritik hücre (DC) maturasyonuna ve tümör mikroçevresinde lenfosit yığılımına neden olarak tümör immunitisini uyarmada yararlı olabileceğinin yanısıra tümör hücrelerinde TLR4 sinyalizasyonunun immun gözetimden kaçmayı kolaylaştırdığını ve tümörlerde TLR4 inhibisyonunun konak için önemli avantajlar sağlayabileceği gösterilmiştir (Ying vd 2013, Wang vd 2014). Yukarıda tartışılan çalışma verileri ile uyumlu olarak, çalışmamızda da ürotelyal karsinoma olgularında TLR4 ekspresyonunda anlamlı artış belirlenmiştir. Bu da bize TLR4'ün ürotelyal karsinoma hücrelerinin immun gözetimden kaçışında kritik bir öneme sahip olabileceğini ve yeni klinik sitotoksik ajanlar olarak TLR4 agonistlerinin kullanılabilme olasılığını göstermektedir.

Ürotelyal karsinoma hücre hatlarında, sentetik çift-iplikli RNA analogu olan Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)), IL-8 yanıtının en etkili uyarıcısıdır. Evre 1 ürotelyal karsinoma hücre hattı olan MGH-U3 hücrelerinde, poly (I:C)'in güçlü IL-6 ve IL-1 β uyarımı ile karakterize kapsamlı inflamatuvar yanıtın uyarılmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Normal ve malign ürotelyal karsinomalarda IL-8 yanıtının ikinci etkili uyarıcısı olan zymosan iken BCG, yalnızca malign ürotelyal karsinomalarda orta derecede IL-8 yanıtını uyarmaktadır. MGH-U3 hücrelerinde, TLR aktivasyonunun, NF κ B ve JNK MAP-kinaz aktivasyonu olmak üzere 2 önemli aktivasyonla karakterize TLR sinyal iletimi aracılığı ile inflamatuvar yanıtı neden olduğu bilinmektedir. BCG intravezikal uygulamanın yüksek riskli kasa invaze-olmayan mesane kanserlerinde ve *in situ* karsinomaların tedavisinde rekürrensi önlediği ve hatta hastaların %60'ında bu tedavinin başarılı sonuçlar verdiği bilinmektedir. Ürotelyal karsinomada TLR agonistlerinin kasa invaze-olmayan mesane kanserlerinde, immunoadjuvan temelli terapilerin optimizasyonunda immun modülatör olarak kullanımlarının, doğal ve adaptif

immun sistem uyarımını güçlendirebileceği öngörülmektedir (Ayari vd 2011). Dolayısıyla, son yıllarda immun yanıtın TLR ligandları kullanılarak düzenlenmesi, kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak kabul görmektedir.

Yapılan son çalışmalarda, bazı TLR aktivasyonlarının antitümör etkisi (tümör nekroz faktör üretimi, doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonu ve nötrofil ve lenfositlerin tümör mikroçevresinde birikimi gibi) de gösterilmiştir. Deneysel modellerde ürotelyal karsinomada CpG ODN ve imiquimod gibi bazal hücre karsinomanın tedavisinde kullanılan TLR agonistlerinin bazı anti-tümöral aktivitelere sahip oldukları bildirilmiştir. Ayari ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, TLR2 ve daha çok TLR3 agonistlerinin güçlü pro-inflamatuvar IL-8 yanıtında rol oynadıklarını göstermektedir. İntravezikal BCG tedavisi ile IL-8 yanıtının erken uyarımı, yeni yapılacak araştırmalarda kasa invaze olmayan ürotelyal karsinomanın tedavisinde TLR agonistlerinin terapötik ajan olarak kullanımını cazip hale getirmektedir. Bu veriler, BCG'ye alternatif ya da tamamlayıcı olan anti-tümör immunoterapilerinin TLR agonistleri kullanımı ile desteklenebileceğini göstermektedir (Ayari vd 2011). Hücre hatlarında yapılan bu çalışmaların yanısıra literatürde az da olsa fare modellerinde de benzer çalışmalar bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada TLR9-aracılı mekanizmanın lokal radyoterapinin ardından tümörün yeniden gelişimini başlattığı ve yine lokalize yüksek doz tümör radyoterapisinin ardından TLR9'un sistemik inhibisyonunun B16 melonoma, MB49 mesane kanseri ve CT26 kolon kanseri fare modelinde tümör rekürrensini geciktirtirdiği belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada TLR9'un tümörojenik etkisini myeloid hücrelerde JAK/STAT3 sinyalizasyonunun downstream aktivasyonu ile ve IL-6 ekspresyonunun MyD88/ NF- κ B-aracılı upregülasyonu ile gösterdiği belirlenmiştir. Yabancıl tip tümör ve radyasyon sonrası tümörlerden köken alan TLR9 ya da STAT3-yetmezlikli myeloid hücrelerin global gen ekspresyonları karşılaştırdıklarında, TLR9/STAT3 tarafından regüle genlerin bazılarının tümör gelişimini uyaracak şekilde inflamasyon ve revaskülarizasyonu içerdikleri gösterilmiştir. İki myeloid spesifik genetik strateji ile STAT3'ün blokasyonu, radyoterapinin ardından TLR9-aracılı kanser rekürrensini doğrulamaktadır. Tüm bu sonuçlar, lokalize tümör radyoterapisi ile TLR9/STAT3 sinyalizasyonunun spesifik inhibisyonunu içeren bu kombine tedavinin, kanserlerde radyo resistansı elimine edeceğini göstermektedir (Gao vd 2013). Akciğer kanseri ile ilgili olarak da, fare deneylerinde, tümöre infiltre olan mononükleer hücrelerde TLR9 ekspresyonunun anjiogenezi hızlandırdığını ve aynı zamanda sağ kalım süresini azalttığı bildirilmiştir (Belmont vd 2014). Çalışmamızda ürotelyal karsinoma doku

örneklerinde her ne kadar istatistiksel anlam bulunmasa da *TLR9* mRNA düzeyinin yüksek-dereceli tümörlerde, düşük-dereceli olanlara göre arttığı belirlenmiştir. Bu bulgu, yukarıda tartışılan literatür bulguları ile uyumlu görünmektedir ve *TLR9*'un ürotelyal karsinogenezdeki rolünü açıklamayı hedefleyen daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Çalışmamızda, idrar örneklerinde *TLR1* mRNA düzeyi, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artmıştır ve geriye kalan dokuz *TLR*'de (2-10) mRNA düzeyleri olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Ürotelyal karsinoma doku örneklerinde ise *TLR* (1, 8, 9) mRNA düzeyi, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artmıştır ve geriye kalan yedi *TLR*'de (2, 3, 4, 5, 6, 7, 10) mRNA düzeyleri olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Çalışmamızda doku ve idrar sonuçları *TLR* mRNA ekspresyon düzeyleri açısından birbiriyle uyumlu bulunmamıştır. Bu durumun, üriner sitolojinin güvenilirliğinin, farklı durumlardan etkilenebilme olasılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ürolojik hastalık yakınmaları ile başvuran olgularda başlangıç tanı yöntemi olarak ve aynı zamanda mesane kanserli hastaların takibinde kullanılan üriner sitoloji, invaziv olmayan ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Ancak üriner sitolojinin güvenilirliği örneklemenin kalitesi, hazırlama metodu, dökülen hücre sayısı, inflamatuvar hücrelerin varlığı, tümörün büyüklüğü, histolojik derecesi, ve patoloğun deneyimini içeren birçok faktöre bağlıdır (Kern vd 1997). Üriner sitolojik örneklemenin en önemli sınırlayıcılığı, özellikle düşük dereceli tümörlerde dökülen hücre sayısının az olması nedeniyle duyarlılığının düşük olmasıdır (Nilay vd 2010). Ülkemizde yapılan bir çalışmada yüksek dereceli ürotelyal karsinom tanılı olguların idrar sitolojileri için sensitivite oranları %85-100, düşük dereceli ürotelyal karsinom tanılı olguların idrar sitolojileri için bu oran %45-75 olarak bildirilmiştir (Oğuztüzün vd 2009). Çalışmamızda değerlendirilen idrar örneklerinin büyük bir bölümü (%83.3) düşük-dereceli ürotelyal karsinoma tanısı alan olgulara aitti. Dolayısıyla bu örneklerde malign hücre sayısının az olması, çalışmamızda doku ve idrar sonuçlarının uyumlu olmamasının önemli bir nedeni olabilir. Aynı zamanda idrar örneği alınan olguların immun yetmezlik durumları ve asemptomatik enfeksiyon durumları (örn. Human papillomavirus) da bu uyumsuzluktan sorumlu olabilirler (Goyal vd 2014). Günümüzde birçok çalışma idrar örneklerinden sirkülasyondaki mesane kanseri hücrelerinin seçimine odaklanmıştır. Bu çalışmalarda, özellikle üriner enfeksiyonlar nedeni ile kan hücrelerinin ve normal eksofoliyasyon hücrelerinin (normal

epitelyum katmandan ayrılan epitel hücre grubu) kontaminasyonunun yanlış-pozitif sonuçlar verdiğini göstermektedir (Weikert vd 2009). Çalışmamızda her ne kadar herhangi bir enfeksiyon öyküsü dışında ürotelyal karsinoma olgularından alınan idrar örnekleri değerlendirilmişse de eksfoliyeye hücrelerin varlığının da yanlış-pozitif sonuçların alınmasına neden olabileceği düşünülmüştür. Uyumsuzluğu açıklayabilecek bir başka önemli nokta da kontrol grubunu oluşturan olguların mesane taşı nedeniyle opere olmalarıdır. Mesane taşlarına oldukça sık rastlanılmaktadır ve büyük bir çoğunluğunu da böbrekten mesaneye düşen böbrek taşları oluşturmaktadır. Dolayısıyla mesanede taşının neden olduğu kronik irritasyon TLR ekspresyonlarındaki değişimden sorumlu olabilir. Ürotelyal karsinomlu olguların kan örneklerinde CTC'leri hücrelerini belirlemeyi hedefleyen ve günümüze kadar yapılan çalışmalarda bu hücrelerin olguların %30'undan daha azında belirlenebildiğini göstermektedir (Rink vd 2011, Guzzovd 2012). Bu noktada en önemli faktörün hücre seçiminde kullanılan yöntem olduğundan yola çıkarak, 2014 yılında yapılan bir çalışmada, immunomagnetik seperasyon metodlarının aksine büyüklük-tabanlı filtrasyon metodunu kullanarak olguların %64'ünde CTC'lerin varlığının belirlenebildiği rapor edilmiştir (Cegan vd 2014). Bu ve buna benzer çalışmaların idrar örneklerinde de yapılması, idrar örneklerinden tümör hücrelerinin ayırımına olanak sağlayacak ve bu hücreler üzerinden elde edilecek veriler daha önem kazanacaktır.

Hem normal hücrelerde hem de tümör hücrelerinde, özellikle tümör mikroçevresinde, TLR'lerin tipik doğal immun sistem hücrelerinin yanısıra tümör hücrelerinde de aktivasyonları karmaşık senaryolara neden olmaktadır. TLR mRNA ekspresyon düzeylerini değerlendiren çalışmaların bulguları birbirleriyle uyum göstermemektedir. Yapılan bir araştırmada, prostat kanserinde TLR sinyalizasyonunu aktive eden spesifik bir patojenin varlığını göstermekte oldukça zorlanılmıştır. Bir endojen TLR ligantının (hasarlı ve/ veya nekrotik dokulardan salınan DAMP'ın) bu olayda önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Kanserde endojen TLR ligantları ile etkileşen HMGB1, TLR2 ve TLR4'ü aktive edebilmekte (Apetoh vd 2007), ve aynı şekilde versikan da TLR2 agonisti olarak davranabilmektedir (Kim vd 2009). Peroksiredoksin 1'in (Prx1), prostat kanser gelişiminde TLR4 agonisti olabileceği düşünülmektedir. Belki de araştırılması ve tanımlanması gereken daha birçok endojen TLR ligantı bulunmaktadır. Son yıllarda, tümör dokularındaki TLR ekspresyonunun, anti-tümör immune telorensına neden olan, disfonksiyonel immunité ve uygun olmayan immun gelişimin iyileştirilmesindeki mekanizmada, önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Tümör mikroçevresinde disfonksiyonel immunité ile birlikte tümör progresyonu, ilaç direnci, metastaz, malign hücrelerin sağ kalım sinyalleri ve proliferatif araçlarla

uyarılmaktadır. Meme, kolorektal, melanoma, akciğer, prostat, glioma, pankreas, karaciğer ve ösofegal tümörler gibi tümörlerde TLR ekspresyonunun artışı rapor edilmiştir. Meme kanserinde yapılan çalışmalarda, kanser hücrelerinde TLR3 ekspresyon artışı gözlenirken, tümör mikroçevresine infiltre olan mononükleer hücrelerde TLR4 ve stromal fibroblastlarda TLR9 ekspresyonunun artışı gösterilmiştir. TLR3 ve TLR4'ün, kötü sağ kalımın prediktörü olduğu düşünülürken, TLR9'un sağ kalımı güçlendirdiği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, ösofegal kanserde, tumor dokularının %70, %72, %67 ve %78'inde sırasıyla TLR 3, 4, 7 ve 9 ekspresyonlarının varlığı gösterilmiştir. Kolorektal tümörlerde TLR7/8 ekspresyonunun artışının, CD133 kök hücre belirteci ile korele olacak şekilde, sağ kalımda azalma ile ilişkili bulunmuştur. Yapılan bir başka çalışmada ise, pankreas kanserli hastaların %69'unda, artan NF- κ B ile birlikte TLR4 ekspresyonunun varlığı rapor edilmiştir (Ridnour vd 2013). Dolayısıyla tümör mikroçevresinde yer alan kanserli hücrelerle birlikte başta immun sistem hücrelerinin de yer aldığı komşu sağlıklı doku hücrelerde farklı düzeylerde eksprese olan TLR'lerin o tümör mikroçevresini yönlendirebileceği açık olduğu kadar son derece karmaşık olaylar zincirini de barındırmaktadır.

Kanser sıklıkla, lokal inflamatuvar bir yanıt ile ilişkili şekilde gelişmektedir. Bu durum, ürotelyal karsinomlu hastaların idrarlarının, tümör hücreleri ve inflamasyonlu komşu ürotelyum ile yakın ilişki halinde bulunmasından kaynaklanmaktadır (Margel vd 2011). Bu veriler eşliğinde, çalışmamızda ürotelyal karsinomlu olgularla sağlıklı olgulardan alınan idrar örneklerinde pro-inflamatuvar sitokinlerin konsantrasyonlarını belirlemeyi ve TLR ekspresyonu ile inflamatuvar yanıt arasındaki olası ilişkiyi değerlendirmeyi amaçlamıştık. Çalışmamızda, ürotelyal karsinomlu olguların idrar örneklerinde IL-1 β , IL-6 ve IL-8 konsantrasyonu, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonları, aynı zamanda ürotelyal karsinomlu olgulara ait patolojik parametrelerle de karşılaştırıldığında, tüm pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonlarının, tümör sayısına paralel olarak anlamlı derecede arttıkları belirlenmiştir. Aynı zamanda, IL-8 konsantrasyonunun tümör büyüklüğü 5 cm'den büyük olan olgularda da anlamlı derecede arttığı ve tüm pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonlarının birlikte yüksek olduğu olguların (n=4), tümör sayısı açısından multiple oldukları gözlenmiştir. Mesane özelinde incelendiğinde, üriner sistem enfeksiyonlarının, üriner taş öyküsünün ve kanser gelişiminin yanısıra komşu organlardaki patolojik değişimlerin (örn: prostattaki bening prostat hiperplazisi gibi) de idrar örneklerinde pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonunda artışa neden oldukları bilinmektedir (Margel vd 2014). Çalışmamızda ürotelyal karsinoma tanısı dışında farklı şikayetler ile (böbrek taşı, BPH

gibi) Üroloji Polikliniğine başvuran kontrol grubu hastaların idrar örneklerinde de inflamatuvar durumu söz konusu olabileceği ve bu durumun proinflamatuvar sitokin konsantrasyonlarında artışa neden olabileceği beklenebilir. Ancak bu durumda dahi, kanserli olgulara ait idrar örneklerinde pro-inflamatuvar sitokin konsantrasyonları anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Proinflamatuvar sitokinler ürotelyal karsinomalarda, tümör biyolojisinde biyomarker olarak kullanılabilirler. IL-6, tümör anjiyogenezini uyararak ve kanser hücrelerinin apoptozu inhibe ederek, tümör gelişimine katkı bulunmakta ve patogeneizde önemli rol oynamaktadır. Serum IL-6 konsantrasyonu, endometrial kanser, akciğer kanseri, kolorektal kanser, renal hücreli karsinom, meme kanseri ve over kanserlerinde sıklıkla artış göstermektedir. Kolorektal kanserde IL-6 konsantrasyonunun, hastalığın progresyonu, patolojik grade (derece) ve invazyon ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Özetle birçok çalışmada IL-6'nın parakrin ve otokrin yollarla, solid tümörlerin gelişimini regüle ettikleri gösterilmiştir. IL-6 konsantrasyonundaki artış, aynı zamanda tümör evresi ve sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla, tümör gelişiminin yanısıra tümör progresyonunda da önemli rol oynayabileceği düşünülmüştür (Lukaszewicz vd 2007).

IL-1 β , hem fizyolojik ve hem de patolojik anjiyogenezin pro-anjiyogenik uyarımında önemli role sahiptir (Voronov vd 2007). IL-8 de inflamasyon ve karsinogenezde rol oynayan anjiyogenik bir faktördür (Urquidi vd 2012). Yapılan çalışmalarda IL-8 üriner protein seviyesinin ürotelyal karsinomlu hastalarda yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bilgilerimiz dahilinde literatürde ürotelyal karsinoma olgularına ait idrar örneklerinde proinflamatuvar sitokin konsantrasyonlarının karsinogenezdeki rollerini hedefleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Margel ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, ürotelyal karsinomlu olguların idrar örneklerinde, IL-1 β konsantrasyonunu gözlemezler iken, IL-6 ve IL-8 konsantrasyonlarını gözlemişlerdir. Kasa invaze olan ve olmayan ürotelyal karsinomlu olguların idrar örneklerinde, IL-8 ve konsantrasyonu açısından sağlıklı bireylerin idrar örneklerinde bir fark görmez iken, IL-6 konsantrasyon seviyesinin kasa invaze olan ürotelyal karsinomlu olguların idrar örneklerinde arttığını belirlemişlerdir (Margel vd 2014). Urquidi ve ark.'ları yaptıkları bir çalışmada, ürotelyal karsinoma hasta idrarlarında IL-8 konsantrasyonunun, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir (Urquidi vd 2012). Ürotelyal karsinomada IL-8 konsantrasyonunun biyomarker olarak kullanılabilmesine dair çalışmaların yanı sıra idrar örneklerinde IL-8 konsantrasyon düzeyinin hastalığın evresi ve rekürrensi ile orantılı olarak arttığını rapor eden çalışmalar da bulunmaktadır. BCG ve mitomisin C terapilerini içeren intravezikal tedavilerin etkinliğinin kaybı da bu durum ile ilişkilendirilmiştir. Fare modellerinde

mitojenik ve anjiojenik özellik gösteren IL-8 konsantrasyon düzeyinin artışının tümör oluşumu, progresyon ve metastazla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mian vd 2003). Sheryka ve arkadaşları, transisyonel hücre karsinomalı hasta idrar örneklerinde IL-8 konsantrasyon düzeyinin sağlıklı bireylere oranla anlamlı derecede arttığını rapor etmişlerdir. Aynı zamanda, üriner IL-8 düzey artışının, hastalığın evresi ile arttığını ancak, hastalığın gradei ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir. Bu durum üriner IL-8 düzeyindeki artışın tümör invazivliğinde ya da anjiyogenezde etkili olduğunu göstermektedir. CIS'in görüldüğü durumlarda, IL-8 düzeyinde artışın gözlemlendiği ve bunun nedeninin de CIS lezyonunun yassı şeklinin idrara daha fazla IL-8 diffüze olmasına izin vermesi olduğu düşünülmektedir (Sheryka vd 2003). Literatürde proinflatuar sitokin konsantrasyonları ürotelyal karsinoma olgularının yanı sıra aynı zamanda farklı kanserlerde de araştırılmıştır. Nastase ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, 62 kolon kanseri olgusuna ait serum örneklerinde, IL-8 sitokin konsantrasyonu seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Nastase vd 2014). Farklı kanser türleri ile yapılan bir çalışmada, 128 kanser hastasının serum örneklerinde IL-8 konsantrasyon düzeyleri araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre, melanoma (n=16), renal hücre karsinoma (n=23), NSCLC (n= 21), hepatoselüler karsinoma (n= 30) olgularında IL-8 konsantrasyon düzeyi kontrol grupları ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Sanmamed vd 2014). Graham ve arkadaşları, meme kanserli olgularda IL-6 konsantrasyon seviyesinin kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında anlamlı derecede arttığını rapor etmişlerdir (Graham vd 2004). Bu bulgular bize, tümör mikroçevresinde var olan inflamatuvar yanıtın karsinogenez süresinde önemli rol oynadıklarını ve ürotelyal karsinoma doku örneklerinde farklı TLR ekspresyonlarındaki artışın, pro-inflatuar sitokin konsantrasyon artışından sorumlu olabileceğini göstermektedir. Ancak, bu kompleks mekanizmanın her bir TLR ve sitokin özelinde detaylı araştırılarak sorumlu mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik yeni çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

Yukarıda tartışılan ve elde edilen bilgi birikimi çerçevesinde, günümüzde, TLR ve kanserle ilgili araştırmaların önemli bir bölümünü yeni tedavi edici ajanlar olarak TLR agonistleri ile yapılan çalışmalar oluşturmaktadır ve literatürde bu alanda 200'den fazla bilimsel yayın bulunmaktadır. Kanser hastalarında günümüzde yalnızca üç TLR agonisti FDA onaylıdır. Bunlar mesane kanser tedavisinde kullanılan BCG, insan papiloma virus 16 ve 18'de kullanılan monofosforil lipit A (MPL) ve aktinik keratozis, superfizyal bazal hücre karsinoma ve eksternal genital ve ya da perianal siğillerin tedavisinde kullanılan (%5 krem) imikvimod olarak sıralanabilir. TLR7 agonisti 852A,

ilerlemiş hematolojik malignansilerde deri altı enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır. TLR9 agonisti IMO-2055 rekkürrens gözlenen veya metatstatik baş ve boyun skuamoz hücre karsinomalarında kullanılmaktadır. Ayrıca, Agatolimod TLR9 agonisti, tremelimumab ile kombine verildiğinde solid tümörlerin (melonoma) tedavisinde kullanılmaktadır (Vacchelli vd 2013).

TLR agonistlerinin, T hücrelerine tümör spesifik antijen sunumunun gerçekleştirerek dentritik hücre (DC) maturasyonuna ve aktivasyonuna neden oldukları gösterilmiştir. TLR pozitif tümör hücrelerinde apoptozun uyarılması, TLR agonistlerinin anti-tümöral özelliklerine de katkıda bulunduğu belirtilmiştir. TLR9 agonisti olan PF-3512676 (CPG7909) ile monoterapinin, farklı tipteki kanserlerin tedavisinde umut verici sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Melanoma ve bazal hücre karsinomalı hastalarda, PF-3512676'nın intratümöral enjeksiyonu, uzak metastazların progreresyonunda etkili olmazken, deri lezyonlarının regresyonunu uyarmaktadır. Deri altına PF-3512676 uygulaması ise melanoma, ilerlemiş renal karsinoma ve ilerlemiş kutönöz T hücreli lenfoma hastalarında kısmen yararlı olmuştur. PF-3512676 kemoterapisi alan NSCL hastalarında, yüksek objektif yanıt oranı ve 1 yıllık sağ kalımın arttığı gösterilmiştir. Günümüzde, TLR9 agonistleri ile kombine verilen kemoterapi ajanlarının güvenilirliği ve etkinliği çeşitli klinik denemeler ile araştırılmaktadır. TLR7 ve TLR7/8 agonistleri olarak etki eden imikuimod (R-837) ve resikuimod (R-848) gibi imidazakuinolin bileşikleri sentetik küçük moleküllerdir. Bu moleküller, NF-κB aracılı pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi ile, DC maturasyonuna neden olmaktadır. Buna ek olarak, TLR7 ligasyonu, plazmosistoid DC'lerde tip I IFN'ların üretimine neden olan IRF7 aktivasyonunu uyandır. Lokal imikuimod %5 kreminin, (Aldara TM), lentigo maligna, metatstatik melonema deri lezyonları, prekansöröz aktinik keratosiz lezyonları, Bowen's hastalığı, skuamoz hücre karsinoma ve ekstra "mammary" Paget hastalığında etkili olduğu gösterilmiştir (Hedeyat vd 2012). Günümüzde, Aldara TM, superfisiyal bazal hücreli karsinoma ve aktinik keratozis için geliştirilmiş terapatik bir ajan olarak kullanılmaktadır.

TLR 7, 8, 9 agonistlerinin anti-tümör aktivitesi, küçük tümöre (tipik olarak ≤ 200 mm³) sahip fare modellerinde de araştırılmıştır. TLR-tabanlı terapilerin büyük tümörlerdeki (>500 mm³) etkisi düşüktür. TLR agonistlerinin etkisinin, kombine kullanıldıklarında ve kanseröz dokuya direkt enjekte edildiklerinde daha başarılı olabileceği düşünülmektedir. Büyük tümörlerin sıklıkla, immunosupresif lökositler tarafından uyarıldıkları ve böylelikle anti-tümör yanıtı down regule ettikleri düşünülmektedir. CpG ODN'nin intra-tümöral enjeksiyonu ile tümöre infiltre olan myeloid-kökenli baskılayıcı hücrelerin (MDSC)'lerin sayısının ve baskılayıcı aktivitesinin

azaldığı bildirilmiştir. TLR 7, 8, 9 hedefli agonist kombinasyonlarının tümöre karşı yüksek etki gösterebileceği düşünülmektedir. Ancak, ilk jenerasyon TLR7/8 agonistlerinin fizikokimyasal karakteri, kısa yarı ömre sahiptir. Bu durumda CpG ODN ile kombine verildiğinde TLR7/8 agonistlerinin aktivitesini düşürmektedir. Son yapılan çalışmalarda, yeni bir TLR7/8 agonisti (3M-052)'e modifiye edilen lipofilik kuyruğun, uygulamadan en az 24 saat sonrasında yüksek seviyeye ulaşmasına izin verdiği gösterilmiştir. Sonuçlar, (3M-052)+CpG ODN kombinasyonunun, Tc aktivitesini ve Th1 sitokin üretimini anlamlı derecede arttırdığını ve MDSC immunsupresif aktiviteyi down regüle ettiğini göstermektedir (Vacchelli vd 2013, Zhao vd 2014). Özetle, günümüze kadar yapılan çalışmalar, küçük tümörlerde TLR agonistlerinin tümöre karşı konak immun yanıtını desteklediğini, ancak büyük tümörler için yeni tanımlanacak TLR agonistlerine gereksinim duyulduğunu göstermektedir. TLR agonistlerinin tek başına veya radyoterapi, kemoterapi veya immunoterapi ile birlikte kombine olarak profilaktik veya terapotik kullanımlarının da araştırılması gerekmektedir. Bir başka önemli nokta da, farklı kanser türlerinde farklı TLR ekspresyon profillerinin gözlenmesi, kişiye-özü TLR agonistlerin belirlenmesini de akla getirmektedir. Herşeyden önce, TLR agonistlerinin anti-tümör immunitesindeki mekanizmalarını tam olarak anlayabilmek için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Özetle bu çalışmamızdan elde edilen veriler eşliğinde, ürotelyal karsinomada hücre içi tehlike sinyallerinin farklı TLR'lerce algılanabildiğini ve bu reseptörlerin en azından pro-inflamatuvar sitokinlerin artışına neden olarak tümör gelişimi ve progresyonuna neden olabilecekleri düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışma, mesane taze doku örnekleri ile TLR mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlendiği ilk çalışmadır.
2. Normal doku örneklerinde en belirgin değişim TLR1 ve TLR7 de gözlenmiştir. Çalışmamızda, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bu iki TLR artışı gösterilmiştir.
3. Tümör doku örneklerinde ise istatistiksel bir anlamlılık belirlenmemekle birlikte, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TLR1 ekspresyonunda belirgin bir azalma gözlenirken, TLR2-TLR7 ve TLR10'un ekspresyon düzeyinin anlamlı derecede arttığı belirlendi.
4. Çalışmamızda, idrar örneklerinde *TLR1* mRNA düzeyi, olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artmıştır ve geriye kalan dokuz TLR'de (2-10) mRNA düzeyleri olgu grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.
5. Sonuçlarımıza göre, dokuda ve idrar örneklerinde TLR mRNA ekspresyon düzeylerinin birbiriyle paralel olmadığını ve bu durumun, çalışmamızda değerlendirilen idrar örneklerinin büyük bir bölümünün (%83.3) düşük-dereceli ürotelyal karsinoma tanısı alan olgulara ait olması ve düşük dereceli tümörlerde dökülen hücre sayısının az olması nedeniyle duyarlılığının düşük olması durumuna bağlıyoruz.
6. Çalışmamızın sonucunda, ürotelyal karsinomalı hastalara ait idrar örneklerinde IL-1B, IL-6 ve IL-8 konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını söyleyebiliriz.
7. Aynı zamanda, IL-8 konsantrasyonunun tümör büyüklüğü 5 cm'den büyük olan olgularda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p=0.045$). IL-6, IL-8 ve IL-1 β konsantrasyonlarının birlikte yüksek olduğu olguların ($n=4$), tümör sayısı açısından multiple oldukları gözlemlendi.
8. Olgu grubuna ait mesane dokularında *TLR1* mRNA düzeyinin, tümör büyüklüğü ≥ 5 cm olan hastalarda, 5 cm'den küçük olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.001$).
9. Benzer şekilde, olgu grubuna ait mesane dokularında TLR7 mRNA düzeyinin tümör büyüklüğü ≥ 5 cm hastalarda, 5 cm'den küçük olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p=0.043$).

10. Olgu grubuna ait mesane dokularında TLR9 mRNA düzeyinin, yüksek-dereceli tümörlerde, düşük-dereceli olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttığını söyleyebiliriz. ($p=0.057$). Bu durumda, TLR'lerin mesane kanserinin progresyonunda rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

- Abat D. İnvaziv Olmayan Düşük Malignite Potansiyelli Mesane Tümörleriyle, İnvaziv Yüksek Malignite Dereceli Tümörlerin Genetik Açıdan Farklılıkları. Uzmanlık Tezi, **Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı**, Adana, 2011, s.95.
- Abol-Enein H. Infection: is it a cause of bladder cancer? **Scand J Urol Nephrol Suppl** 2008; 218:79–84.
- Ahmed A, Redmond P, Wang JH. Links between Toll-like receptor 4 and breast cancer. **Oncolmmunology** 2013; 2:2, e22945.
- Anafarta K, Baykara M, Ürogenital Organların Anatomik ve Histolojik Yapısı, Temel Üroloji, 4.baskı, **Güneş Kitapevi**, Ankara, 2011, s.7-10.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nat Med** 2007 ;13 (9):1050–1059.
- Arlene F. Kantor AF, Hartge P, et al. Urinary track infection and risk of bladder cancer. **Am. J. Epidemiol** 1984; 119 (4): 510-515.
- Ayari C, Bergeron A, LaRue H, Ménard C, Fradet Y. Toll-Like Receptors in Normal and Malignant Human Bladders. **The Journal Of Urology** 2011; 185: 1915-1921.
- Belmont L, Rabbe N, Antoine M, Cathelin D, Guignabert C, Kurie J, Cadranel J, Wislez M. Expression of TLR9 in tumor-infiltrating mononuclear cells enhances angiogenesis and is associated with a worse survival in lung cancer. **Int J Cancer** 2014; 134, 765–777.
- Berger R, Fiegl H, Goebel G, Obexer P, Ausserlechner M, Doppler W, Hauser-Kronberger C, Reitsamer R, Egle D, Reimer D, Iler-Holzner M, Jones A, Widschwendter M. Toll-like receptor 9 expression in breast and ovarian cancer is associated with poorly differentiated tumors. **Cancer Sci** 2010 ;(101) :4: 1059–1066.
- Bhatelia K, Singh K, Singh R. TLRs: Linking inflammation and breast cancer. **Cellular Signalling** 2014; 26: 2350–2357.
- Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton M H, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. **Am J Pathol** 2001; 158: 1955–1959.
- Boffetta P. Tobacco smoking and risk of bladder cancer. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 2008; 42:45–54.
- Borden EC, Groveman DS, Nasu T, Reznikoff C, Bryan GT. Antiproliferative activities of interferons against human bladder carcinoma cell lines in vitro. **The Journal of urology** 1984; 132(4):800-803.
- Botosa I, Segalb D, Daviesa R. The Structural Biology of Toll-Like Receptors. **Structure** 2011;13; 19(4): 447–459.
- Brausi M, Oddens J, Sylvester R, Bono A, van de Beek C, van Andel G, Gontero P, Turkeri L, Marreaud S, Collette S et al. Side Effects of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) in the Treatment of Intermediate- and High-risk Ta, T1 Papillary Carcinoma of the Bladder: Results of the EORTC Genito-Urinary Cancers Group Randomised Phase 3 Study Comparing One-third Dose with Full Dose and 1 Year with 3 Years of Maintenance BCG. **European urology** 2014; 65(1):69-76.

Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jockel KH, Donato F, Serra C, Wahrendorf J, Hours M, T'Mannetje A, Kogevinas M, Boffetta P Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 2000; 86:289–294.

Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jockel KH, Donato F, Serra C, Wahrendorf J, Hours M, Cairns P. Gene methylation and early detection of genitourinary cancer: the road ahead. *Nat Rev Cancer* 2007;7:531–543.

Caner V, Turk NS, Duzcan F, et al. No strong association between HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in high-grade invasive urothelial carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2008;14 (3) :261-266.

Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, et al. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 1999; 23:18.

Cassidy A, Wang W, Wu X, Lin J. Risk of urinary bladder cancer: a case-control analysis of industry and occupation, *BMC Cancer* 2009; 9: 443.

Cebrian V, Alvarez M, Aleman A, et al. Discovery of myopodin methylation in bladder cancer. *JPathol* 2008; 216:111.

Cegan M, Kolostova K, Matkowski R, Broul M, Schraml J, Fiutowski M, Bobek V. In vitro culturing of viable circulating tumor cells of urinary bladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;15;7(10):7164-7171.

Chatterjee S, Crozet L, Damotte D, Iribarren K, Schramm C, Alifano M, Lupo1 A, Cherfils-Vicini J, Goc J, Katsahian S, Younes M, Dieu-Nosjean M, Fridman W, Sautès- Fridman C, Cremer I. TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2014;15;74(18):5008-5018.

Chaturvedi AK, Engels EA, Gilbert ES, Chen BE, Storm H, Lynch CF, Hall P, Langmark F, Pukkala E, Kaijser M, Andersson M, Fossa SD, Joensuu H, Boice JD, Kleinerman RA, Travis LB. Second cancers among 104, 760 survivors of cervical cancer: evaluation of longterm risk. *JNCI Cancer Spectr* 2007; 99:1634–1643.

Chen R, AlveroA B, Silasi D-A, K D Steffensen· G Mor. Cancers take their Toll—the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene* 2008; 27: 225–233.

Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliandro R, Magdeleinat P, Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest* 2010;120(4):1285–1297.

Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. IARC, IACR. Cancer incidence in five continents. *IARC Scientific Publications*, France, 2007.

Çakır H. Yüzeysel Mesane Kanserinde Tekrarlanan Transüretal Rezeksiyonun Değeri. Uzmanlık Tezi, *Sağlık Bakanlığı İstanbul Fatih Sultan Mehmet Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği*, İstanbul, 2006.s 67.

Delclos GL, Lerner SP. Occupational risk factors. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2008; 42(218):58–63.

Eble J. Sauter G, Jonathan I. Isabell E, A. Sesterhenn Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours. *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, 69008 Lyon, France. 2002. S354.

Erol Z. Mesanenin Ürotelyal Tümörlerinde Cox-2 Ekspresyonunun Önemi. Uzmanlık Tezi, **Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı**, İstanbul, 2006, s 66.

Fukata M, Chen A, Vamadevan AS. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. **Gastroenterology** 2007;133:1869–1881.

Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels A, Maisonneuve P, Boyle P. Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. **Int. J. Cancer** 2008; 122: 155–164.

Gao C, Kozłowska A, Nechaev S, Li H, Zhang Q, Hossain D, Kowolik C, Chu P, Swiderski P, Diamond D, Pal S, Raubitschek A, Kortylewsk, M TLR9 Signaling in the Tumor Microenvironment Initiates Cancer Recurrence after Radiotherapy. **Cancer Res** 2013; 73(24); 7211–7221.

García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, Castaño-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Torà M, Fernández F, Real FX, Rothman N. 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):649-659.

Gatti G, Quintar A, Andreani V, Nicola J, Maldonado A, Masini-Repiso M, Virginia E, Maccioni M. Expression of Toll-Like Receptor 4 in the Prostate Gland and Its Association With the Severity of Prostate Cancer. **The Prostate** 2009; (69): 1387-1397.

González-Reyes S, Fernández M, González L, Aguirre A, Suárez A, M. González J, Escaff S, Vizoso F. Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. **Cancer Immunol Immunother** 2011; (60):217–226.

González-Reyes S, Marín M, González L, González L, Casar J, Lamelas M, González-Quintana J, Vizoso F. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. **BMC Cancer** 2010; 10:665.

Goutagny N, Estornes Y, Hasan U, Lebecque S, Caux C. Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. **Targ Oncol** 2012; (7) :29–54.

Goyal A, Ray N, Chute DJ, Abdul-Karim FW. Significance of cytologic detection of low-grade squamous intraepithelial lesion in urine. **J Am Soc Cytopathol** 2014, Baskıda.

Graham J. Caine, Gregory Y. H. Lip, Paul S. Stonelake, Peter Ryan, Andrew D. Blann Platelet activation, coagulation and angiogenesis in breast and prostate carcinoma. **Thromb Haemost** 2004; 92: 185–90.

Green L, Santos M, Ejaeidi A. Craft B, Lewis R, Cruse M. Toll-like receptor (TLR) expression of immune system cells from metastatic breast cancer patients with circulating tumor cells. **Experimental and Molecular Pathology** 2014; (97) :44–48.

Guzzo TJ, McNeil BK, Bivalacqua TJ, Elliott DJ, Sokoll LJ, Schoenberg MP. The presence of circulating tumor cells does not predict extravesical disease in bladder cancer patients prior to radical cystectomy. **Urol Oncol** 2012 ; 30(1):44-48.

Habuchi T, Kinoshita H, Yamada H, et al. Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:1331–1335.

Hall P. Radiation-associated urinary bladder cancer. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 2008; 42:85–88.

Han JH, Park SY2, Kim JB, Cho SD, Kim B, Kim BY, Kang MJ, Kim DJ, Park JH. TLR7 Expression is Decreased During Tumour Progression in Transgenic Adenocarcinoma of Mouse

Prostate Mice and Its Activation Inhibits Growth of Prostate Cancer Cells. **American Journal of Reproductive Immunology** 2013; (70) :317–326.

Harsini S, Beigy M, Akhavan-Sabbagh M, Rezaei N. Toll-like receptors in lymphoid malignancies: Double-edged sword. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 2014 ; (89) :262-283.

Hawkyard S, James K, Prescott S, Jackson AM, Ritchie AW, Smyth JF, Chisholm GD. The effects of recombinant human interferon-gamma on a panel of human bladder cancer cell lines. **The Journal of urology** 1991; 145(5):1078- 1081.

Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. **J Clin Oncol** 2006; 24:3664–3671.

Hussain T, Akhtar M. Molecular Basis of Urinary Bladder Cancer. **Adv Anat Patho** 2013;20:53–60.

Husseinzadeh N, Davenport SM. Role of Toll-like receptors in cervical, endometrial and ovarian cancers: **A review. Gynecol Oncol** 2014: 8258 (14) 01266-1269.

Jeongmin Song ve Soman N. Abraham. TLR Mediated Immune Responses in the Urinary Tract. **Curr Opin Microbiol** 2008 ; 11(1): 66–73.

Jimenez-Cruz JF, Vera-Donoso CD, Leiva O, Pamplona M, Rioja-Sanz LA, Martinez-Lasierra M, Flores N, Unda M. Intravesical immunoprophylaxis in recurrent superficial bladder cancer (Stage T1): multicenter trial comparing bacille Calmette-Guerin and interferon-alpha. **Urology** 1997; 50(4):529-535.

Jinushi M. The role of innate immune signals in antitumor immunity. **Oncol Immunology** 2012; (1):2, 189–194.

Kern W. Urinary tract. In: Bibbo M, editor. Comprehensive cytopathology. 2nd ed., Philadelphia: **W.B. Saunders Company** 1997; p. 445-492.

Khurana S, Dubey ML, Malla N. Association of parasitic infections and cancers. **Indian J Med Microbiol** 2005; 23:74–79.

Kim KH, Jo MS, Suh DS, Yoon MS, Shin DH, Lee JH, Choi KU. Expression and significance of the TLR4/MyD88 signaling pathway in ovarian epithelial cancers. **World Journal of Surgical Oncology** 2012;10:193.

Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. **Nature** 2009;457(7225):102–106.

Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. **Urology** 2005;66: 4-34.

Knowless MA. Molecular Biology of Bladder Cancer **DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, 9th Edition**. New York, 2011, s. 1-31.

Konat VG. Signaling by Toll-like Receptors. **Methods In Signal Transduction Series**, New York, 2008, s. 222.

LaRue H, Parent-Vaugeois C, Bergeron A, Champetier S, Fradet Y. Influence of spatial configuration on the expression of carcinoembryonic antigen and mucin antigens in human bladder cancer. **Int J Cancer** 1997;11;71(6):986-992.

Latif Z, Watters AD, Dunn I, et al. HER2/neu overexpression in the development of muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. **Br J Cancer** 2003; 89:1305–1309.

Lawless MV, Greene CM. Toll-like receptor signalling in liver disease: ER stress the missing link? **Cytokine** 2012; 59 (2): 195-202.

Lisa A. Ridnour, Robert Y.S. Cheng, Christopher H. Switzer, Julie L. Heinecke, Stefan Ambs, Sharon Glynn, Howard A. Young, Giorgio Trinchieri, and David A. Wink. Molecular Pathways: Toll-like Receptors in the Tumor Microenvironment--Poor Prognosis or New Therapeutic Opportunity. **Clin Cancer Res** 2012 ; 19(6); 1340–1346.

Lokeshwar VB, Merseburger AS, Hautmann SH. Bladder Tumors, **Humana Press**, New York, 2011, s.483.

Lopez-Beltran A, Bassi P, Pavone-Macaluso M, Montironi R. Handling and pathology reporting of specimens with carcinoma of the urinary bladder, ureter, and renal pelvis. **Eur Urol** 2004; 45(3):257-266.

Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, et al. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. **Cancer Res** 2006;66:7401–7404.

Lukaszewicz M, Mroczko B, Szmitkowski M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. **Review Articles** 2007; 117 (5-6): 247-251.

Mai CW, Kang YB, Rao, Pichika MR. Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers. **Onco Targets and Therapy** 2013; 6 :1573–1587.

Maiorov E.G, Keskin Ö, Gürsoy A, Nussinov R. The structural network of inflammation and cancer: Merits and challenges. **Seminars in Cancer Biology** 2013; 23 (4):243-251.

Mantovani A, Allavena P, Sica A. Cancer-related inflammation. **Nature** 2008;454:436–444.

Margel D, Pevsner-Fischer M, Baniel J, Yossepowitch O, Cohen I, Stress Proteins and Cytokines are Urinary Biomarkers for Diagnosis and Staging of Bladder Cancer **European Urology** 2011; (59) 113 – 119.

Maurice P. A. Zeegers AE Eliane Kellen AE Frank Buntinx Piet A. van den Brandt. The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. **World J Urol** 2004; 21: 392–401.

Maxwell PD. The global burden of urinary bladder cancer. **Scand J Urol Nephrol** 2008; 42:1–9.

Mian BM, Dinney CP, Bermejo CE, et al: Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor- κ B. **Clin Cancer Res** 2003, 9:3167.

Michael J. Droller. Urothelial Tumors (ACS Atlas of Clinical Oncology), **PMPH-USA**, p. 1-16, 2004.

Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. **Semin Immunol** 2007;19 (1): 3-10.

Moch H, Sauter G, Mihatsch MJ, Gudat F, Epper R, Waldman FM. p53 but not erbB-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer. **Hum Pathol** 1994;25(12):1346-1351.

Murta-Nascimento C, Schmitz-Drager BJ, Zeegers MP, Steineck G, Kogevinas M, Real FX et al. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. **World J Urol** 2007;25: 285-295.

Muzio M, Fonte E, Caligaris-Cappio F. Toll-like Receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Mediterr J Hematol Infect Dis** 2012; 4(1): e2012055.

Nastase A, Paslaru L, Herlea V, Ionescu M, Tomescu D, Bacalbasa N, Dima S, Popescu I. Expression of interleukine-8 as an independent prognostic factor for sporadic colon cancer dissemination. **Clin Cancer Res** 2014;15;20 (22) :5697-5707.

Negri E, La Vecchia C. Epidemiology and prevention of bladder cancer, **European Journal of Cancer Prevention** 2001; 10: 7-14.

Nezos A, Pissimisis N, Lembessis P, Sourla A, Dimopoulos P, Dimopoulos T, Tzelepis K, Koutsilieris M. Detection of circulating tumor cells in bladder cancer patients. **Cancer Treat Rev** 2009;35(3):272-279.

Nieder AM, Porter MP, Soloway MS. Radiation therapy for prostate cancer increases subsequent risk of bladder and rectal cancer: a population based cohort study. **Journal d'Urologie** 2008: 180:2005–2009.

Nojiri K, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Inagaki Y, Kusagawa S, Ogura S, Tanaka J, Yoneda M, Yamamoto N, Okano H, Takei Y, Ito M, Kasai C, Inoue H, Takase K. The expression and function of Toll-like receptors 3 and 9 in human colon carcinoma **Oncology Reports** 2013; (29): 1737-1743.

Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, et al. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. **Oncogene** 2004; 23: 5616–5623.

Oğuztüzün S, Kılıç M, Atay M ve ark. Üriner şikâyeti olan hastalarda idrar sitopatolojisi ile mesane kanseri araştırılması. **Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi** 2009; 66:169-176.

Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler L. Role of TLR2 in infection and immunity. **Frontiers in Immunology** 2012; 3 :79: 1-17.

Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: the epidemiology of bladder cancer. **Nat Clin Pract Urol** 2006; 3: 327–340.

Peterson RO, Sesterhenn IA, Davis CJ. Urologic Pathology. **Williams & Wilkins**, Philadelphia: Lippincott; 2006.

Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, et al. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. **Clin Cancer Res** 2009;15: 6008–6017.

Qian Y, Deng J, Xie H, Geng L, Zhou L, Wang Y, Yin S, Feng X, Zheng S. Regulation of TLR4-induced IL-6 response in bladder cancer cells by opposing actions of MAPK and PI3K signaling. **J Cancer Res Clin Oncol** 2009; (135):379–386.

Qian Y, Deng J, Geng L, Xie H, Jiang G, Zhou L, Wang Y, Yin S, Feng X, Liu J, ZYe Z, Zheng S. TLR4 Signaling Induces B7-H1 Expression Through MAPK Pathways in Bladder Cancer Cells. **Cancer Investigation** 2008; 26, (8) :816-821.

Rezania S, Amirmozaffari N, Rashidi N, Mirzadegan E, Zarei S, Ghasemi J, Zarei O, Katouzian L, Zarnani A. The same and not the same: heterogeneous functional activation of prostate tumor cells by TLR ligation. **Cancer Cell International** 2014, 14: 54.

Ridnour L., Cheng R, Christopher H, Heinecke J, Ambs S, Glynn S, Howard A, Trinchieri G, and Wink D. Molecular Pathways: Toll-like Receptors in the Tumor Microenvironment—Poor Prognosis or New Therapeutic Opportunity. **Clin Cancer Res** 2013;19(6).

Rink M, Chun FK, Minner S, Friedrich M, Mauermann O, Heinzer H, Huland H, Fisch M, Pantel K, Riethdorf S. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. **BJU Int** 2011; 107(10):1668-1675.

Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology Bladder and Male Urethra. **St. Louis Mosby**, 2004, cilt 9 s. 1317-1359.

Samara K, Katerina M. Karagiannis K, Margaritopoulos G, Lasithiotaki I, Koutala E, Siafakas N. Expression profiles of Toll-like receptors in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. **International Journal Of Oncology** 2012; 40: 1397-1404.

Sandholm J and Selander S. Toll-like receptor 9 in breast cancer. **Frontiers in Immunology** 2014 ;(5): 330.

Sankhwar M, Sankhwar S.N. Variations in CYP isoforms and bladder cancer: A superfamily paradigm. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations** 2014; 32 (28): 33–40.

Sanmamed MF, Carranza-Rua O, Alfaro C, Oñate C, Martín-Algarra S, Perez G, Landazuri SF, Gonzalez A, Gross S, Rodriguez I, Muñoz-Calleja C, Rodríguez-Ruiz M, Sangro B López-Picazo JM, Rizzo M, Mazzolini G, Pascual JI, Andueza MP, Perez-Gracia JL, Melero I Serum Interleukin-8 Reflects Tumor Burden and Treatment Response across Malignancies of Multiple Tissue Origins. **J Med Life** 2014; 15; 7(2): 215-219.

Santos M, Mannama V, Craft B, Punecky L, Sheehan N, Lewis R, Cruse J. Comparative analysis of innate immune system function in metastatic breast, colorectal, and prostate cancer patients with circulating tumor cells. **Experimental and Molecular Pathology** 2014; (96) :367–374.

Sarı U. Mesane Tümörü Tedavisinde Radikal Sistektomi Yaklaşımı ile Mesane Koruyucu Yaklaşım Sonuçlarının Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, **Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi**, İstanbul, 2007, s.66.

Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon D. Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenvironment** 2009; (2): 205–214.

Schmausser B, Andrulis M, Endrich S. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with Helicobacter pylori. **Int J Med Microbiol** 2005; 295:179–185.

Schmitz-Drager BJ, Schulz WA, Jurgens B, et al. c-myc in bladder cancer. Clinical findings and analysis of mechanism. **Urol Res** 1997; 25: 45–49.

Schmutte C, Yang AS, Cote R et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. **Cancer Res** 1994; 54(3):784–788.

Sheryka E, Wheeler M, Derek A. Hausladen, and Weiss M. Urinary Interleukin-8 Levels Are Elevated In Subjects With Transitional Cell Carcinoma **Urology** 2003; 62: 162–166.

Shimizu T, Yokota S, Takahashi S, Kunishima Y, Takeyama K, Masumori N, Takahashi A, Matsukawa M, Itoh N, Tsukamoto T, Fujii N. Membrane-Anchored CD14 Is Important for Induction of Interleukin-8 by Lipopolysaccharide and Peptidoglycan in Uroepithelial Cells **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology** 2004: 969–976.

Smith TJ, Yamamoto K, Kurata M, Yukimori A, Suzuki S, Umeda S, Sugawara E, Kojima Y, Sawabe M, Nakagawa Y, Suzuki K, Crawley JT, Kitagawa M. Differential expression of Toll-like receptors in follicular lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. **Exp Mol Pathol** 2010; 89(3):284-290.

Söylemez H, Dinçel Ç. Güncel Literatür Işığında Kas İnvazif Olmayan Mesane Kanserlerinin Tedavisi. **Endoüroloji Bülteni** 2013; 6:155-160.

Spruck CH, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. **Cancer Res** 1994; 54: 784.

Steinmaus CM, Nuftez S, Smith AH. Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables. **Am J Epidemiol** 2000; 151:693–702.

Şen Türk N, Kandemir NO, Bektaş S, Barut F ve ark. Üriner sistem malignitelerinde sitolojinin tanısal önemi. **Türk Onkoloji Dergisi** 2010; 25: 49-56.

Tcho´rzewski M, Lewkowicz P, Dziki A, Tcho´rzewski H. Expression of Toll-Like Receptors on Human Rectal Adenocarcinoma Cells. **Arch Immunol Ther Exp** 2014; (62):247–251.

The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. **Nature** 2014; 507: 315-322.

Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, et al. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. **J Pathol** 2007; 213: 91–98.

Urquidi V, Chang M, Dai Y, Kim J, Wolfson E, Goodison S and Rosser C. IL-8 as a urinary biomarker for the detection of bladder cancer Urquidi et al. **BMC Urology** 2012;12: 2.

Väisänen Mr, Jukkola-Vuorinen A, Katrı S, Katrı S. Selander K, Vaarala M. Expression Of Toll-Like Receptor-9 İs Associated With Poor Progression-Free Survival İn Prostate Cancer. **Oncology Letters** 2013; 5: 1659-1663.

Van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, et al. FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. **Cancer Res** 2004; 64:1911–1914.

Veerla S, Lindgren D, Kvist A, et al. MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. **Int J Cancer** 2009;124:2236–2242.

Villanueva CM, Cantor KP, King WD, Jaakkola JJ, Cordier S, Lynch CF, Porru S, Kogevinas M. Total and specific fluid consumption as determinants of bladder cancer risk. **Int J Cancer** 2006; 118:2040–2047.

Voronov E, Carmi Y, Apte RN. Role of IL-1-mediated inflammation in tumor angiogenesis. **Adv Exp Med Biol** 2007;601:265-270.

Wang AC, Ma YB, Wu FX, Ma ZF, Liu NF, Gao R, Gao Ys, Sheng XG. TLR4 induces tumor growth and inhibits paclitaxel activity in MyD88-positive human ovarian carcinoma *in vitro*. **Oncology Letters** 2014; 7: 871-877.

Wang XW, Wang JX. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. **Fish & Shellfish Immunology** 2013;34 (4): 981-989.

Wang Y, Cao Y, Yang X, Niu H, Sun L, Wang X, Liu J. Effect of TLR4 and B7-H1 on Immune Escape of Urothelial Bladder Cancer and its Clinical Significance. **Asian Pac J Cancer Prev** 2014; 15 (3): 1321-1326.

WEB_1. M. Babjuk, M. Burger, R. Zigeuner, S. Shariat, B. Van Rhijn, E. Compérat, R. Sylvester, E. Kaasinen, A. Böhle, J. Palou, M. Rouprét. http://www.uroweb.org/gls/pdf/05_TaT1_Bladder_Cancer_LR.pdf (son güncelleme tarihi: 28.05.2010, alındığı tarih: 27.11.2014).

WEB_2. Copyright © 2007 American Urological Association Education and Research, Inc. www.emiratesurology.com/.../Bladder-cancer-. (son güncelleme tarihi: 28.05.2010, alındığı tarih: 27.11.2014).

WEB_3. Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2012 Haber Bülteni. <http://www.saglik.gov.tr/tr/dosya/1-86255/h/sihbpdf.pdf> (son güncelleme tarihi: 30.09.2013, alındığı tarih: 27.11.2014).

WEB_4. Cancer Statistics, 2014 –Wiley Online Library. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21208/full>. (son güncelleme tarihi: 30.09.2013, alındığı tarih: 27.11.2014).

WEB_5. The Campbell Family Cancer Research Institute. <http://www.campbellfamilyinstitute.ca/> (son güncelleme tarihi: 30.09.2013, alındığı tarih: 27.11.2014).

Weikert S, H. Krause, I. Wolff, et al. Quantitative evaluation of telomerase subunits in urine as biomarkers for noninvasive detection of bladder cancer. *Int J Cancer* 2005; 117:274–280.

Yang H, Zhou H, Feng P, Zhou X, Wen H, Xie X, Shen H, Zhu X. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010; 29:92.

Yates DR, Rehman I, Abbod M F, et al. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2046.

Yenice M.G. Mesane Üroepitelyal Tümörlerinde Transüretal Rezeksiyon Sonrası Mitomisin-C Ve Bacille Calmette-Guerin Uygulamasının Progresyon (İlerleme) Ve Rekürrense (Nüks) Yönelik Etkinliğinin Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı*, Edirne, 2008, s 56.

Yuan JM, Chan K, Coetzee GA, Castela J.E, A.Watson M, A.Bell D, Wang R ve C.Yu M. Genetic determinants in the metabolism of bladder carcinogens in relation to risk of bladder cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29 (7): 1386–1393.

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004;5:303(5663):1522-1526.

Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110 (alpha) of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2652–2657.

Zhou M, McFarland-Mancini M, M. Funk H, Husseinzadeh N, Mounajjed T, Drew A. Toll-like receptor expression in normal ovary and ovarian tumors. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 1375 –1385.

Zhou H, Chen J, Hu J, Luo Y, Xiao L, Zhong M. High expression of Toll-like receptor 5 correlates with better prognosis in non-small-cell lung cancer: an anti-tumor effect of TLR5 signaling in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014; (140):633–643.

Zhou S, Li F, Qiao Y, Zhang X, Wang Z. Toll-like Receptor 5 Agonist Inhibition of Growth of A549 Lung Cancer Cells in Vivo in a Myd88 Dependent Manner. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2012; 13: 2807-2812.

Zietarska M, Maugard CM, Filali-Mouhim A, Alam-Fahmy M, Tonin P, Diane M. Provencher, Mes-Masson A. Molecular Description of a 3D In Vitro Model for the Study of Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *Molecular Carcinogenesis* 2007; 46: 872–885.

ÖZGEÇMİŞ

10.01.1985 tarihinde Manisa'da dünyaya gelen Seda SABAH ÖZCAN, ilköğretimini Murat Germen İlköğretim okulunda, orta ve lise öğretimini Dünder Çiloğlu Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Yüksek öğrenimine Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde devam ederek, 2008 yılında lisans diploması almaya hak kazandı ve 2008 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamlayarak doktora eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce'dir, evlidir.