



T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İNTRAVEZİKAL OZON TEDAVİSİNİN

**DENEYSEL ERKEK SIÇAN MESANE KARSİNOGENEZİS MODELİNDE
OKSİDAN (NİTRİK OKSİT, MALONDİALDEHİT, MYELOPEROKSİDAZ) ve
ANTIOKSİDAN (GLUTATYON ve SÜPEROKSİT DİSMUTAZ) FAKTÖRLER
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Kerem TEKE

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

KOCAELİ-2015

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İNTRAVEZİKAL OZON TEDAVİSİNİN
DENEYSEL ERKEK SIÇAN MESANE KARSİNOGENEZİS MODELİNDE
OKSİDAN (NİTRİK OKSİT, MALONDİALDEHİT, MYELOPEROKSİDAZ) ve
ANTIOKSİDAN (GLUTATYON ve SÜPEROKSİT DİSMUTAZ) FAKTÖRLER
ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Kerem TEKE

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özdal DİLLİOĞLUGİL

Anabilim Dalı Başkanı: Prof. Dr. Nazım MUTLU

Etik Kurul Onayı: 25.03.2014/ KOÜ HADYEK 3/4-2014 / PROJE NO: 17

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her türlü teorik, pratik bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan, mesleki ufukumun gelişmesinde büyük payları olan ilk Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Ali Gökalp'e, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nazım Mutlu'ya, Prof. Dr. Özdal Dillioğlugil'e, Prof. Dr. Melih Çulha'ya, Prof. Dr. Cüneyd Özkürkçügil'e, Doç. Dr. Levend Özkan'a ve Yard. Doç. Dr. Hasan Yılmaz'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu tezin hazırlanmasında bana verdiği her türlü destek ve güven nedeniyle Prof. Dr. Özdal Dillioğlugil'e ayrıca saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmanın başından beri bana katkılarında dolayı Patoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Kürşad Yıldız, Biyokimya Anabilim Dalından Prof. Dr. Meltem Ö. Dillioğlugil ve Dr. Tayyar Alp Özkan'a teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, asistanlık yıllarımı birlikte geçirdiğim değerli arkadaşlarım ve ağabeylerim Dr. Turgay Güleçen, Dr. Ufuk Yavuz, Dr. Murat Üstüner, Dr. Seyfettin Çiftçi, Dr. Serkan Aynur, Dr. Emrah Şimşek, Dr. Mustafa Yüksekaya, Dr. Ali Kemal Uslubaş, Dr. M. Esad Kösem, Dr. Ersin İlgüz, Dr. Zebur Bagirov ve Dr. Emre Sevgilioğlu'na ve yardımlarından ötürü tüm servis ve ameliyathane personeline teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü fedakarlıklarla beni yetiştiren, her zaman destek olan değerli annem ve babama ayrıca her zaman yanımda olan sevgili eşime teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Kerem TEKE

İçindekiler

TEŞEKKÜR	3
ŞEKİL DİZİNİ	7
TABLO DİZİNİ	8
KISALTMA DİZİNİ	9
1.GENEL BİLGİLER.....	12
1.1.MESANE ANATOMİSİ	12
1.2.MESANE HİSTOLOJİSİ	13
1.3.MESANE NEOPLAZMLARININ PATOLOJİSİ	15
1.3.1. İnvaziv Olmayan Ürotelyal Neoplazmlar.....	16
1.3.2. İnvaziv Ürotelyal Neoplazmlar:	19
1.3.3. Skuamöz Hücreli Karsinom (SHK) :.....	21
1.3.4. Adenokarsinom:	21
1.3.5. Küçük Hücreli Karsinom:.....	21
1.3.6. Metastatik tümörler:	22
1.4 MESANE KANSERİNDE KLİNİK VE TANI	22
1.4.1. Öykü	22
1.4.2. Fizik Muayene	22
1.4.3. Görüntüleme ve Tanısal Yöntemler	22
1.5.KİOMK'da Tedavi	23
1.5.1. TUR-MT	23
1.5.2. Adjuvan İntravezikal Tedavi	24
1.6.OZON TEDAVİSİ	26
1.6.1. Ozon Nedir?	26
1.6.2. Ozon Molekülünün Davranışsal Özelliği	26
1.6.3. Ozonun Tıpta Kullanımı	27
1.6.4. Ozonun Antioksidan Mekanizması	28
1.6.5. Ürolojide Ozon Kullanımı	29
1.7. OKSİDATİF STRES ve KANSER	30
1.7.1. Biyolojik Sistemlerde SOR Fonksiyonu	31
1.7.2. SOR'un Zararlı Etkileri	31
1.7.3. SOR'un Kaynakları	31

1.7.4. Hücresel Antioksidan Sistemler	31
1.7.5. SOR'un Hasarlayıcı Etkisi	32
1.7.6. Kanserde SOR Aracılığıyla Düzenlenen Sinyal Yolakları.....	32
1.7.7. Kanser Dokusunda SOR Fonksiyonları.....	32
1.7.8. Kanser Tedavisinde ve Korunmasında Antioksidan ve SOR Uygulamaları	33
1.8.DENEYSEL MESANE KARSİNOGENEZİ.....	33
1.8.1. Ksenojenik (xenograft) Hayvan Modeli	33
1.8.2. Sinojenik Hayvan Modelleri.....	34
1.8.3. Heterotropik Hayvan modelleri.....	34
1.8.4. Ortotropik Modeller.....	35
2.GİRİŞ	43
3.GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Optimal Anestezi, Erkek Sıçan Kateterizasyon ve İnstilasyon Tekniği (Şekil 5).....	47
3.2. Denekler, Deney Grupları ve Deneysel Plan.....	45
3.3. Sakrifikasyon ve Sistektomi	53
3.4. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analiz	54
3.5. Biyokimyasal Analiz	55
3.5.1. Olguların Seçimi ve Örneklerin Toplanması.....	55
3.5.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	55
3.5.3. Doku Protein Düzeyi Ölçümü	55
3.5.4. Doku MDA Düzeyi Ölçümü	57
3.5.5. NO Düzeyi Enzimatik Yöntemle Ölçümü.....	57
3.5.6. Doku GSH Düzeyi Ölçümü (Ellman Yöntemi).....	57
3.5.7. Doku SOD Aktivite Ölçümü	58
3.5.8. Doku MPO Ölçümü.....	58
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	58
4.BULGULAR	59
4.1. Histopatolojik Değerlendirme	59
4.2. Proliferatif İndeks Tayini	62
4.3. Biyokimyasal Bulgular.....	64
5. TARTIŞMA.....	66
6.ÖZET.....	73
7.ABSTRACT	75



ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Ozon Molekülünün Yapısı	26
Şekil 2. Serbest Oksijen Radikallerinin Moleküler Yapısının Gösterilmesi	30
Şekil 3. Mesane tümör derecesine göre moleküler değişiklikler	38
Şekil 4. Erkek sıçan ürogenital anatomisi	42
Şekil 5. Sakrifiye edilmemiş canlı erkek sıçan instilasyonun metilen mavisi ile gösterilmesi.....	47
Şekil 6. Sistektomi materyali (çevre dokularla birlikte çıkartılmış).....	49
Şekil7. Ozonasan Phototonik 1014 ozon jeneratörü.....	51
Şekil 8. MNU biyokimyasal formülü	52
Şekil 9. Sistektomi spesimeninde mesane kubbeden ikiye ayrılmış şekilde görüntüsü.....	53
Şekil 10. MNU ve MNU+ozon alan dokuların makroskopik görüntüsü	54
Şekil 11. Normal, preneoplastik ve neoplastik lezyonların dağılımı.....	60
Şekil 12. Üretelyum ve stromal hücrelerin HE boyamayla gösterilmesi	61
Şekil 13. Proliferatif indeks hesaplanması için kullanılan görüntüler	63
Şekil 14. Gruplarda Oksidan-antioksidan parametrelerin karşılaştırılması.....	65

TABLO DİZİNİ**Sayfa No**

Tablo 1. Düz lezyonlar için DSÖ'nün 2004 derecelendirme sistemi	15
Tablo 2. Papiller lezyonlar için DSÖ'nün 1973 ve 2004 derecelendirme sistemi	16
Tablo 3: TNM evreleme sistemi	17
Tablo 4. Tümör özelliklerinin risk gruplarına göre ayrılması	24
Tablo 5. Ortotropik mesane kanseri oluşturma yöntemlerinin karşılaştırılması.....	40
Tablo 6. MNU'nun indüklediği Mesane Kanseriogenezisin olduğu Çeşitli çalışmalar.....	41
Tablo 7. Deneyde kullanılan anestezi ve karsinojenler ile sıvıların dozu ve sıklığı.....	48
Tablo 8. Biyokimyasal Gereçler.....	55
Tablo 9. Çözeltiler ve miktarları.....	57
Tablo 10. Folin Ayracı	57
Tablo 11. Deneyde hayatta kalan ve ölen sıçanların dağılımı	59
Tablo 12. Preneoplastik, neoplastik ,normal üreteriyum dokularının dağılımı.....	60
Tablo 13. Gruplara göre ayrıntılı histopatolojik dağılım	62
Tablo 14. Gruplara göre proliferatif indeks dağılımı	63
Tablo 15. Oksidan ve antioksidan parametrelerin gruplara göre dağılımı.....	64

KISALTMA DİZİNİ

A.B.D.: Amerika Birleşik Devletleri

AUA: American Urological Assosiation (Amerikan Üroloji Birliği)

BCG: Bacillus Calmette Guarin

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CIS: Carsinoma in situ

Cm: Santimetre

DETAB: Deneysel tıbbi araştırma birimi

DDPÜK: Düşük Dereceli Papiller Üretelyal Karsinom

DMPPÜN: Düşük Malign Potansiyelli Papiller Üretelyal Neoplazm

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

E. coli: Escherichia coli

EAU: European Assosiation of Urology (Avrupa Üroloji Birliği)

EHBN: N-Etil-N-(4-hidroksibutil)

FANFT: N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide

FICBT: First Concultation on Bladder Tumors (Mesane Tümörlerinde İlk Değerlendirme)

GSH: Glutasyon

GPX: Glutasyon Peroksidaz

HADYEK: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

H.E.: Hemotoksilen-Eozin

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

iNOS: İndükleyici Nitrik Oksit Sentaz

İ.P.: İntraperitoneal

I.U: Internasyonel ünite

İVÜ: İntra venöz üretrografi

KİMK: Kasa invaze mesane kanseri

KİOMK: Kasa invaze olmayan mesane kanseri

LP: Lamina Propria

MDA: Malondialdehit

MNU: N-metil-N-nitrosourea

MP : Muskularis propria

MPO: Myeloperoksidaz

NAC: N-asetil sistein

NCCN: National Comprehensive Cancer Network (Ulusal Katılımlı Kanser Birliği)

NK hücreleri: Natural Killer (Doğal Öldürücü) Hücreler

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentetaz

O₂⁻: Süperoksit radikali

O₃: Ozon

OH-BBN: N-butyl-N-(4-hidroksibutil) nitrosamine

OHT: Otohemoterapi

pTa: Üretelyum mukozasında sınırlı tümör

pT1: Lamina propriaya invaze tümör

SHK:Skvamöz Hücreli Karsinom

SOD: Superoksit Dismutaz

SOR: Serbest oksijen radikalleri

Str: Stroma

TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa

TUR: Transüretral rezeksiyon

TUR-MT:Transüretral rezeksiyon- Mesane tümörü

USG: Ultrasonografi

UV: Ultraviole

ÜR: Üretelyum

YBMD: Yaşa Bağlı Maküler Dejenerasyon

YDPÜK: Yüksek dereceli papiller üretelyal karsinom

1.GENEL BİLGİLER

1.1.MESANE ANATOMİSİ

Erişkinde boş olduğu zaman pelvis içindedir. Dolu olduğu zaman ise üst duvarı hipogastrik bölgeye doğru yükselir. Küçük çocuklarda mesane, boş iken de pelvis giriminin üstünde kalır; daha sonra pelvis boşluğu genişledikçe mesane pelvis içine doğru gömülür ve erişkindeki konumuna gelir (1).

Posterior yüzey, kadınlarda uterus serviksi ve vajina üst kısmı ile komşudur. Erkeklerde, rektumla aralarında vezika seminalisler ve vas deferensin ampullaları bulunur. Mesane tümörlerinde bu anatomik yapıların tutulumu prognozu etkilediğinden, posterior yüzeyin anatomik ilişkileri klinik açıdan önemlidir. Mesane apeksi üst yüzey ile inferolateral yüzeylerin birleşim yeridir ve median umblikal ligamentin başlangıç noktası olup sinfisis pubisin üst kenarının arkasında ön tarafa yakın olarak bulunur. Median umblikal ligament (urakus), ekstraperitoneal yağ dokusu içinde göbeğe kadar uzanır ve ligamentum umblikale medianumu meydana getirir. Urakal karsinomlar buradan gelişir (2).

Trigon, mesane tabanına lokalizedir ve mesane boynunun arkasına uzanır. Bu bölgede üreterler oblik olarak mesaneye girerler. Bu bölgenin kompleks anatomik yapısı nedeniyle mesane dolunca bir kapak vazifesi görerek idrarın tekrar üretere geçişi engellenir. Mesanenin en distal parçası mesane boynu olup, erkeklerde prostat glandı ile birleşir (2).

Mesanenin üst yüzü tamamen peritonla kaplıdır ve sigmoid kolonla veya ileum anslarıyla komşudur. Bu yüzün lateral kenarları boyunca periton pelvis yan duvarlarına atlar. Mesane dolduğu zaman ovoid bir şekil alır ve üst yüz karın boşluğuna doğru yükselir. Karın ön duvarının alt kısmındaki periton örtüsünü de kaldırdığı için mesanenin ön yüzü doğrudan karın ön duvarı ile temas eder hale gelir. Mesanenin inferolateral yüzü ise, önde retropubik aralıktaki (spatium retropubicum) yağ dokusu ve pubis kemikleri ile komşudur. Biraz arkada ise yukarıda obturator interna kası ile aşağıda levator ani kası arasında yer alır (2).

Mesane boynu, aşıya doğru uzanarak prostatın üst yüzüne oturur. Burada mesanenin düz kas lifleri, prostatın düz kas lifleri şeklinde devam eder. Mesane boynu, erkekte ligamentum puboprostatika, kadınlarda ise ligamentum pubovesikale aracılığıyla asılı konumda durur. Bu bağlar pelvis fasyasının kalınlaşması ile oluşur. Mesanenin üst dış köşeleri üreterlerle birleşir, alt köşeden ise üretra başlar (1).

Mesane arterlerini internal iliak arterin dalları olan arteria vesikalis süperior ve arteria vesikalis inferiordan alır. Mesane venleri esas olarak internal iliak vene açılır. Lenfatik drenaj internal ve eksternal iliak lenf nodlarına olurken, mesane boyun bölgesinin drenajı sakral veya iliak komminus lenf bezlerine direne olur .

Mesanenin inervasyonu, inferior hipogastrik pleksustan sağlanır. Birinci ve ikinci lumbal gangliondan kaynaklanan postganglioner sempatik lifler, hipogastrik pleksusları takip ederek mesaneye inerler. Preganglionik parasempatik lifler ikinci, üçüncü ve dördüncü sakral sinirlerden kaynaklanan nervi splanchnici pelvini şeklinde başlarlar, pleksus hipogastrikus inferiordan geçerek postganglionik nöronlarla sinaps yaptıkları yer olan mesane duvarına ulaşırlar. Mesaneden gelen afferent sensitif liflerin büyük çoğunluğu, nervi splanchnici pelvini yolu ile santral sinir sistemine ulaşır. Bazı sensitif liflerin afferentleri ise, hipogastrik pleksus içinde sempatik sinirlerle birlikte yol alır ve birinci, ikinci lumbal segmentlerden medulla spinalise girerler. Sempatik sinirler mesane duvarının detrusor kas kontraksiyonunu inhibe ederken, musculus sphincter vesicanın kapanmasını stimüle ederler. Parasempatik sinirler mesane duvarının detrusor kasını uyarırken, musculus sphincter vesicanın kapanmasını inhibe ederler (1)

1.2.MESANE HİSTOLOJİSİ

Mesane duvarı dört tabakadan oluşmuştur:

a.Epitel (urotelyum)

b.Lamina propria

c.Muskularis propria

d.Adventisya/ seroza

a. Üretelyum; Mesane, ureterler, renal pelvis ve kalikslerin histolojik yapısı aynıdır. Bu organların mukozası çok katlı değişken (transizyonel) epitel ile döşelidir. Transizyonel epitel terimi, epitelin histolojik görünümünün keratinize olmayan skuamöz ve psödostratifye kolumnar epitel arasında bir geçiş göstermesi nedeniyle kullanılmıştır. Mesane boş iken epitel kalınlığı 5-6 sıradır, dolu olduğu zaman ise epitelium kalınlığı 3-4 sıra olur ve yüzeydeki hücreler yassılaştır. Epitelde, yüzeyel hücreler, intermediyer hücreler ve bazal hücreler olmak üzere, üç hücre tabakası vardır (3, 4). Yüzeyel hücreler, üriner boşluk ile ilişkili olup büyük, eliptik ve şemsiye benzeri görünümündedirler. İntermediyer hücrelerden daha küçük olan bu hücreler, çift çekirdekli ve yoğun eozinofilik stoplazmaya sahiptirler. İntermediyer hücreler boş mesanede beş hücre kalınlığındadırlar ve bazal membran uzunluğuna dik olarak uzanırlar. Nükleusları, yuvarlak olup ince granüler kromatine sahiptir. Sitoplâzmaları geniş ve vakoullü olabilir. Bu hücreler desmozomlarla birbirleri ile bağlantılı olup stoplazmik membranları belirgindir. Mesanenin dolu olduğu bölgelerde ise bu tabaka seçilemeyebilir veya sadece bir hücre kalınlığında ve düzleşmiş olarak görülür. Bazal tabaka sadece boş mesanede bulunan ve küboidal hücrelerden oluşan ince bir tabaka halinde izlenir(3, 4).

b. Lamina Propria; Lamina propria (LP), mukozal bazal membran ile muskularis propria arasında uzanır. Damar yapılarından zengin olup lenfatik kanallar, duyuşal sinirler ve bir miktar elastik lif içeren gevşek bağ dokusundan meydana gelir. Mesane ve ureterde lamina propria gevşek olduğundan mesanenin kasılması kalın mukozal katlanmalara neden olur. Mesanenin lamina propriasının orta kısmında ise orta büyüklükte arter ve venler bulunur. Lamina propriada bulunan düz kas demetleri sıklıkla bu damarlar ile ilişkili olup muskularis propria ile ilişkili değildir. Bunlar izole bantlar şeklinde görülebileceği gibi sürekli kalın bir kas tabakası şeklinde de görülebirlirler (3, 4). Muskularis mukozanın ince ve devamlılık göstermeyen kas lifleri muskularis proprianın kalın fasikülleri ile karıştırılmamalıdır. Lamina propria'daki bu kas lifleri yaklaşık olarak orta bölgede yerleşirler, yüzeye paralel uzanırlar ve sıklıkla ince duvarlı damarlar ile birlikte dirler. Tümörün evresini ve tedavisini etkilemesi nedeniyle cerrahi ve biyopsi materyallerinde muskularis propria ve yüzeyel kas demetlerinin ayrımı önemlidir(3, 4).

c. Muskularis Propria; Muskularis propria(MP), içte ve dışta longitudinal, ortada sirkuler olmak üzere üç tabaka halinde düz kas demetlerinden oluşur. Gerçekte bu tabakalar sadece mesane boynunda devamlılık gösterir. Diğer bölgelerde bu longitudinal ve sirkuler tabakalar birbirlerine karışır halde bulunur ve uzanımları belirsizdir(3, 4). Erkeklerde mesane boynunda MP demetleri, prostatın fibromuskuler dokusuna kadar devam ederken, kadınlarda üretra duvarı içinde kas fibrilleri ile devam eder. Diğer tabakalarda olduğu gibi MP'nın kalınlığı kişiden kişiye, yaşa ve dolgunluğunun derecesine bağlı olarak değişiklik gösterir. Evreleme için MP' nın yüzeysel ve derin olarak iki segmente ayrılmasında anatomik bir belirteç yoktur (3, 4).

d. Adventisya/Seroza; Mesanenin en dış tabakası bağ dokudan oluşan adventisya'dır. Sadece üst tarafta üzeri pelvik periton tarafından çevrilidir (3, 4),

1.3.MESANE NEOPLAZMLARININ PATOLOJİSİ

Mesane Kanseri üriner sistemindeki en sık görülen malignite olup, Ürotelyal karsinoma (Transizyonel) Avrupa ve Amerika Birleşik Devletler (A.B.D)'deki en sık görülen tiptir. Mesane kanserlerinin %90'ı ürotelyal kanserdir. Dünyanın bazı bölgelerinde ise ürotelyal olmayan kanserler daha sık görülebilmektedir. Ürotelyal kanserler daha az sıklıkta renal pelvis, ureter ya da uretradan köken alabilir (5).

DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) 2004 derecelendirme sistemi (düz lezyonlar)

Hiperplazi (atipi ya da papiller görünüm olmadan)

Reaktif atipi (atipiyle birlikte düz lezyon)

Anlamı bilinmeyen atipi

Ürotelyal Displazi

Ürotelyal Carcinoma in situ (devamlı malign)

Tablo 1. Düz lezyonlar için DSÖ'nün 2004 derecelendirme sistemi.

1973 DSÖ Derecelendirme

Üretelyal Papillom

Grade 1: iyi diferansiye

Grade 2: orta diferansiye

Grade 3: kötü diferansiye

2004 DSÖ Derecelendirme sistemi [papiller lezyonlar]

Üretelyal papillom (tamamen benign lezyon)

Düşük Malign Potensiyelli Papiller Üretelyal Neoplazm (DMPPÜN)

Düşük dereceli papiller üretelyal karsinom (DDPÜK)

Yüksek dereceli papiller üretelyal karsinom (YDPÜK)

Tablo 2: Papiller lezyonlar için DSÖ'nün 1973 ve 2004 derecelendirme sistemi.

DSÖ tarafından mesane lezyonları düz ve papiller olarak ayrılmış ve derecelendirme sistemleri **Tablo 1** ve **Tablo2**'de özetlenmiştir..

2009 yılında TNM (Tümör, lenf nodu, Metastaz) evreleme sistemine göre mesane kanseri evreleme sistemi de **Tablo 3.**'de gösterilmiştir.

1.3.1. İnvaziv Olmayan Ürotelyal Neoplazmlar

Lamina propria invazyonu yapmamış lezyonlardır. Düz ve papiller olmak üzere ikiye ayrılır.

1.3.1.1. Düz lezyonlar: Displazi ve CIS'ı içerir.

Displazi: Düşük dereceli intraepitelyal neoplazi olarak da bilinir. Primer displazi, sıklıkla CIS ya da invaziv üretelyal karsinom olmayan, irritatif şikayetleri olan, hematürili ya da hematürisiz, orta yaş erkeklerde görülmektedir. Displazi olgularının %5-20'si CIS ya da invaziv üretelyal karsinoma ilerlerler. Displazi sıklıkla yüksek dereceli ürotelyal karsinom ile ilişkili olup, invaziv ürotelyal karsinomlu hastaların %100'ünde bulunmaktadır (5).

T – Primer Tümör
<p>TX Primer tumor saptanmamış</p> <p>T0 Primer tumor izlenmedi</p> <p>Ta İnvaziv olmayan papiller karsinom</p> <p>Tis Carcinoma in situ (CIS) , ‘düz tümör’</p> <p>T1 Subepitelyal bağ dokuya invazyon</p> <p>T2 Kasa invaze tümör</p> <p style="padding-left: 40px;">T2a Tümör yüzeysel kas dokuya invaze olmuş</p> <p style="padding-left: 40px;">T2b Tümör derin kas dokusuna invaze olmuş</p> <p>T3 Tümör perivezikal dokuya invaze olmuş</p> <p style="padding-left: 40px;">T3a Mikroskopik olarak</p> <p style="padding-left: 40px;">T3b Makroskopik olarak (ekstravezikal kitle)</p> <p>T4 Tümör çevre dokuya invaze olmuş</p> <p style="padding-left: 40px;">T4a Tümör prostat, uterus ya da vajinaya invaze olmuş</p> <p style="padding-left: 40px;">T4b Tümör pelvik ya da abdominal duvara invaze olmuş</p>
N – Lenf Nodu
<p>NX Tespit edilemeyen bölgesel lenf nodları</p> <p>N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok</p> <p>N1 Aynı taraf pelviste tek bir metastatik lenf nodu (hipogastrik, obturator, eksternal iliak, or presakral)</p> <p>N2 Aynı taraf pelviste multiple metastatik lenf nodu (hipogastrik, obturator, eksternal iliak, or presakral)</p> <p>N3 Bilateral metastatik iliak lenf nodları</p>
M – Uzak Metastaz
<p>MX Uzak metastaz bilinmiyor</p> <p>M0 Uzak metastaz yok</p> <p>M1 Uzak metastaz var</p>

Tablo 3. TNM evreleme sistemi.

CIS: Diğer bir adı yüksek dereceli intraepitelyal neoplazidir. Ürotelyal neoplazmların %1-3’ünü oluşturur. Daha çok invaziv ürotelyal tümörlü 45-65 yaş erkeklerde, CIS alanları görülebilmektedir. CIS’lı hastalar asemptomatik olabileceği gibi, irritatif mesane

semptomlarına da sahip olabilirler. Üriner sistemde CIS sıklıkla çok odaklı olup, senkronize ve metakronize olabilir. Endoskopik olarak düzensiz hiperemik mukoza şeklinde görülebilir (5).

1.3.1.2. Papiller Lezyonlar: DSÖ'nün 2004 Derecelendirme Sistemine göre papiller lezyonlar **Tablo 2.'** de özetlendi. Bunlar: Ürotelyal papillom, inverted papillom, Düşük Malign Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplazm (DMPPÜN), düşük ve yüksek dereceli ürotelyal karsinom.

Ürotelyal Papillom: Mesane tümörlerinin %1-4' ünü oluşturur. Papillomlar genellikle genç hastalarda görülebileceği gibi çocuklarda da görülebilir. Ürotelyal papillomlar sıklıkla arka ve yan duvar yerleşimli olup ureter orifislerine yakın komşuluktadır. Ürotelyal papillomlar nadiren rekürrens ya da progresyon gösterirler (5).

Inverted Papillom: Mukozadan köken alan stromaya doğru gelişen benign tümörlerdir. Tipik olarak 50-60'lı yaş erkek hastalarda görülen, ürotelyal tümörlerin %1' inden daha azını kapsayan, tipik olarak hematüri ve irritatif şikayetlere sebep olan bazen obstrüksiyon semptomlarına sebep olan tümörlerdir. Sistoskopi'de, Inverted papillomların çoğu sapsız, yüzeyi düzgün, pedünkülü olabilen, nadiren polipoid görünmektedir. Çoğu inverted papillom 8 santimetreye kadar genişleyebilen solid tümörlerdir. Ancak benign karakterli bu tümörler nadiren rekürrens gösterirler (5).

DMPPÜN; Normal hücrelere göre hücre dansitesi artmış, şemsiye hücre tabakası korunmuş, nadiren de olsa mitozu sadece bazal hücrelerde sınırlanmış lezyonlardır. DMPPÜN %30-40 oranında rekürrens gösterir (5).

Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom (DDPÜK); Genellikle düzenli bir görünüme sahip ürotelyum ile döşeli papiller neoplazmdir. DMPPÜN ile karşılaştırıldığında küçük büyütmede bile kolaylıkla tanımlanabilen yapısal ve sitolojik değişiklikler görülür. Sıklıkla dallanmalar ve minimal kaynaşma gösteren, nükleer polarite değişiklikleri içeren ince uzun papiller yapılardan oluşur. Çekirdekçik belirginliği görülebilir. Mitoz, epitelin genellikle alt yarısına lokalize olmakla birlikte herhangi bir seviyesinde görülebilir ancak sayıca azdır. Papiller yapıları değerlendirirken, özellikle uzun eksene dikey gelen kesitleri değerlendirmek uygundur. Özellikle papiller uzantıların tabanına yakın bölgelerden geçen tanjansiyel kesitlerin görünümü hatalı değerlendirmelere yol açabilir. DDPÜK, Erkeklerde kadınlara göre

daha sık (E/K: 2,9 /1) görülür. Tümör rekürrensi % 48-71 oranında bildirilmektedir. Evre progresyonu %10 oranında görülür ve tümör nedenli ölüm oranı %5'tir (6).

Yüksek Dereceli Papiller Üretelyal Karsinom (YDPÜK): Orta ve/veya belirgin derecede yapısal ve sitolojik atipi ile birlikte düzensiz sıralanma gösteren, birleşme eğiliminde papiller yapılardan oluşan tümörlerdir. Yapısal ve sitolojik anormallikler küçük büyütmede bile fark edilebilir. Çekirdekler pleomorfik olup, belirgin polarite kaybı mevcuttur. Çekirdekçikler belirgindir. Epitelin her seviyesinde görülebilen atipik mitozlar sıktır. Üretelyumun kalınlığı farklılık gösterebilir. Komşu mukozada sıklıkla CIS odakları eşlik eder. Bu tümörler endoskopik olarak tek veya multipl olabilirler. Papiller, nodüler veya solid gelişim gösterebilirler. YDPÜK' lerde invaziv hastalığa progresyon riski, DDPÜK' lere göre yüksektir (% 15-40). Ayrıca tanı anında invaziv olma oranı da daha yüksektir (6).

1.3.2. İnvaziv Ürotelyal Neoplazmlar: Bazal membranın altına invazyon yapmış ürotelyal karsinomun patolojik tanımıdır. Yüksek dereceli ve yüksek evreli ürotelyal karsinomlar sıklıkla skuamöz veya glandüler yapılar içerir. DSÖ tarafından histolojik alt tipler tanımlanmıştır.

1.3.2.1. Skuamöz Diferansiasyon: Renal pelvis ürotelyal tümörlerin %44' ünde, mesane ürotelyal tümörlerin %20' sinde skuamöz diferansiasyon görülür. Skuamöz diferansiasyon'un gösterilmesi prognozu etkilemese de, bu tümörler kemoterapi ve radyoterapiye daha az duyarlıdır. Bu tümörlerin tanısında interselüler köprüler ve keratinizasyon olması gereklidir. (5)

1.3.2.2. Glandüler Diferansiasyon: Olguların %6 'sında olup ürotelyal komponentle birlikte glandüler boşlukların görülmesi tanıyı destekler. Ürotelyal karsinomda müsinöz pozitiflik ve glandüler diferansiasyon prognozu etkilememektedir. Ayrıca yapılacak tedaviye yanıt bilinmemektedir (5).

1.3.2.3. Nested Varyant: Üretelyum'un LP altına invaginasyonu sonucu Von Brunn adaları oluşur. Von Brunn adalarının LP'yı infiltre etmesine benzeyen benign görünümlü nadir görülen agresif neoplazmdır. Lezyonun derin tabakalarında artmış atipik hücreler, düzensiz invazyon yapmış kalabalık hücre adacıkları vardır. Erkeklerde daha fazla görülen bu lezyon tipinde, tedaviye rağmen olguların %70'i tanıdan sonraki 3-4 yıl içinde ölmektedir (5).

1.3.2.4. Mikrokistik Varyant: Mikrokistler, makrokistler ya da tübüler yapılar ile karakterize, mikroskopik olarak kist çapının 2 cm' ye kadar ulaştığı tümörlerdir. Kistler ya da tübüller boş olabilir, nekrotik debris içerebilir, ya da müsin ile dolu olabilirler (7). Mikrokistik varyant sıklıkla nested varyant ile birlikte görülmektedir. Mesanenin primer adenokarsinomu ile ilişkisi yoktur (5).

1.3.2.5. Mikropapiller Varyant: Nadir görülür. Ortanca görülme yaşı 70 olup erkeklerde daha siktir. Bu tümörler tipik olarak yüksek dereceli, ileri evre ve kötü prognoz göstermektedir. Mikropapiller varyant kötü prognostik faktör olarak nitelendirilir (5)

1.3.2.6. Lenfoepitelyoma benzeri varyant: Nazofarinks lenfoepitelyomasına benzeyen ancak Epstein Barr Virüs negatif olan, toplamda 40 vakadan az tanımlanmış tümörlerdir. Daha çok erkeklerde ve ileri yaşta görülür. Makroskopik olarak soliter, sesil bir lezyon olup, genellikle trigon, kubbe ve arka duvarı tutar. Tümör adalar, tabakalar ve kordonlar oluşturan, büyük pleomorfik çekirdekli, belirgin çekirdekçiye sahip, sitoplazmik sınırları net seçilemeyen sinsityal görünümde anaplastik hücrelerden oluşur. Zeminde B ve T lenfositleri, histiyositler, plazma hücreleri ve seyrek eozinofil ve nötrofil lökosit içeren lenfoid bir stroma vardır. Tek başına görülebileceği gibi, mikst olarak da bulunabilir. Tek başına olduğunda daha iyi prognoza sahiptir (6, 7).

1.3.2.7. Lenfoma Benzeri ve Plazmasitoid Varyant: Literatürde sadece birkaç vakadan bahsedilmiştir. Malign lenfoma ve plazmositoma benzeyen malign ürotelyal karsinom hücreleridir. Plazma hücre belirteci CD138 pozitifliği gösteren bu hücreler ayrıca GATA3

gibi ürotelyal belirteci de eksprese ederler. Kısa sürede metastatik progresyon olup kısa hayatta kalım süresi mevcuttur (5).

1.3.2.8.Sarkomatoid Varyant: Literatürde 100'den fazla vaka bildirilmiş olup son çalışmalar tüm mesane karsinomlarının %0,6' sının sarkomatoid karsinom ve karsinosarkom olduğunu göstermişlerdir. Uzak ve yakın organ metastazları olup tanıdan sonra 48 ay gibi bir sürede hasta kaybedilmektedir (5).

1.3.3. Skuamöz Hücreli Karsinom (SHK) : Avrupa ve Kuzey Amerika'da mesane kanserlerinin %5'inden daha az görülmektedir. *Schistosoma haematobium* infeksiyonunun endemik olduğu bölgelerde SHK görülme oranı % 75'i geçmektedir. Bu tümörlerin yüzeyi nekrotik ve keratin debris ile kaplıdır. SHK tanısı genelde ileri evrede konur. Hastalarda radikal sistektomi ve pelvik lenf nodu diseksiyonu önemli bir hayatta kalım oranı sağlamaktadır (5).

1.3.4. Adenokarsinom: Pür glandüler fenotip göstermektedir. Bu tümörler mesane ürotelyumundan gelişirse urakal olmayan adenokarsinom adını alırlar. Mesane'nin her bölgesinde olabilir. Adenokarsinoma in situ tek başına ya da invaziv adenokarsinom ile bulunabilir. Adenokarsinomlar urakus artığından gelişirse buna urakal-adenokarsinom denir. Tipik olarak mesane kubbesinde yerleşir. Mesaneye invazyon yapmış kolorektal ya da prostat karsinomu ayırıcı tanıda düşünölmeli, CD20 gibi mesane adenokarsinomunda pozitif olan belirteçler tanıda kullanılmalıdır (5).

1.3.5. Küçük Hücreli Karsinom: Akciğerin küçük hücreli kanserine benzeyen kötü diferansiye nöroendokrin tümör olup malign potansiyel taşır. CD56, kromogranin ve Nöron Spesifik Enolaz pozitifliği vardır. Polipoid ve soliter kitle olarak görünüp sıklıkla mesane duvarına invaze ederler. Mesane kubbe ve yan duvarda olabilecekleri gibi olguların %5'inde divertikül içinden de gelişim olmaktadır (5).

1.3.6. Metastatik tümörler: Komşu organların direk invazyonuyla (sekonder tümörler) ya da uzak dokulardan metastaz yoluyla mesanede metastatik tümörler gelişebilir. Malign tümörlerin yaklaşık %15'i sekonder tümörler olup, kolon, rektum, serviks uteri ve prostat dokusundan invazyon oluşur. İnvazyon trigona ya da mesane boynuna doğru olmaktadır (5).

1.4 MESANE KANSERİNDE KLİNİK VE TANI

1.4.1. Öykü

Mesane kanserinde en sık görülen şikayet ağrısız hematüridir ve hastaların yaklaşık % 85'inde görülür (8). Mesane irritabilitesi, sık idrara çıkma, ani sıkışma hissi ve dizüriden oluşan semptomlar, ikinci en sık görülen geliş şeklidir ve yüzeysel mesane kanserinden ziyade genellikle yaygın CIS ya da kasa invaze mesane kanserini (KİMK) düşündürür (9). Bunun dışında pelvik kitle ve lenfatik obstruksiyona bağlı olarak alt ekstremitte ödemi, ilerlemiş veya yayılmış mesane kanserine bağlı iştahsızlık, kilo kaybı, halsizlik, kemik ağrısı ve karın ağrısı gibi metastatik yakınmalar da görülebilir (8).

1.4.2. Fizik Muayene

KİOMK' da fizik muayenede herhangi bir fiziksel bulgu saptanmayabilir (10), ancak KİMK' de rektal ve vajinal muayene yapılmalı, lokal ileri evre tümörlerde pelvik kitle hissedilmeli, ayrıca TUR-MT (Transüretral Rezeksiyon-Mesane Tümörü) öncesi ve sonrası bimanuel muayene yapılarak pelvik yan duvara fiksasyon kontrol edilmelidir (11).

1.4.3. Görüntüleme ve Tanısal Yöntemler

1.4.3.1. Ultrasonografi; Transabdominal USG, renal kitlelerin yapısının, hidronefrozun ve mesanede intralüminal kitlelerin görüntülenmesinde yardımcı olmaktadır. Hematüriyle gelen hastalarda, ilk başta obstrüksiyon teşhisinde iyi bir araç olarak kullanılmaktadır. Üst üriner sistem tümörü tanısında İntravenöz Üretrografi (İVÜ) kadar kesinlik sağlayabilir (10).

1.4.3.2. Bilgisayarlı Tomografi Ürografi (BT Ürografi) ve İVÜ: BT, üriner sistemdeki papiller tümörleri, dolum defektlerini ve hidronefrozu değerlendirmede kullanılmaktadır. İVÜ, BT çekilemediği durumlarda BT'ye alternatif olarak kullanılabilir. Ancak özellikle

KİMK' de ve üst üriner sistem tümörlerinde BT, komşu organ invazyonu, lenfadenopati gibi daha fazla bilgi sağlayabilir (10).

1.4.3.3. Üriner Sitoloji: Eksfoliyate kanser hücrelerinin İdrar tahlilinde ve mesane yıkantı sıvısında tanısı, yüksek dereceli tümörler için yüksek duyarlılık olup, düşük dereceli tümörler için düşük duyarlılığı mevcuttur. CIS taraması için duyarlılığı %28-100 oranında değişir. Pozitif sitoloji, üriner sistemin herhangi bir yerinde tümör olabileceğini işaret ederken, negatif olması kesin bir şekilde tümör olmadığı anlamına gelmez (10).

1.4.3.4. Üriner Moleküler Belirteçler: İdrar sitolojisinin düşük duyarlılığı, yeni üriner belirteçlerin araştırılmasına sebep olmuştur. Bu belirteçlerin hiç biri tanı ve takip aşamasında rutin kullanıma girmemiştir. UroVysion (FISH), Immunocyt/uCyt +, Sitokeratinler, Nükleer matriks Protein 22, Mikrosatellit analiz, BTA TRAK gibi belirteçler değişik duyarlılık oranlarıyla kullanılmaktadır (10).

1.4.3.5. Sistoskopik Muayene: Papiller mesane kanserinin tanısı mesanenin sistoskopik muayenesine ve rezeke edilen dokunun histolojik değerlendirilmesine bağlıdır. CIS tanısı, sistoskopi, üriner sitoloji ve çoklu mesane biopsilerinin histolojik değerlendirilmesiyle konur. Lokal tanısal sistoskopi muayenehanede planlanabilir. Özellikle muayenehanede erkek hastalarda, intraüretral kayganlaştırıcı yardımıyla fleksible sistoskop ile yapılan sistoskopiyle rijid'e oranla daha iyi sonuçlar alınabilmektedir (10).

1.4.3.6. Fotodinamik Tanı: Fotodinamik tanı, mesane içine 5-aminolevulinik asit (ALA) ya da heksaminolevulinik asit (HAL) instilasyonu sonrası mor ışık altında yapılır. Özellikle CIS' de, konvensiyonel yöntemlere göre florasan yardımcı biopsi ve rezeksiyon daha başarılı olduğu gösterilmiştir (10).

1.5.KİOMK'da Tedavi

1.5.1. TUR-MT : TUR-MT'nin asıl amacı pTa ve pT1 mesane kanserinde doğru tanıyı sağlaması ve görünen tüm lezyonların alınmasıdır. Bu, mesane kanserinde tanı ve tedavide temel yaklaşımdır. Rezeksiyon stratejisi tümör boyutuna bağlı olarak değişmektedir. İyi bir tanı olması için tam ve doğru TUR-MT yapılması gerekmektedir. Rezeksiyon dokusunda kas

dokusunun görülmemesi rezidü hastalık, erken rekürrens için yüksek riski göstermektedir. Cerrahi tecrübenin de TUR-MT sonuçlarını artırdığı gösterilmiştir (10).

1.5.2. Adjuvan İntravezikal Tedavi : Uygun tedavi seçimi için hastanın mesane tümörünün özelliklerine göre risk sınıflaması yapılmıştır (**Tablo 4**).

Risk sınıflaması	Özellikleri
Düşük Riskli	<ul style="list-style-type: none">• Primer,• solid, pTa,• G1 (PUNLMP, LG),• <3cm,• CIS olmaması
Orta riskli	<ul style="list-style-type: none">• Yüksek ve düşük risk gruplarına girmeyen tüm tümörler
Yüksek riskli	<ul style="list-style-type: none">• pT1 tümörler• Yüksek dereceli tümörler• CIS• Multiple, rekürren ve >3cm pTa düşük dereceli tümörler

Tablo 4. Tümör özelliklerinin risk gruplarına göre ayrılması (10).

EAU, AUA, NCCN ve FICBT verilerine göre, düşük riskli hastalarda TUR-MT'den hemen sonra tek doz kemoterapi yapılması önerilmiştir. Ancak mesanede büyük ya da şüpheli perforasyon varlığında yapılması kesinlikle önerilmemektedir. Orta riskli hastalıkta BCG indüksiyonu ve idame tedavisi ya da intravezikal kemoterapi (en fazla 12 ay) önerilmektedir. Yüksek riskli hastalıkta ise BCG indüksiyonuyla birlikte idame tedavisi önerilmektedir (12).

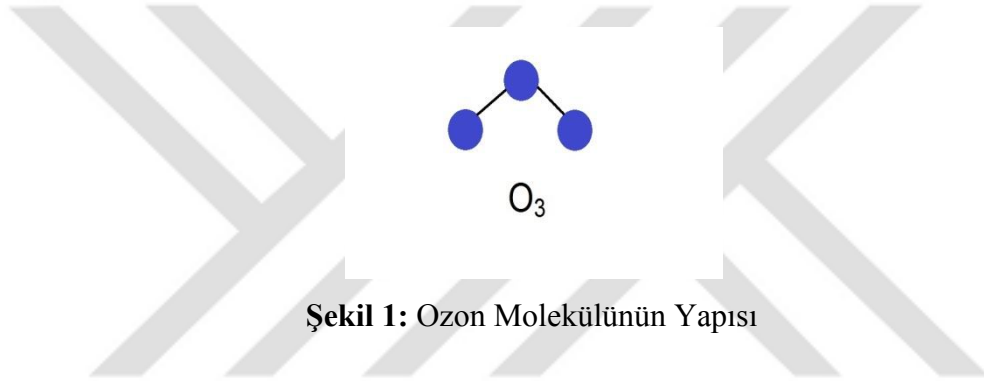
İntravezikal kemoterapide sıklıkla kullanılan ajanlar; Mitomisin-C, Epirubisin ve Adriamisin olup, sırasıyla 40, 50, 50 mg'lık ilaçlar 50 ml %0,9 NaCl'de dilüe edilip hazırlanmakta ve mesaneye uygulanıp 1-2 saat mesanede kalması sağlanmaktadır. İdame tedavide, Epirubisin için uygulama şeması 4 hafta boyunca haftada bir, bir yıla kadar ayda bir kez tedaviye devam edilmesiyken, mitomisin ve adriamisinde 6 hafta boyunca haftada bir, bir yıla kadar ayda bir olacak şekilde tedaviye devam edilmesidir (13-15).

BCG için 81 mg Connaught suşu 50 ml de dilüe edilip mesaneye instile edilmeli ve 2 saat kadar mesanede kalması sağlanmalıdır. BCG idame tedavisi 6 haftalık haftada bir kez yapılan başlangıç instilasyonu, 3. ve 6. ayda 3 hafta boyunca haftada bir kez BCG verilmektedir. Ardından 3 haftalık uygulamalar 6 ayda bir devam ederek 5 kez daha yapılarak, 3 yılda 27 doz BCG tedavisi tamamlanmış olur (16).

1.6.OZON TEDAVİSİ

1.6.1. Ozon Nedir?

Ozon üç oksijen atomundan oluşmaktadır (**Şekil 1.**). Ozon, 1840 yılında Christian Friedrich Schönbein tarafından keşfedilmiştir. Dünya yüzeyinden 25-30 km (kilometre) yüksekte stratosferde, UV (ultraviyole) ışınlarının etkisiyle, devamlı olarak oksijen atomlarından oluşmaktadır. Stratosferde bulunan ozonun en önemli görevi cilt kanserlerine ve mutasyonlara sebep olan UV-B ve UV-C ışınlarını absorbe etmektir. Ancak son yıllarda kloroflorokarbonlar ozon tabakasındaki ozon miktarını azaltmaktadır (17).



1.6.2. Ozon Molekülünün Davranışsal Özelliği

Ozon, florin ve persülfattan sonra bilinen en okside edici ajandır. Ozon, oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve suda çözünürlüğü 10 kat daha fazla olan bir moleküldür. Çözünmesi ısıya, basınca ve kendi konsantrasyonuna bağlıdır. Biyolojik sıvılarda ise ozon oksijenden farklı olarak hızlıca biyomoleküller ile reaksiyona girer. Dolayısı ile OHT (Hastadan alınan kan örneğinin ozonize edilerek hastaya geri enjekte edilmesi) esnasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon, kanda afinite sırasıyla çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla ve sistein gibi sülfhidril grubu taşıyan tiyol bileşikleri ile reaksiyona girer. Ozonun miktarına bağlı olarak karbonhidratlar, proteinler (dolayısıyla da enzimler), DNA ve RNA da bu reaksiyondan etkilenebilir. Tüm bu bileşikler ozon karşısında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler. Sonuçta süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşur (18).

1.6.3. Ozonun Tıpta Kullanımı

Ozon tedavisi, belirli bir miktarda oksijen/ozon karışımının vücut boşluklarına ya da dolaşım sistemine uygulanmasıdır. Karışım literatürde intravenöz, intrarektal, intramuskuler, intraartiküler, intraperitoneal vb. uygulanabildiği gibi cilde topikal olarak uygulanmıştır. İntravenöz uygulama olan majör OHT en sık kullanılan yöntemdir. Ozon reaktif bir molekül olduğu için tıbbi uygulamada hiçbir zaman saf olarak verilmemeli ve belli oranda oksijenle karıştırılarak uygulanmalıdır. Dolayısıyla daima saf ozon ve saf oksijenin karışımı kullanılır. Bu karışımda ozon en fazla % 5 ve oksijen en az % 95 oranında bulunur. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmesi engellenmelidir. Çünkü ozonun reaktif özelliğinden dolayı hava ile teması sonucu toksik bir gaz olan nitrojen dioksit oluşabilmektedir. Ayrıca emboliye sebep olmaması için ozon gaz olarak damar sistemi içerisine verilmemelidir (18).

Ozon tedavisinin indüklediği biyolojik yanıt şu mekanizmalar temelinde gerçekleşmektedir: (i) Eritrositler içinde 2,3 Bifosfogliserat düzeyini artırarak dokulara oksijen salınımını arttırmakta, bu da kan akımını ve iskemik dokulara oksijen taşınmasını arttırmaktadır. (ii) Büyüme faktörlerinin salınımını artırarak immün sistem hücrelerini aktive eder. (iii) Selüler antioksidan enzimlerin ekspresyonunu tetikler. (iiii) Lokal uygulamada güçlü dezenfekte edici etki yapmaktadır (17).

Ozon bir çok dokuyu etkileyebilmekte, dolaylı olarak kronik hastalıklarda fonksiyonel aktivite üzerine olumlu etki yapmaktadır. Ayrıca doğru kullanım ve yaklaşımda ozon biyolojik yanıt düzenleyicisi olarak etki göstermektedir. Ozon, Diabetus Mellitus, Aterosklerozis, Buerger Hastalığına ikincil gelişen periferik arter hastalıklarında olduğu gibi çeşitli iskemik kalp, karaciğer, beyin ve ekstremiteler hastalıklarında kullanılmaktadır. Özellikle OHT ile başarılı sonuçlar alınabilmektedir (17).

Yaşa Bağlı Maküler Dejenerasyon: Ozon'un 20-60 µg/ ml dozda 15-18 seanslık bir OHT ile YBMD' de olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (17).

Kronik Enfeksiyon Hastalıkları: Ozonun en kabul görmüş etkilerinden biri dezenfektan özelliğidir. Bir çok bakteriyel, viral ve mantar enfeksiyonlarında kullanıldığı gibi, klinik olarak osteomyelit, diyabetik ayak yaralarında, kronik yaralarda topikal ya da sistemik

kullanılmaktadır. Ayrıca HCV, HIV ve HSV gibi kronik viral enfeksiyonlarda OHT antiviral ilaçlarla birlikte kombine de edilmektedir (17).

Pulmoner Hastalıklar: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı olan hastalarda geleneksel tedavilerle birlikte ozon tedavisi dikkate değer bir şekilde tedavi etkinliği sağlamıştır (17).

Ortopedik Hastalıklar: Disk hernisine bağlı bel ağrısında ozon uygulaması etkili bir tedavidir. İntervertebral disk mesafesine ya da paravertebral kaslara lokal uygulanan ozon anti-inflamatuar etkinlik göstererek ağrıyı azaltmaktadır. 2000’li yıllarda İtalya’da disk hernisi olan 30.000’ den fazla hastaya yapılan ozon tedavisinin %62-80 oranında klinik olarak iyileşme göstermiştir (17).

Diş Hastalıklarında Kullanım: Diş kökü çürükleri ve enfeksiyonunda diş hekimleri tarafından kullanılmaktadır (17).

Literatürde birçok alanda kullanımı olan ozonun farmakolojik ilaçlarla tedaviden farklı olarak insan vücudunun ilaç-reseptör ilişkisi ile değil vücudun kendi güçlü potansiyelleri olan “antioksidan” ve “antiinflamatuvar” etkileri kullanarak ve tüm vücutta bir alarm reaksiyonuna neden olarak vücudu hastalıklar karşısında güçlendiren bir tedavi yöntemidir (18).

1.6.4. Ozonun Antioksidan Mekanizması

En okside edici ajanlardan olan ozon, kronik oksidatif stres oluşturarak, bu etkiye ikincil (reaktif) olarak antioksidan yanıtı indüklemektedir. Hipertermi, hipoksi, iskemi, hipoglisemi, pH değişiklikleri, radyasyon, hormonal değişiklikler, kronik enfeksiyonlar, aşırı SOR artışı ve lipid peroksidasyonu stres faktörleridir. Dışsal ya da içsel herhangi bir tolere edilebilecek stres faktörü hemostazı etkilediyse, hücre hayatta kalabilmek için adaptasyon geliştirir. Eğer aşırı bir strese bağlı hücre hasarı gelişirse apoptozis mekanizmaları uyarılır. Ozona karşılık adaptasyon mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Düşük miktarda SOR ve lipid peroksidasyonu, adaptasyon olarak antioksidan enzimlerin üretimini artırmaktadır. Ozon yüksek düzeyde uygulandığında organizma için zararlı, ancak düşük doz (<10-15µg/ml) uygulamada yararlı etkiler sağlayabilmektedir. Bunu kronik uygulamada hücrenin adapte olarak antioksidan yanıtı artırmasıyla sağlamaktadır. Bu hücre

adaptasyonundan lipid peroksidasyonun sorumlu olduğu ve habercil gibi davranıp tüm dokularda oksidatif stres etkisi yaptığı bildirilmiştir (17).

Kronik oksidatif strese bağlı adaptasyon gelişimi deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalarda SOD (Superoksid Dismutaz), GSH (Glutasyon), katalaz gibi antioksidan enzimlerin arttığı saptanmıştır. Bu antioksidan artışta submikromolar seviyesindeki lipid peroksidasyon ürünlerinin anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (17).

1.6.5. Ürolojide Ozon Kullanımı

Literatürde ozon ile ilgili klinik ve deneysel birçok çalışma yapılmıştır. Klinik uygulamada ürolojik alanda yapılan çalışmalar nadir olup, genellikle deneysel çalışmalar yapılmıştır.

İskemik hastalıkların tedavilerinde kullanılan ozonun, akut renal iskemi ve reperfüzyon hasarını önleyerek apoptozisi engellediği gösterilmiştir. Bu çalışmada, MPO (Myeloperoksidaz) aktivitelerini azaltarak lökosit birikimini engellediği, MDA (Malondialdehit) miktarını düşürerek oksidatif stresin azalttığı, ayrıca Kaspaz 3 seviyelerini düşürerek apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (19). Yine başka bir çalışmada iskemi/reperfüzyon hasarına bağlı, oksidatif stresin artarak MDA seviyelerinin yükseldiği ve renal fibrozisin olduğu böbrek dokusunda, ozon tedavisinin antioksidan SOD seviyelerini arttırdığı ve renal fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (20).

Testiküler torsiyona bağlı testiküler iskemi reperfüzyon hasarında ozonun olumlu etkileri gösterilmiştir. Melatonin ve ozonun karşılaştırıldığı bu çalışmada testis torsiyonuna bağlı gelişen iskemi reperfüzyon hasarını her ikisinin de önlediği gösterilmiş, torsiyonda artan MDA ve azalan GSH seviyelerinin ozon tedavisiyle düzeldiği gösterilmiştir (21).

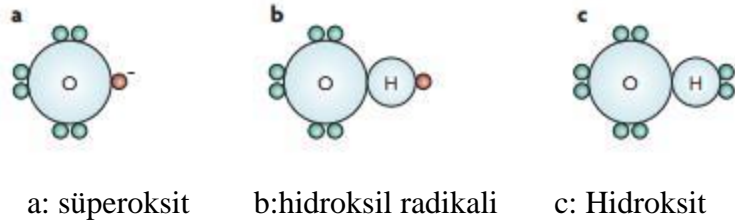
Bir başka çalışmada, intraperitoneal kullanılan ozonun, Siklofosfamid'in mesane dokusunda oluşturduğu hemorajik sistiti ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada Siklofosfamid mesane dokusunda kontrol grubuna göre NO (Nitrik oksit), MDA, ve MPO seviyelerini artırıp, GSH seviyelerini düşürürken, ozon hem bu parametreleri düzenleyici etkide bulunmuş, hem de hemorajik sistit üzerinde olumlu etki yapmıştır (22).

Clavo ve arkadaşları prostat kanseri nedeniyle radyoterapi alan bir hastada gelişen makroskopik hemattüriyi tekrarlayan intravezikal ozon seanslarıyla tedavi etmişlerdir. Önce mikroskopik hemattüriye kadar gerilemiş, ardından tamamen iyileşme görülmüştür (23).

Intravezikal ozon kullanımı ile ilgili olarak başka bir çalışmada, *Escherichia coli* (E. coli) ile oluşturulmuş akut sistit modelinde intravezikal 25 µg/ml'lik ozon uygulamasının akut sistiti önlediği ve aynı zamanda mesane dokusunda NO, MPO, MDA seviyelerini azaltıp, SOD ve GPX (Glutatyon peroksidaz) seviyelerini artırarak oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (24). Kronik sistitli hastalarda sistemik ya da intravezikal ozon uygulaması yapılan bir çalışmada kronik sistitte sistoskopik ve histopatolojik düzelmeler ve yapısal reorganizasyon gözlenmiştir (25). Tavşanlarda interstisyel sistit modelinde intravezikal ozon uygulamasının mesane mast hücre ve lökosit miktarını azalttığı ve interstisyel sistitte olumlu etkileri gösterilmiştir (26).

1.7. OKSİDATİF STRES ve KANSER

Oksidatif stres, artan hücre içi Serbest Oksijen Radikallerinin miktarına bağlı olarak gelişen lipid, protein ve DNA hasarlanmasıdır (27). SOR, oksijen içeren reaktif kimyasal moleküllerdir. İki tip SOR mevcuttur. Birincisi, moleküler yörüngesinde eşleşmemiş bir ya da daha fazla elektron olan moleküllerdir. Bunlar radikal SOR'lardır. İkincisi ise yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulunmayan, yani radikal-olmayan SOR'lardır (Şekil 2.). Radikal-olmayan SOR'lar kimyasal olarak reaktif olup radikal SOR'a dönüşebilir. Radikal SOR'lara bilinen en iyi örnekler: Superoksit, Nitrik oksit ve hidroksil radikalleridir. Radikal olmayan SOR'lar ise hidrojen peroksit, ozon, peroksinitrit ve hidroksid'tir (28).



Şekil 2. : Serbest Oksijen Radikallerinin Moleküler Yapısının Gösterilmesi

1.7.1. Biyolojik Sistemlerde SOR Fonksiyonu

Biyolojik fonksiyonlar için SOR gerekli temel moleküllerdir. SOR bir çok sinyal yollarında görev alan proteinlerin yapılarını modifiye edip direk olarak bunların düzenlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca transkripsiyon faktörlerini ve genlerini direk olarak düzenlemektedir. Hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli sinyalleri içermekte, çeşitli enzimlerin düzenlenmesini sağlamakta, inflamasyon ile ilişkili sitokin üretimi ve yabancı partiküller ve patojenlerin elimine edilmesinde rol oynamaktadır (28).

1.7.2. SOR'un Zararlı Etkileri

SOR'lar, DNA, protein ve lipidler gibi biyolojik moleküllerle yüksek reaksiyon verme eğilimindedir. Serbest radikal reaksiyonu bu biyolojik moleküllerin oksidatif modifikasyona neden olmakta ve onların fonksiyonlarını değiştirebilmektedir. SOR'un hafif artışı, geçici hücrel değişimle sonuçlanabilmekte, şiddetli olarak artması ise geri dönüşümsüz oksidatif stres ile hücre ölümüne neden olmaktadır (28) .

1.7.3. SOR 'un Kaynakları

Sigara içimi, çevre kirliliği, demir tuzları, radyasyon gibi çevresel faktörler dışında hücre içi üretim SOR'un temel kaynaklarıdır. Hücreler SOR'u birçok mekanizma ile üretirler. Ana SOR kaynağı mitokondridir. Mitokondrideki solunum zincirinden kaçan elektronlar oksijen molekülleriyle reaksiyon gösterip süperoksit oluşumuna sebep olur. Bu, SOR oluşumunda önemli bir basamaktır. Daha sonradan süperoksit diğer SOR'lara dönüşebilir. SOR'lar fagositlerde ve bazı kanser hücrelerinde NADPH oksidaz enzim kompleksiyle üretilirler. Ayrıca sitokrom p450 enzimlerinin detoksifikasyon reaksiyonlarında, prostaglandin sentezinde ve peroksizomlardaki β - oksidasyon reaksiyonlarında da SOR'lar üretilebilir (28) .

Kanser hücrelerinde yüksek oranda bulunan SOR'lar artmış metabolik aktiviteye, mitokondriyel fonksiyon bozukluğuna, peroksizom aktivitesine, hücrel reseptör sinyal artışına, onkogenlerin aktivasyonuna ve oksidazların, siklooksijenazların ve lipo-oksijenazların aktivasyonuna neden olurlar (29).

1.7.4. Hücrel Antioksidan Sistemler

SOR'un ortadan kaldırılmasında enzimatik olmayan (Glutatyon, A, C, E vitaminleri gibi) ve enzimatik (SOD, GPX, Katalaz gibi) birçok molekül görev alır. SOD metalloenzim ailesinden olup süperoksit anyonunu hidrojen peroksite dönüştürür. Mangan, demir, bakır,

çinko SOD'un kofaktörleridir. SOD hücrede mitokondri ve sitozol gibi değişik kompartmanlarda bulunur. Katalaz enzimi peroksizomlarda ve sitoplazmada bulunur. H_2O_2 yi su ve oksijene parçalar. Glutasyon sistemi ise GSH, Glutasyon peroksidaz (GPX), Glutasyon redüktaz ve Glutasyon S- Transferaz (GST)'dan oluşmaktadır. GSH, sitoplazmik proteinlerin disülfid bağlarını indirgeyip sisteine dönüştürerek hücrel oksidatif stresi azaltır (29).

1.7.5. SOR'un Hasarlayıcı Etkisi

SOR artışı DNA, protein ve lipidler gibi büyük moleküllerde spesifik olmayan hasarlara sebep olur. H_2O_2 'nin Fenton Reaksiyonuyla oluşturduğu OH^\cdot DNA üzerinde olumsuz etki yapar. Ayrıca SOR poliansatüre yağ asitleri ile tepkimeye girerek lipid peroksidasyonuna sebep olur. Lipid peroksidasyonunda genotoksik etkisi bulunan MDA miktarı artmaktadır. Ayrıca SOR, proteinleri etkileyerek protein fonksiyonlarının değişimine sebep olur (29).

1.7.6. Kanserde SOR Aracılığıyla Düzenlenen Sinyal Yolakları

Birçok kanser tipinde, SOR duyarlı sinyal yolakları (MAB kinaz, K-ras gibi) kalıcı olarak yükselmiştir. Bu sinyaller hücre büyümesi ve çoğalması, protein sentezi, glukoz metabolizması, hücre sağkalımı ve inflamasyona sebep olmaktadır. SOR, özellikle H_2O_2 , hücre içi ikincil habercil gibi davranıp hücrede protein tirozin kinazlar, reseptör tirozin kinazlar ve transkripsiyon faktörlerini geri dönüşümlü olarak okside edebilir (29).

1.7.7. Kanser Dokusunda SOR Fonksiyonları

Hücre Çoğalması Üzerine Etkileri: Birçok kanser tipinde düşük dozda H_2O_2 ve O_2^\cdot hücre çoğalmasını uyarır. SOR, siklin B2, siklin D3 , siklin E1 gibi G1'den S dönemine geçişte rol oynayan proteinlerin üretilmesini sağlar. Ayrıca pankreatik kanser hücrelerinde normal hücrelere göre yüksek miktarda bulunan SOR hücre çoğalmasını uyarmıştır. Antioksidan SOD'un ekspresyonu ile pankreatik tümör hücre büyüme hızı düşmektedir (29).

Apopitozis ve Hücre Sağkalımı: Hücre içi SOR'un orantısız artışı kanser hücrelerinde apopitozise ve hücre siklusunun durmasına neden olmaktadır. Mitokondriyel oksidatif stresin artışı önce sitokrom C'nin salınımına, ardından kaspazlar aracılığıyla hücre ölümüne sebep olmaktadır (29).

SOR ayrıca hücre hareketini ve metastaz yeteneğini düzenlemektedir. Ayrıca artmış SOR miktarı, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ekspresyonunu artırarak anjiogenezi artırmaktadır (29).

1.7.8. Kanser Tedavisinde ve Korunmasında Antioksidan ve SOR Uygulamaları

Bir çok kemoterapötik ilaç stratejisinde, artan hücre içi SOR'a ikincil hasar oluşumu ve tümör hücre apoptozisin uyarılması kullanılmaktadır. Örnek olarak bugüne kadar pankreatik kanserde bir kaç yeni tedavi seçeneği geliştirilmiştir. Bunlardan gemsitabin, trikostatin, kapsaisin gibi ilaçlar hücre içi ROS miktarını artırarak apoptozisi uyarmaktadır. Ayrıca steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlardan sulindak, hücre içi SOR miktarını artırarak, kolon ve akciğer kanserlerinde H₂O₂ 'nin indüklediği apoptozise kanser hücrelerini duyarlı hale getirmektedir (29).

Tümör hücrelerinde SOR hücre sağ kalımı ve antioksidan genlerin ekspresyonunu artırabilmektedir. Böylece redoks adaptasyon mekanizmaları gelişmektedir. Antioksidan ve anti-apoptotik proteinlerin artmasıyla antikanser ilaçlara karşı direnç gelişebilir. Antioksidan inhibitörüyle, oksidan özelliği olan farmakolojik ajanlar SOR seviyelerini artırarak tümör hücrelerinde toksisiteyi başlatabilir (29).

1.8.DENEYSSEL MESANE KARSİNOGENEZİ

Yeni terapötik ilaç ve modalitelerin geliştirilmesi için in vitro modeller kullanışlıdır. Ancak hayvan modelleri (in vivo) bir çok insan malignitesine karşı yeni efektif ve güvenli tedavilerin geliştirilmesinde temel teşkil etmektedir (30).

DeneySEL hayvan mesane kanseri modelleri, tür farklılığı açısından sinojenik ya da ksinojenik olarak, tümöral gelişim lokalizasyonu açısından heterotropik ya da ortotopik olarak gruplara ayrılır. Ortotopik modeller kendi içinde implante edilebilen, genetiği değiştirilmiş yani transjenik ya da kimyasal indüksiyonla oluşturulabilen modeller olarak ayrılırlar.

1.8.1. Ksenojenik (xenograft) Hayvan Modeli: İnsan mesane kanseri hücreleri hayvana implante edilerek yapılan hayvan modelidir. Bunun gerçekleşebilmesi için konak doku yapısının immün cevabının olmaması gerekir. Bu nedenle 11 . kromozomda olan

spontan gelişen mutasyon sonrası kılısız ve timus dokusundan yoksun fareler bu modeller için kullanılır, Ancak atimik konak dokusunun immün yanıtı olmadığından ötürü BCG gibi antitümöral etkinliğin immünoterapi ile sağlandığı ajanlar bu modellerde kullanılamaz.

1.8.2. Sinojenik Hayvan Modelleri: Aynı türden olan hayvanların kanser hücrelerinin konak mesane ya da diğer dokularında oluşturulan modellerdir. Aynı hayvan türünden elde edilen mesane kanserinin mesane dokusu dışında başka sırt, bacak gibi dokulara ekilip tümör büyümesinin incelendiği modeller heterotopik, konak mesane dokusunda incelenen modellere ortotopik mesane kanseri modeller denmektedir. Ortotopik modeller: kimyasal madde indüksiyonu ile (oral,intravezikal vb.), mesane tümör hücrelerinin mesane dokusuna direk implante edilmesi yoluyla ya da genetiği değiştirilmiş model ile oluşturulan transjenik model olmak üzere üç kısımda incelenir.

Mesane kanseri için uygun hayvan modeli, insan mesane kanserine histolojik olarak benzemeli ve davranışsal olarak şu evreleri içermelidir (30).

- Tümör intravezikal olarak gelişerek intravezikal antitümör ilaçlarına direk maruz kalabilmeli,
- Tümör pür transizyonel hücreli (üretelyal) karsinom orjinli olmalı ve hastalık progresyonunun farklı evrelerini içermeli, (Carsinoma in situ, papiller tümörler , invaziv hastalık gibi)
- İnsan mesane kanserinde olduğu gibi ağırlıklı olarak kasa invaze olmayan mesane kanseri şeklinde olmalı,
- Hayvan immün yetenekli olup, BCG gibi antitümöral etkiyi immünoterapi yoluyla gösteren ajanlar tedavide kullanılmalıdır.
- Tümör klinik olarak kolay geliştirilebilmelidir.

İn vivo deneysel mesane kanseri modelleri Doku lokalizasyonuna göre **Heterotopik** ve **Ortotopik** olmak üzere iki kısımda incelenir.

1.8.3. Heterotopik Hayvan modelleri

Kemirgen heterotopik üretelyal karsinoma modellerinde tümör genellikle sırt ve arka bacak lokalizasyonundadır. Sinojenik heterotopik modeller immünolojik çalışmalar için

oluşturulurlar. İmmün yetenekli olan konak vücuduna küçük bir insizyon yapılarak aynı türden elde edilen tümör konağın cilt altına ekilir. Tümör gelişmesi palpasyon ya da görüntüleme yöntemleri ile takip edilir. Ortotropik mesane kanseri modelinin teknik olarak zor olmasından ötürü heterotropik modeller sık kullanılan modellerdir (30).

1.8.4. Ortotropik Modeller

Denek mesanesinde karsinom gelişmesine Ortotropik mesane kanseri denmektedir. Dört ana başlıkta ortotropik mesane kanseri oluşturulabilir: 1-Kimyasal indüksiyonla: FANFT (N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide), OH-BBN (N-butyl-N-(4-hidroksibutil) nitrosamine), MNU (n-metil-n-nitrosourea) gibi genotoksinler ile, 2- insan mesane kanseri hücrelerinin denek mesanesine implante edilebilmesi ile (ksenograft ortotropik model), 3-kemirgen mesane kanseri hücrelerinin aynı tür denek mesane dokusuna implante edilebilmesi ile (sinojenik ortotropik model) ya da 4-Genetiği değiştirilmiş, yani transjenik olarak nitelendirilen modellerdir. (Tablo 5. 'te görüntülenmiştir)

1.8.4.1. Transjenik Modeller

Mesane kanseriogenezindeki moleküler olayları anlayabilmek için kullanılan genetiği değiştirilmiş fare modelidir. Bunun için genetik olarak onkojenik genlerin aktivasyonuna ya da tümör supresor genlerin inaktivasyonu sağlanır (31).

Onkogenleri aktive etmek veya supresor genleri deaktive etmek için genetiği oynanmış hayvan modelleridir. Transjenik modeller bir çeşit sinojenik modellerdir. Genetik olarak özel üretilen fareler, spesifik bir genin yoksunluğunun yarattığı etkiyi çalışmak için kullanılır. İnsan mesane tümörlerinde Rb-1, p53 gibi supresör genler baskılanırken Ha-ras gibi onkogenler aktive olur. Rb geninden yoksun fare embriyosu 14. Günde ölürken, p53'den yoksun farelerde 7. Ayda timusta lenfoma gelişir. Bu nedenle kondisyonel tranjenik modeller geliştirilmiştir (32).

Fare üroplakin II isimli genin, transgenetik fare üretelyumunda Lac Z reporter gen ve insan büyüme hormonu gen ekspresyonunu kontrol ettiği gösterilmiş, UPII-SV40T transjenik hayvanda SV40T ekspresyonuna bağlı 2 ayda displazi ,3-5 ayda ise CIS oluşumu gösterilmiştir (31).

1.8.4.2. İmlante Edilebilen Ortotropik Modeller

Daha çok tümör metastazının değerlendirilmesi ve anti-metastatik ajanların denenmesi için kullanışlı bir model olan implante edilebilen tümör modeli, lokal tümör gelişimini, vasküler lenfatik invazyonu, ekstrasvazyonu, komşu organ invazyonunu değerlendirmek için kullanılır (31). Bu tümörlerin gelişimi invazyon süreci düşünüldüğünde kısa sürede olmaktadır.

Çoğaltılabilen BIU-87 İnsan mesane kanseri hücrelerinin ksenograft mesanesine inokulasyonun değerlendirildiği bir çalışmada 7-9 gün içerisinde %90 'ın üzerinde tümör gelişimi izlenmiş progresif papiller tümörden invaziv tümör tipine kadar tüm safhalar oluşmuştur (33).

Fisher 344 sıçanların FANFT ile kimyasal indüksiyonu sonucu gelişen mesane tümörlerinin çoğaltılması sonucu gelişen AY-27 hücre hattı, sinojenik ortotropik implante edilebilen tümör olarak kullanılmaktadır (34). Fisher 344 dişi rat mesanesine AY 27 hücre hattının instilasyonu sonucu 16 gün gibi kısa sürede %97 oranında tümör gelişimi gösterilmiştir.(CIS ve pT1 tümör) (34).

Yine ACI sıçanlarda, karsinojenle indüklenmeden spontan geliştirilebilen non invaziv mesane kanseri hücre kültür hattı RBT 323 kullanılmıştır. Sinojenik ACI sıçanlara, RBT 322 intravesikal olarak verildiğinde 24 günde pTa ve pT1 tümörler oluşturulmuştur (30).

1.8.4.3.Kimyasal İndüksiyonla Oluşturulmuş Ortotropik Mesane Kanseri Modelleri

Mesane kanseri etiyojisinde bilinen en önemli faktör olan sigarada bulunan genotoksin-nongenotoksinlerin mesane kanseri oluşturma mekanizmalarına benzer şekilde kimyasal indüksiyonla oluşturulmuş deneysel mesane kanseri modelleri in vivo çalışmalar için önemli bir yer tutmaktadır. Üretelyum biyolojisinin önemli bir yapısı kendi bariyerini yenileyebilme fonksiyonu ve bununla ilgili olarak ürotelyal karsinogenezi etkileyebilmesidir. Tüm türlerde normal üretelyum oldukça düşük yenilenme oranı ve düşük mitoz görülme oranına sahip iken, doku hasarına hızlı yanıt verebilme ve çoğalabilme kapasitesine sahiptir. İdrarla ekskrete edilen karsinojenler sadece genotoksik hasar ile değil, hasarlanan epitelyumun proliferasyonuna neden olarak, mesane bariyerinin restorasyonuna bağlı olarak da karsinogeneze etkisi olabilmektedir (35).

Deneyisel Mesane kanseri hayvan modelleri, insan mesane karsinogenezin önemli bir göstergesi olup, 3 önemli aşamadan meydana gelmektedir; İnisiyasyon (başlangıç), promotör (hızlandırıcı) etki, progresyon (ilerleme).

FANFT, OH-BBN, MNU, EHBN (N-Etil-N-(4-hidroksibutil), N-dibutil nitrosamin ve N-metil N-dodesil nitrosamin gibi diğer Nitroso bileşikler de karsinojen özellikte olup, denek suyuna yada diyetine ekleme gibi oral yolla, gastrik gavaj yoluyla, injeksiyon yoluyla ya da intravezikal kullanım gibi farklı yöntemlerle uygulanabilmektedirler (31). OH-BBN kimyasal indüksiyonla mesane karsinogenezinde en çok refere edilen kimyasal olup zayıf karsinojenik özelliğe sahiptir. FANFT, araştırmacılar çevre ve kendileri için güvenilir bir kimyasal olarak görmüşlerdir. EHBN ise ; skuamöz hücreli karsinom insidansını arttırmakta olup, papiller olmayan invaziv mesane karsinomu araştırmaları için iyi bir modeldir (31). Araştırmacıların en çok kullandığı FANFT ve OH-BBN'nin metabolik aktivasyonu aromatik aminler gibi net ortaya konmamış olup, DNA miktarını arttırdığı, mutasyonları artırarak genotoksik etki yaptığı gösterilmiştir (36).

1972'de Hicks ve Wakefield sıçan mesanesine dört kez aynı dozda güçlü bir karsinojen olan MNU verdiklerinde hızlı bir mesane karsinogenezini oluşturdu. Sıçan mesane histopatolojisinde nekroz, deskuamasyon ve hemorajiyi takiben ürotelyal hiperplazi oluştuğunu gösterdiler. MNU ürotelyumda sitotoksik hasarı yaparak, hasarı takiben gelişen yara yanıtına, hızlı çoğalmaya, mutasyonların birikimine sebep olmaktadır (35).

MNU'nin indüklediği Sıçan Transizyonel hücreli karsinomunun (TCC) diğer karsinojenlere göre şu avantajları bulunmaktadır (37),

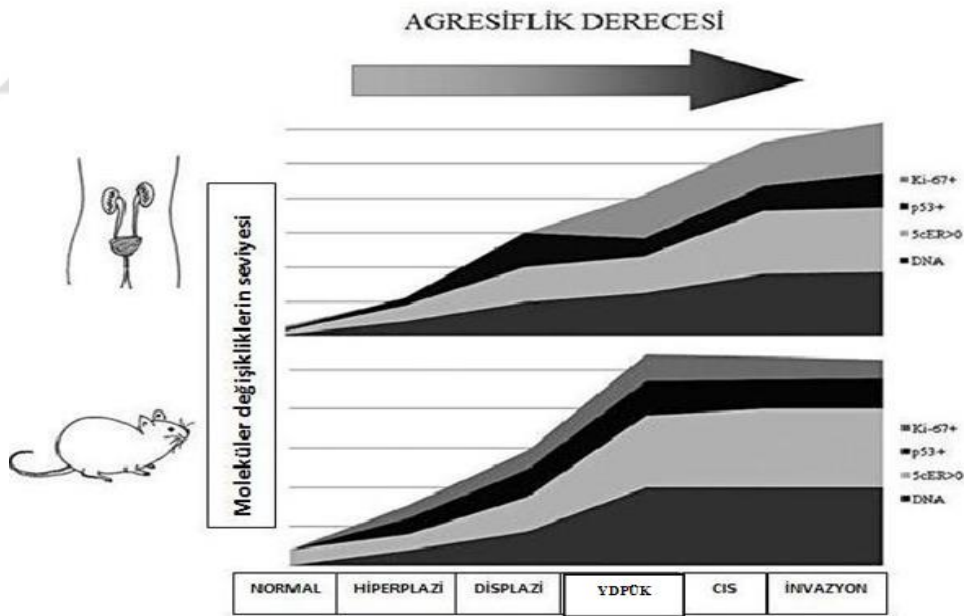
- Direkt intravezikal kullanıldığı için gastrointestinal sistemden emilimine gerek yok,
- Tüm hayvanlarda progresif neoplastik değişiklikler karsinojen maruziyetinden 4 ay sonra başlayabilmektedir,
- Tümör üriner epitelyumdan köken almaktadır,
- Yüzey epitelinden köken alan mesane tümörü, mesane duvarını invaze edip denegi öldürebilmektedir,
- Gözle görülebilen gelişen invaziv tümör histolojisi transizyonel hücreli (ürotelyal) karsinomdur,

-Karyotip diploid olup minimal kromozomal değişiklik izlenmektedir,

-Lösemi, lenfoma, meme tümörü veya diğer tümörler görülmemektedir.

MNU, DNA üzerinde persistan metilasyon yaparak, hem karsinogenezin inisiasyon evresinde hem de promotor etki oluşturulmasında rol oynar. MNU metabolik değişime ihtiyaç duymaksızın etki gösterir. MNU'nun diğer sistemik alınan ve metabolik değişime ihtiyaç duyan OH-BBN ve FANFT gibi karsinojenlere göre üstünlüğü vardır. Ayrıca MNU'nun sorenson çözeltisinde pH 6,0 ve 20 °C'de 24 saat etkinliği vardır (38). Hicks ve arkadaşları pH 7,0 da hazırlanan 1gr/100 ml MNU çözeltisinin 72 dakikalık optimal karsinojen süresi olduğunu göstermiştir (39).

Kimyasal indüksiyonla oluşturulmuş rodent mesane kanseri modeliyle insan mesane kanserinin karşılaştırıldığı çalışmada, insan ve rodent mesane kanserinde histopatolojik özelliklerin benzer olduğu, Ki-67 immünekspresyonu ile proliferatif indeksin derecesinin artışı, DNA anöploidi, p53 ekspresyonu artışı gibi moleküler anlamda ortak yönlerinin olduğu gösterilmiştir (Şekil 3) (40).



Şekil 3. Mesane tümör derecesine göre moleküler değişiklikler.

Ki-67 ile değerlendirilen Yüksek proliferatif indeks; radikal sistektomi sonrası hastalık progresyonu için önemli bir prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (41). Bu

nedenle son yıllarda yapılan deneysel mesane karsinogenezis çalışmalarında proliferatif indeks tayini için Ki-67 (MIB-1) immünohistokimyasal değerlendirme kullanılmaktadır.

Sıçanlarda mesane karsinogenezi için bir çok ırk kullanılmış. En çok kullanılan ırklar, Fisher 344, Wistar ,Sprague Dawley gibi ırklardır. Reis'in Lewis ve Fisher 344 ırkını karşılaştırıldığı çalışmada ırklar arasında karsinogenez yönünden farklılıklarının olduğu, Lewis ırkında kimyasala karşı direnç sağlayan toll like reseptör ve üroplakin defans sisteminin daha etkin olduğu gösterilmiştir (42).

Mesane kanseri görülme sıklığı erkeklerde dişilere göre prevelansı 3 kat fazla ve sigaraya bağlı mesane kanseri gelişme oranı erkeklerde daha fazla olmasına rağmen , İntravezikal yeni tedavi yaklaşımları ya da direkt intravezikal indüksiyonla mesane karsinogenezisi için dişi sıçan ve fareler kullanılmıştır. Dişilerde uygun kateterizasyon tekniği geliştirilmiştir. Erkek sıçanların anatomik zorluğu nedeniyle kateterizasyonu zordur. Bu nedenler, genellikle intraperitoneal, subkutan yada gastrik gavaj gibi diğer yöntemler karsinogenez yada tedavi için kullanılmıştır (43). Günümüze kadar intravezikal indüksiyonla oluşturulan erkek sıçan mesane kanseri yöntemiyle ilgili sadece bir çalışma bulunmakta ancak yeterli yöntem açıklaması bulunmamaktadır (44). Ayrıca bu çalışmada maksimum tümör oranı oldukça düşük olarak (% 20) olarak belirtilmiştir (44). **Tablo 6.**'da intravezikal indüksiyonla yapılmış mesane kanseri çalışmalarında cinsiyet ve tümör gelişme oranlarına dikkat ediniz.

İn vivo Ortotropik mesane karsinogenezis yöntemler	Avantajlar	Dezavantajlar
Kimyasal indüksiyon (MNU, FANFT, OH-BBN vb.)	<p>-İnsanlar için de karsinojenik olan bu kimyasallarla oluşturulan kemirgen mesane karsinogenezi İnsan mesane karsinogenezine benzer bir mekanizma ile oluşabilmekte</p> <p>-Preneoplastik lezyonlardan, daha invaziv evrelere kadar karsinogenezin bir çok evresini içerebilmekte</p> <p>-İmmün yetenekli denekler kullanılabilenekte</p> <p>-Ucuz maliyet</p>	<p>-Araştırmacılar için kimyasal maruziyeti</p> <p>-Ürosistit, mesane taşı oluşumu, ürosepsise sekonder ölüm,</p> <p>-Multiple anestezi uygulamasına bağlı ani kardiyopulmoner arrest,</p> <p>-Üretelyal (transizyonel hücreli) karsinom dışında skuamöz metaplazi, skuamöz karsinom görülebilme,</p> <p>-Ayları bulan uzun süre gereksinimi</p>
İmlante edilebilen sinojenik Mesane kanseri modelleri (AY-27, ACI 232 hücre kültürleri vb.)	<p>-İmmün yetenekli denekler kullanılabilenekte</p> <p>-Günlerle oluşturulabilen kısa süreli, hızlı karsinogenez</p> <p>-Mesane kanseri metastazlarını araştırabilmek için uygun</p>	<p>-Teknik olarak daha zor ve kalifiye teknisyen ihtiyacı</p> <p>-Pahalı maliyet</p> <p>-İmlantasyon sonrası hemen invaziv olabilmesi (intravezikal tedaviler için uygun değil)</p>
İmlante edilebilen ksenojenik Mesane kanseri modelleri (BIU-87 hücre kültürleri)	<p>-İnsan mesane kanseri hücrelerinin incelenmesi,</p> <p>-Mesane kanseri metastazlarını araştırabilmek için uygun</p> <p>-Günlerle oluşturulabilen kısa süreli hızlı karsinogenez</p>	<p>-Teknik olarak daha zor ve kalifiye teknisyen ihtiyacı</p> <p>-Pahalı maliyet</p> <p>-İmmün yetmezlikli denekler kullanıldığı için BCG gibi immünoterapik ajanlar kullanılamaz</p>
Transjenik (genetiği değiştirilmiş) modeller (UPII-SV40T Fareler)	<p>-İmmün yetenekli denekler kullanılabilenekte</p> <p>-Mesane kanserinde spesifik genlerin ve proteinlerin araştırılması</p>	<p>Tümör heterojenitesinin kaybı</p>

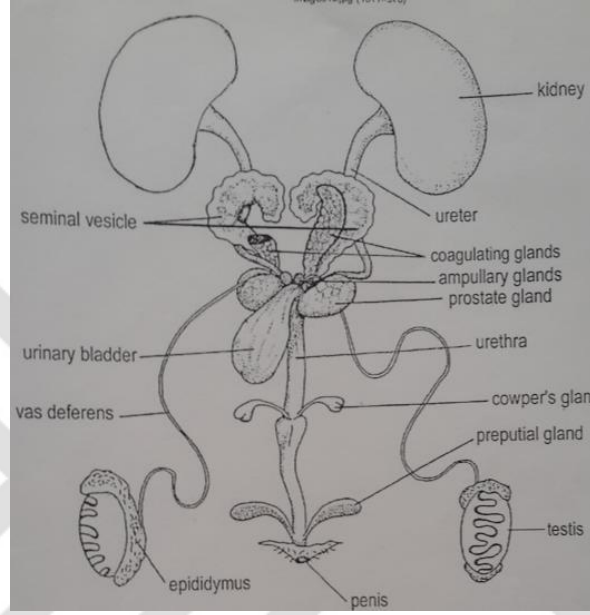
Tablo 5. Ortotropik mesane kanseri oluşturma yöntemlerinin karşılaştırılması

Yazar	Rat ırk	Rat cinsiyet	Extra Promotor Ajan	Doz/sıklık	Antibiyotik/ yeni denenmiş ajan	En fazla tümör görüldüğü Sakrifikasyon tarihi	Max tumor görülme oranı
Lixin Qian(45)	Wistar	Dişi	Sitrik asit	4x2mg	Var/ N-(4-hydroxyphenyl) retinamide	15	%46,6 %11 ex
Reis(42)	Fisher344/ Lewis*	Dişi	yok	4x1.5 mg	Yok	15	%70/ 0 %20/0*
Reis(46)	Fisher 344	Dişi	Sodyum sitrat (pH:6.0)	4x1.5mg	Yok/S. ENTEROTOKSİN	15	%70 %0ex
Steinberg(37)	Fisher 344/ Copenhagen	Dişi	Yok	4x1.5 mg	Var	20	%100/ %28 %24 ex**
Perabo(47)	Fisher 344	Dişi	Yok	4x1,5mg	Yok/ karboksiamido triazol	16	%87 Belirtilmemiş
Reis(48)	Fisher 344	Dişi	Sodyum sitrat pH:6.0	4x1.5	Yok	15	%100 Ex %0
B. Tian(49)	Wistar	Dişi	Yok	5x1.5 mg	Yok/Curcumin	15	%70.6 %18ex
Jing li(50)	Wistar	Dişi	Yok	5x? Mg	Yok/Fisetin	19	%70.6 %10ex
Yaman(44)	Wistar	Erkek	Yok	5x1.5mg	Yok/DMSO	20	%20 Belirtilmemiş
Steinberg (51)	Fisher	Dişi	Yok	4x1,5mg	Var/RTNF-a	20	%100 %25 ex
Jing Zeng(52)	Sprague-Dawley	Dişi	Yok	4x2mg	Yok/Silibinin	18	%67 %6 ex

Tablo 6. Çeşitli çalışmalarda MNU'nun indüklediği mesane kanseriogenezinde kullanılan sıçan ırkı, karsinojen miktarı, sakrifikasyon tarihi , mortalite oranı ve maksimum.tümör görülme oranı

** Steinberg'in çalışmasında Copenhagen ve Fisher 344 ratlarından toplam %24 sıçan ex olmuş.

Dişi sıçanlarda kateterizasyona bağlı olarak ürosepsis ya da üretral travma gibi komplikasyonlar olabilmekte bu da mortaliteyi artırabilmektedir. Ayrıca üriner enfeksiyonlar ,kronik inflamasyona sekonder skuamöz metaplazi gelişimini tetkileyebilmektedir. Bu nedenle dolayı üriner enfeksiyon, ürosepsis, skuamöz metaplazi gelişimi önlemek için Steinberg ve arkadaşları proflaktik antibiyoterapi kullanmışlardır (37, 51). **Şekil 4.**'te erkek sıçan ürogenital sistem anotomisi görölmektedir.



Şekil 4. Erkek sıçan ürogenital anatomisi.

2.GİRİŞ

A.B.D.'de 2014 yılında 56.390'ı erkek, 18.300'ü kadın toplam 74.690 yeni mesane kanseri saptanmış ve 15.580 kişi mesane kanserine bağlı sebeplerden hayatını kaybetmiştir (53). Mesane kanserlerinin yaklaşık %75'i kasa invaziv olmayan kanserlerdir. CIS, pTa (sadece mukozada sınırlı tümör), pT1 (lamina propria invazyonu yapan tümör) tümörler KIOMK' u oluştururlar (10). KIOMK tedavisinde transüretral rezeksiyon (TUR) standart tedavi olup, sadece TUR tedavisi alan hastalarda ilk yılda %40'a yakın oranda tümör rekürrensi görülmekteyken , %3-15 oranında kasa invaziv mesane kanseri ya da metastatik mesane kanserine progresyon gelişmektedir (54). Tümör rekürrens ve progresyonu önlemede intravezikal kemoterapötik ve immünoterapötik ajanlardan yararlanılmaktadır (55).

Kullanılan bu kemoterapötik ve immünoterapötik ajanlar etkilerini sitotoksisite, apoptozis indüksiyonu ve immün modülasyon yoluyla göstermektedir. Ayrıca antioksidan defans enzimlerinin ortadan kalkmasıyla oluşan oksidatif stresin hayvanlar üzerinde malignensi oranını arttırdığı gösterilmiştir (56). Kanser önlenmesinde, geciktirilmesinde ve karsinogenez sürecinde curcumin, selenyum, karoten gibi antioksidanların anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Karsinogenezde, apoptozis inhibisyonu, oksidan-antioksidan dengenin bozulması, genotoksin maruziyeti, genetik değişiklikler (p 53 mutasyonları vb.) gibi faktörler rol alırken, çeşitli kanserlerin destekleyici tedavilerinde antioksidan ajanlardan (curcumin, N-asetil sistin gibi) faydalanılmaktadır (57). Bunun yanında kadınlarda erkeklere göre oksidatif stresin daha düşük olduğu ve östrojenlerin doğal antioksidan olarak rol oynadığı, ayrıca lipid peroksidasyonunu engellediği gösterilmiştir (58).

Sigara içimi mesane kanserinde en önemli risk faktörü olup, olguların yaklaşık %50'sinde sigara içme öyküsü mevcuttur. Sigarada bulunan aromatik amin ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar böbreklerden eksrete edilerek üreteriyuma genotoksik etki yapmaktadır (10). Sigara içinde bilinen 4.700 kadar aromatik hidrokarbon ve nitroso bileşikler olup, sigara içenlerin idrarında bu toksinlerin oranı artarak mutajenik etkiye sebep olmaktadır (31).

Mesane kanseri patogenezinde ve yeni intravezikal ya da sistemik tedavi araştırılmalarında hayvan deneyleri önemli rol oynamaktadır. Karsinojenle uyarılmış mesane

kanseri modelleri sigara içimiyle ilişkili insan mesane karsinogenezisine benzemektedir. Deneysel çalışmalarda üreteryuma genotoksik olan sistemik ya da lokal karsinojenler kullanılmaktadır. OH-BBN, FANFT (36), MNU (39) ve dimetil arsenat (59) gibi moleküller deneysel mesane kanseri oluşturulmak için kullanılmışlardır. Doğrudan mesaneye verildiğinde hızlı mesane karsinogenezis oluşturabilen MNU ile diğer karsinojenlere göre daha kontrol edilebilen kanserojen maruziyeti sağlanabilmektedir.

İntravezikal indüksiyon ile oluşturulmuş deneysel mesane karsinogenezisinde kateterizasyonun erkeklere göre daha kolay olması sebebiyle bugüne kadar genellikle dişi sıçanlar kullanılmıştır (43). Erkek sıçanlar ise daha çok sistemik karsinojenlere maruz bırakılarak oluşturulan kanser modellerinde kullanılmıştır.

Ozon, ilk kez I. Dünya Savaşı'nda kullanılmış olan, geçmeyen yaralarda, doku nekrozunda, yara yeri iyileşmelerinde faydası gösterilmiş olan bir moleküldür. Yüksek dozda dezenfektan olarak etki gösteren ozonun düşük dozda antioksidan olarak etkisi gösterilmiştir (24). Ayrıca ozonun immün sistemi uyarıcı etkisi olduğu, antioksidan özelliğinin yanı sıra oksidan molekülleri de artırıp sitotoksik etkiyi artırdığı gösterilmiştir. İn vitro olarak nöroblastoma hücrelerine proliferatif etkiyi inhibe edici (60), akciğer, meme, uterus kanser hücre kültürlerinde büyümeyi engelleyici (61) özelliği gösterilen ozon, faz I çalışmasında E. coli enfeksiyonuna bağlı oluşan oksidatif stresi intravezikal olarak azaltmıştır (24). Mesane kanserinde intravezikal etkisi daha önce çalışılmamıştır.

Çalışmamızda geliştirdiğimiz erkek sıçan kateterizasyon yöntemiyle, mesane içi MNU instilasyonu ile oluşturulmuş mesane kanseri modelinde, intravezikal ozon tedavisinin histopatolojik ve oksidan (NO, MPO, MDA) antioksidan (SOD, GSH) değişimleri araştırılmıştır. Bunun yanında MNU ile oluşturulan mesane neoplazmları (KİOMK, displazi, hiperplazi) üzerine intravezikal ozonun etkisi değerlendirilmiştir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, tedavi ve kontrol grubu için gereken tüm işlemler, sakrifikasyon işlemi Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB) yapılmıştır. Hazırlanan mesane doku kesitleri, hematoksilen-eozin boyama ve inceleme işlemi Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Mesane dokusunda NO, MDA, GSH, MPO ve SOD aktivitesi Kocaeli Üniversitesi Biyokimya Anabilim dalında çalışılmıştır.

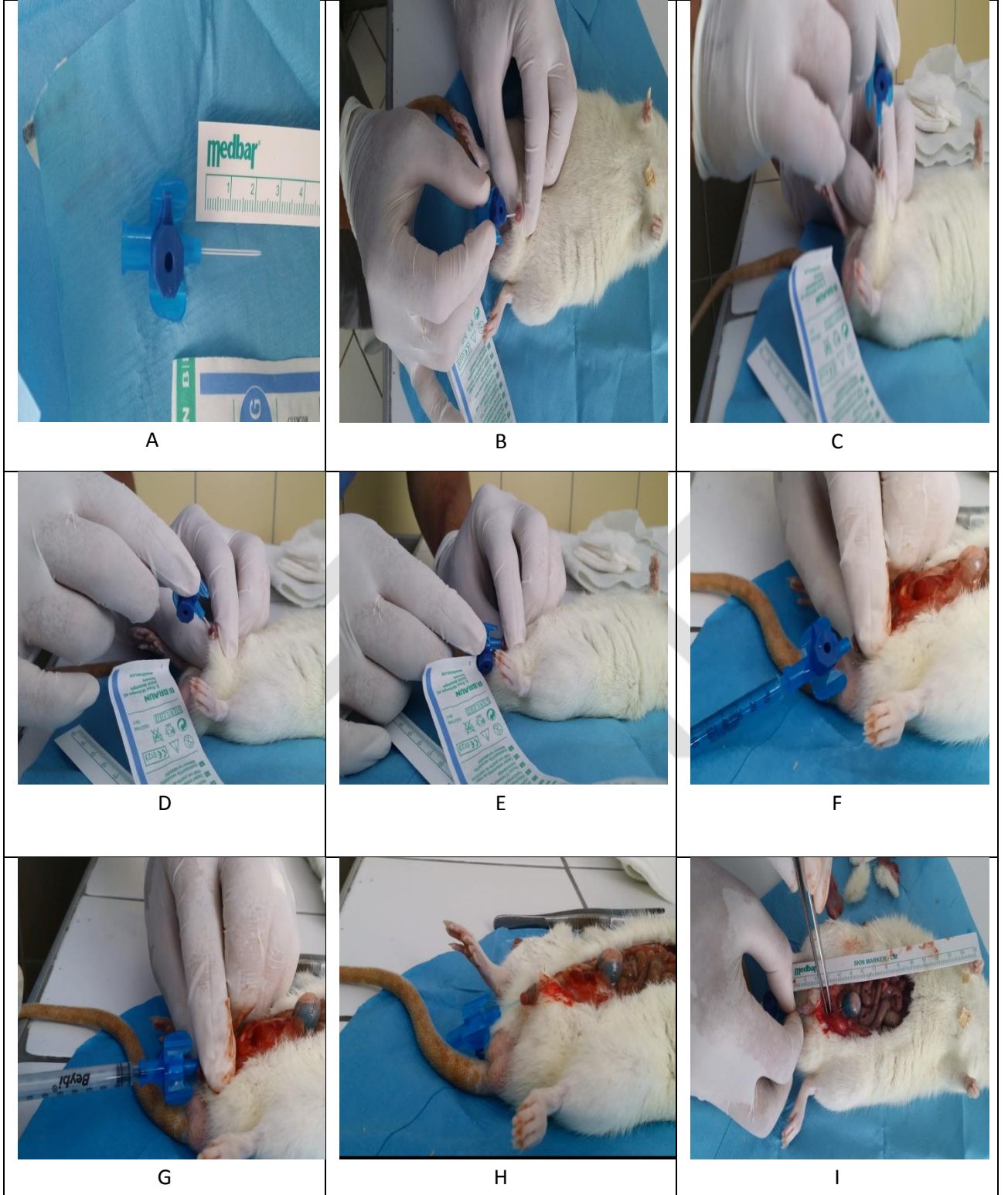
Çalışma 25.03.2014 tarihli ve Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KOÜ HADYEK) 3/4-2014 numaralı etik kurulu onayı ile Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

3.1. Denekler, Deney Grupları ve Deneysel Plan

Çalışmada toplam 51 adet 7-8 haftalık erkek Wistar albino türü sıçan kullanıldı. Deneklerin ortalama ağırlığı 150-200 gram olarak tartıldı. Denekler, standart kafeslerde 6, 7 veya 8'li gruplar halinde, *ad-libitum* standart yem ve su verilerek, ısısı (21 ± 2 °C) ve nem oranı % 60 civarında kontrol altında tutulan odalarda barındırıldı. Biyokimyasal parametrelerin etkilememesi için antibiyotik kullanılmadı (62).

Albino sıçanların etkilenmemesi için ışık şiddeti yerden 1 metre yüksekte 325-400 lux arasında olacak ve ışık kaynağı kafes seviyesinde olduğunda maksimum 130 lux olacak şekilde ayarlandı.

Denekler (n=51); sham (n=6), hasta (n=15), kontrol grubu (n=15) ve tedavi grubu (n=15) olarak gruplandırıldı.



Şekil 5. Sakrifiye edilmemiş canlı erkek sıçan instilasyonun metilen mavisi ile gösterilmesi. a) Deneyde kullanılan, dış uzunluğu 25 mm olan 22 G anjiokateter, b) prepisyum retrakte edildikten sonra penis ventral yüzde saat 6 yönünde eksternal meatus kateterize ediliyor, c) ilk kateterizasyon penis ile kuyruk arasında 90°'lik açı mevcut, d) kateter yavaşça ilerletilirken penis 120°'lik açı veriliyor, e) kateterin en son ilerlediği noktada 180°'lik açı verildiğinde kateterin bir miktar daha ilerlediği görülüyor, f) kateterizasyon sonrası karın ön duvarı açılmış,mesane görünüyor, g) kateter ve penis sabit tutulacak şekilde sol el parmakları ile klepmlenip instilasyon yapılıyor, h) instilasyon sonrası mesane mavi renk alıyor (metilen mavisi), i) kateter ile mesane boynu arasındaki mesafe (<10mm).

3.2.Optimal Anestezi, Erkek Sıçan Kateterizasyon ve İnstilasyon Tekniği (Şekil 5)

a- 45 IU Ketamin (Ketalar 500mg flakon, Pfizer) ve 15 IU Ksilazin (Alfazyn %2 50ml, Alfasan International) ile intraperitoneal (I.P.) enjeksiyon ile anestezi sağlandı.

b- Her sıçan anestezi enjeksiyon sonrası uyuduktan sonra sırt üstü yatırılıp, genital bölgesi, prepisyum ve prepisyum retrakte edilerek glans penis povidon iodin ile sterilize edildi.

c- Ardından şekilde görüldüğü gibi penis vücuda 90 derece açı ile tutulup, eksternal üretral meatus 0.9 x 25mm 22 G anjiokateter (Braun-Melsungen, Germany) ile kateterize edildi.

d- Penil üretra geçildikten sonra penis ve kateter kuyruğa paralele olacak şekilde 180 derecelik açıya getirildi. Bu esnada kateterin posterior üretraya doğru kaydığı gözlemlendi. Optimal anestezi olmadığı durumlarda ereksiyon oluşup posterior üretraya geçişi engelleyebilir. Bunu engellemek için ereksiyon olan her sıçana ketamin idame dozu (10 IU-15 IU) yapılmıştır.

e- Dominant olmayan el 1. ve 2. parmağı ile posterior üretraya yerleştirilmiş olan kateter penis ile birlikte sıkıştırılarak tutuldu ve kateterin instilasyon kısmına önceden yerleştirilmiş insülin enjektörünün pistonuna dominant el parmakları ile basınç uygulanarak, insülin enjektörü içindeki sıvının mesaneye geçişi sağlandı. Bu esnada pubik bölgede olan dominant olmayan elin 3. 4. ve 5. parmakları ile jet akım hissedildi.

f- Kateterizasyonun optimal olduğuna emin olunduktan sonra sıçan mesanesine instilasyonlar yapıldı.

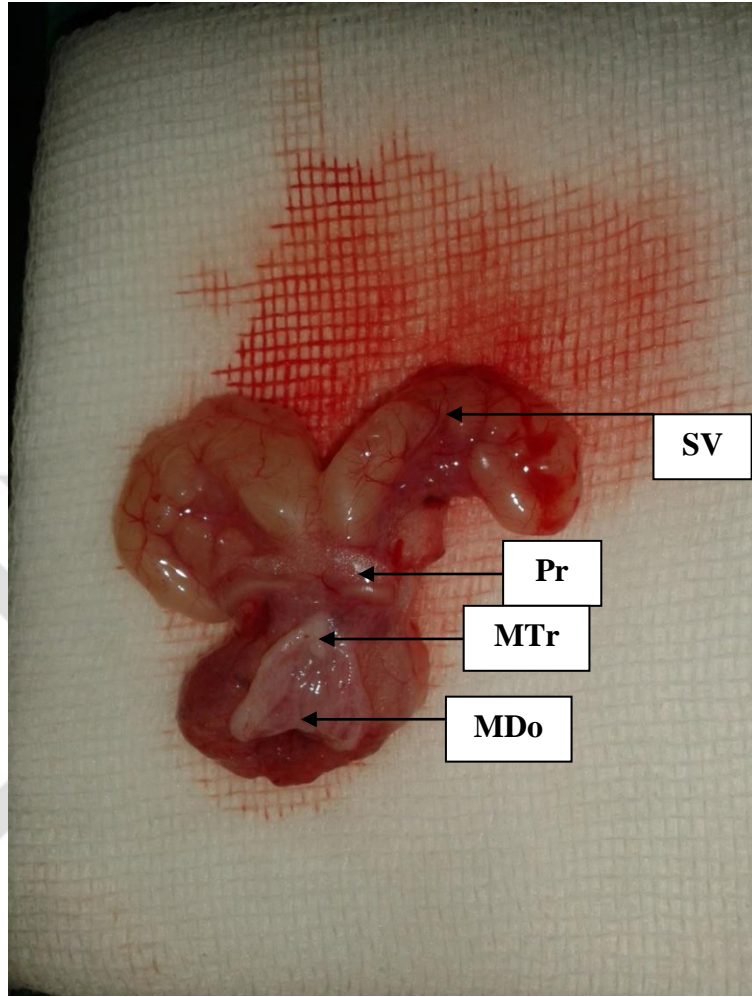
Gruplar	Anestezi	Karsinojen	Kullanılan Sıvılar
Sham (n=6)	Ketamin (45 IU) Ksilazin (15 IU)	Yok	Yok
Ozon (n=15)	Ketamin (45 IU) Ksilazin (15 IU)	Yok	-0.2. 4. 6. 8. 10. Haftalarda 0.2 ml %0,9 NaCl -7.8.9.10. haftalarda haftada iki, 11. ve 12. Haftalarda, haftada üç kez 1ml Ozonize su
MNU (n=15)	Ketamin (45 IU) Ksilazin (15 IU)	0.2. 4. 6.8.10. haftalarda 2mg/0,2ml MNU	-7.8.9.10. haftalarda, haftada iki, 11. ve 12. Haftalarda, haftada üç kez 1ml %0,9 NaCl
MNU+ozon (n=15)	Ketamin (45 IU) Ksilazin (15 IU)	0.2. 4. 6.8.10. haftalarda 2mg/0,2ml MNU	-7.8.9.10. haftalarda, haftada iki, 11. ve 12. Haftalarda, haftada üç kez 1ml Ozonize su

Tablo 7. Deneyde kullanılan anestetik ve karsinojenler ile sıvıların dozu ve sıklığı. Tedavi haftalarında kanserojen veya diğer sıvılar aynı günde uygulanmadı; aralarında en az iki günlük süre beklenmesine dikkat edildi.

Deney Grupları. 1. Sadece anestezi alan herhangi bir üretral instilasyon almayan sham grubu (6 adet denek). **2.** Sadece intravezikal ozon + Serum fizyolojik verilen denekler grubu (Kontrol grubu - 15 adet denek). **3.** İntravezikal olarak MNU verilen kanser oluşumu tetiklenen denekler grubu (Hasta grubu – 15 adet denek). **4.** İntravezikal MNU'ya ek olarak intravezikal ozon uygulaması alan denek grubu (Tedavi grubu - 15 adet denek). Deney grupları, anestezi yöntemi, karsinojenler ve kullanılan sıvılar **Tablo 7.**'de özetlenmiştir.

3.2.1. Sham Grubu. Hem mesane kanseri modelinde ozon tedavi etkinliğinin gösterilmesi, hem de kontrol, tedavi ve hasta gruplarına ait bulgularda normalden sapma miktarının belirlenmesi amacıyla oluşturuldu. Sham grubu deneklere, diğer grupların üretral instilasyon haftalarında yalnızca I.P. anestezi uygulandı. Sham grubuna herhangi bir instilasyon yapılmadı. 15. haftada Sham grubu denekleri diğer gruplarla olduğu gibi yüksek doz I.P. alfasin (40 IU Ksilazin) ve ketalar (100 IU ketamin) kullanarak sakrifiye edildi. Sakrifiye

edildikten sonra sistektomi yapıldı (Sistektomi spesmeninin görüntüsü **Şekil 6.**'te gösterilmiştir).



Şekil 6. Sistektomi materyali (çevre dokularla birlikte çıkartılmış)

SV:Seminal vezikül, Pr:Prostat, MTr: Mesane trigonu, MDo: Mesane Domu (kubbesi)

3.2.2. Ozon-Kontrol Grubu. Bu gruptaki bulguların, sham ve tedavi gruplarına ait bulgularla karşılaştırılması ile , intravezikal ozon tedavi yönteminin mesane normal dokusunda oksidan-antioksidan, histopatolojik veya toksik etki değişikliğini göstermek amaçlı oluşturuldu. Ozon düşük oranda kullanıldığında antioksidan bir molekül olduğundan (63) çalışmamızda, Taşdemir ve arkadaşlarının (24) önerdiği şekilde 1 ml % 0.9 NaCl'de 25 µg ozon olacak şekilde çözelti kullanılmıştır. Hicks ve arkadaşları toplam 2 hafta arayla 4 doz MNU uygulaması sonrası 7. haftadan itibaren displazi oluşumunu gösterdikleri için (39)

çalışmamızda ozon uygulamasının kemopreventif etkinliğinin test edilmesi amacıyla ozon uygulamaya 7. haftadan itibaren başlandı ve tekrarlayan dozları uygulandı.

Ozon temini için Ozonosan photonik 1014 (Dr. J. Hänslers GmbH, Iffezheim Germany) cihazı kullanıldı (**Şekil 7.**'da kullanılan cihaz gösterilmiştir.). Ozon, saf oksijenden Ozonosan photonik 1014 cihazından elde edilerek oksijen/ozon karışımı hazırlandı. Konsantrasyon oranları ozon/oksijen oranlarına göre 1-100 µg/ml arasında değişmektedir (1 µg/ml için %0,05 O₃-%99,95 O₂, 100 µg/ml için %5 O₃-%95 O₂ karışımı gerekmektedir). Ozon uygulamasının Alman Tıp Birliği tarafından 80 µg/ml üzerinde uygulaması hemoliz riskinden ötürü önerilmemektedir (64).

Bocci ve arkadaşları (65) değişik dozlarda (20, 40, 60, 80 µg/ml) ozon uygulanması ile kanda dozla doğru orantılı olarak GSH ve total antioksidan seviyelerinin azaldığını ve lipid peroksidasyonunda artma olduğunu göstermişlerdir. Bundan dolayı çalışmamızda düşük doz ozon konsantrasyonu için 25 µg/ml kullanılmıştır.

Ozon uçucu bir gaz olması, 20 °C de cam enjektörde yarı ömrünün 40 dk olması nedeniyle (66), 25 µg/ml kalibrasyonu sonrasında kronometre ile 10 dk'lık ozonizasyon sonrası 1 ml çözelti alınarak, 1 dk'yı geçmeyecek şekilde sıçan mesanesine instile edildi. İnstilasyon süresinin üretra kateterizasyon zorluğu veya diğer nedenler ile uzadığı durumlarda tekrar ozonizasyon yapılarak yeni sıvı kullanıldı. Bu grupta ilk 10 hafta boyunca 2 haftada bir olacak şekilde mesaneye 0,2 ml serum fizyolojik, 7., 8., 9. ve 10. haftalarda haftada iki kez, 11. ve 12. haftalarda ise haftada üç kez I.P. anestezi sonrası 25 µg/ 1 ml ozon içeren solüsyon verildi. Ozonize çözelti yaklaşık 20 dk mesanede kaldıktan sonra parmak yardımı ile boşaltıldı. Hayvanın uyanması ile birlikte spontan boşalmanın tamamlandığı gözlemlendi. 15. haftada kontrol grubu denekleri de sham grubunda olduğu gibi sakrifiye edildi.

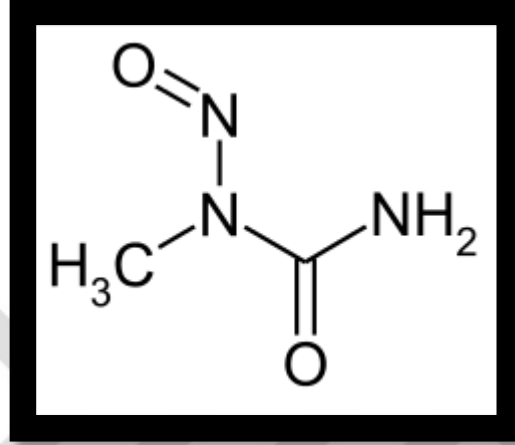


Şekil 7. Ozonasan Phototonik 1014 ozon jeneratörü.

3.2.3.Hasta Grubu. Mesane kanseri modeli hasta ve tedavi gruplarına uygulanıp sham ve ozon kontrol gruplarına uygulanmadı. Hicks ve Wakefield'in (39) çalışmasında tarif ettiği yöntemle benzer şekilde intravezikal indüksiyonla oluşturulan mesane kanseri modeli kullanıldı:

Anestezik enjeksiyondan 5-10 dk sonrasında aynı kateterizasyon-instilasyon yöntemiyle transüretal 2,0 mg/ 0,2 ml MNU (Sigma Aldrich, MO, USA) verildi. pH=7,00'de karsinojenik etkisi 72 dk olan MNU (39) her uygulama öncesi 2,0 mg MNU (MNU'nun yapısı **Şekil 8.**'de gösterilmiştir) 0,20 ml %0,9 NaCl ile çözülerek hazırlandı. Anestezi altındaki sıçana en kısa sürede instile edildi. Bu aşamada rutin önlemler (Gözlük,

maske gibi) alındı. Mesane içinde 15-25 dk boyunca kaldıktan sonra spontan miksiyon ile deneklerin işediği görüldü. Hicks ve Wakefield'in yönteminden (39) farklı olarak erkek sıçan mesanesinin tam boşaltılamaması ve olası konsantrasyon düşebilme ihtimali nedeniyle toplam doz 12 mg olacak şekilde 0., 2., 4., 6., 8. ve 10. haftalarda instilasyon yapıldı. 7., 8., 9. ve 10. haftalarda haftada iki kez, 11. ve 12. haftalarda üç kez 1 ml %0,9 NaCl instile edildi. 15. haftada denekler diğer gruplarla aynı şekilde sakrifiye edildi.



Şekil 8. MNU biyokimyasal formülü.

3.2.4.Tedavi Grubu. Bu gruptaki bulguların hasta ve kontrol gruplarına ait bulgularla karşılaştırılması ile intravezikal ozon uygulamasının karsinojenik maddeye maruz kalan mesane dokusundaki etkileri araştırılmıştır. Modelin geliştirildiğinin yayınlandığı ilk çalışmalarda hiperplazinin 6. hafta, displazinin 7. hafta (39), neoplastik lezyonların ise 10. haftada (47) oluştuğu gözlemlendiği için tedavi grubuna 7. haftadan itibaren intravezikal ozon uygulandı.

Hasta grubuyla aynı protokolde MNU alan deneklere, tedavi olarak 7. , 8. , 9. ve 10. haftalarda haftada iki kez , 11. ve 12. haftalarda üç kez 25 µg/ml ozon instile edildi. Kontrol grubuyla aynı protokolde ozonizasyon sağlanıp, 1 dk içerisinde instilasyon yapıldı. 15-25 dk boyunca mesanede kalan ozonize çözeltinin 20 dk sonunda spontan işeme ile atıldığı görüldü. 15. haftada tedavi grubu denekleri diğer gruplarla aynı şekilde sakrifiye edildikten sonra sistektomi yapıldı.(Doz şeması **Tablo 7.**'de gösterilmiştir.)

3.3. Sakrifikasyon ve Sistektomi

Sakrifikasyon ve sistektomi işlemi tüm deneklere aynı yöntemle uygulandı. Tüm gruplara 12 haftalık instilasyonlar bittiğinde 15. haftada sakrifikasyon işlemine alındı. I.P. yüksek doz ketamin-ksilazin (100 IU-40 IU) kombinasyonu ile kardiyopulmoner arrest oluşturuldu. Takip eden 10 dk içinde, sırtüstü yatar pozisyonda, transüretal 22 G anjiokater yardımıyla 1 ml %0.9 NaCl izotonik çözeltileriyle mesane şişirildikten sonra, orta hat insizyon ile cilt ciltaltı dokular geçilip, mesane künt ve keskin diseksiyonla çevre dokulardan ayrılıp total sistektomi yapıldı.

Sistektomi işlemi sonrası mesane dokusu kubbeden boyuna doğru insize edilerek ikiye ayrıldı (**Şekil 9.**). Tüm grupların mesanelerinin randomize bir şekilde yarısı hassas terazide tartılıp ardından soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra likid nitrojene yerleştirdi ve -80°C 'de saklandı. Bu doku Biyokimya Anabilim Dalı'nda incelendi. Mesanenin diğer yarısı ise formol solüsyonuna konup histopatolojik inceleme için Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi.



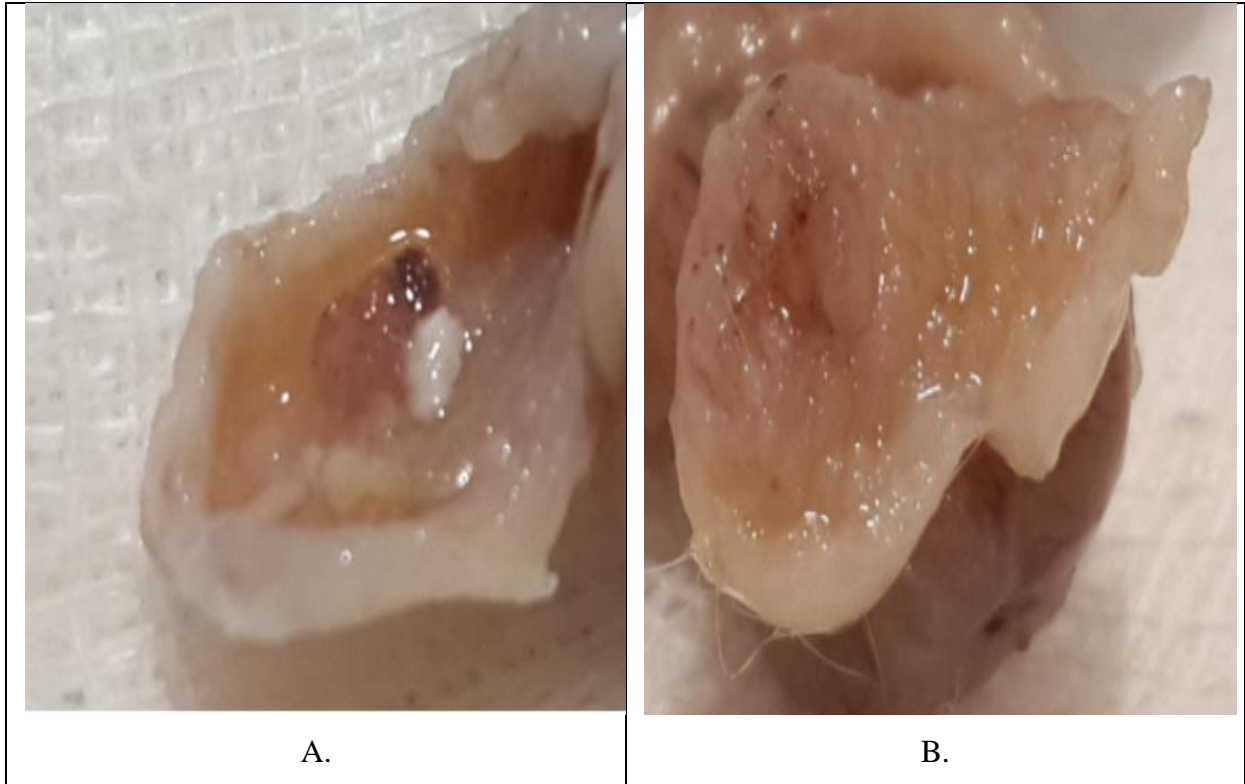
Şekil 9. Sistektomi spesimeninde mesane kubbeden ikiye ayrılmış şekilde; insizyon hattında hiperplazi görülmektedir.

3.4. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analiz

Sistektomi materyali öncelikle makroskopik olarak değerlendirildi. Mukoza yüzeyinden kabarık lezyonlar varsa lezyonu içine alacak şekilde tam kat kesit alındı. Makroskopide lezyon görülüyorsa trigondan geçecek şekilde tam kat kesit alındı (**Şekil 9**). Kesitler %10'luk formalin, alkol ve ksilenden geçirilerek doku takibi yapıldı ve parafine gömülerek her hayvana ait bir blok hazırlandı.

Bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındıktan sonra hematoksilin-eozin ile boyanarak mikroskop altında değerlendirildi. Mikroskopik değerlendirmede epitel değişiklikleri normal, hiperplazi, displazi, insitu ürotelyal karsinom, ürotelyal karsinom olarak sınıflandırıldı. Tümör gelişen olgular, düşük veya yüksek dereceli olarak ikiye ayrıldı. Aynı zamanda *lamina propria* veya *muscularis propria* invazyonu yönünden değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal inceleme yapılarak tüm bloklardan bir kesit alınıp MIB-1/Ki67 antikoruna uygulandı. Epitel hücrelerinde en yoğun çekirdek reaksiyonu olan alanlar seçilerek ardışık yüz hücrede kaç hücrenin pozitif reaksiyon verdiği sayılıp yüzdelik oran olarak kaydedildi.



Şekil 10. MNU ve MNU+ ozon alan dokuların makroskopik görüntüsü **A.**MNU grubunda pT1 YDPÜK ve **B.** MNU+ozon grubunda CIS olgularının makroskopik görüntüleri.

3.5. Biyokimyasal Analiz

3.5.1. Olguların Seçimi ve Örneklerin Toplanması

Kubbeden itibaren trigona doğru ikiye ayrılmış mesane dokularından randomize bir şekilde yarısı biyokimya ana bilim dalında incelenmek üzere – 80 °C de saklandı.

3.5.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Kullanılan cihazlar, kimyasallar ve üretici firmaları **Tablo 8** de belirtilmiştir.

Cihaz/Kimyasal	Marka
Derin dondurucu -80°C	Nuaire
Spektrofotometre	Shimadzu UV1240
Santrifüj	Nüve NF 800 R – Eppendorf 5810 R
Benmari	Nüve BM 402
Homojenizatör	Ultra-Turraks T 25
Vorteks	Nüve NM 110
Hassas terazi	Sartorius BL 2105
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 301
pH metre	Crison GLP 22
KCl	Merck TA659635
Na ₂ CO ₃	Merck K28996729
Bovin serum albumin	Sigma A-4503
NaOH	Riedel-de Haen 06203
Na-K tartarat	Merck A655285
CuSO ₄	Merck A810587
Folin ayırıcı	Sigma F-9252

Tablo 8: Biyokimyasal Gereçler

3.5.3. Doku Protein Düzeyi Ölçümü

Protein düzeyi Lowry yöntemi kullanılarak hesaplandı(67).

3.5.3.1. Ayıraçlar

1- Ayıraç A. %2 Na₂CO₃ (0,1 N NaOH içinde çözülerek hazırlandı). 0,4 g NaOH 100 ml'lik balon joje içersinde distile su ile hazırlandı. 2 g Na₂CO₃ tartılarak çözülmüş NaOH bulunan balon jojeye konuldu ve çözülerek son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2- Ayıraç B. %2 Na-K tartarat, %1 CuSO₄ ve ayıraç A karışımıdır. 0,2 g Na-K tartarat 10 ml'lik balon joje içersinde distile su ile hazırlandı. 0,1 g CuSO₄ 10 ml'lik balon joje içersinde distile su içinde hazırlandı. 1 ml %2'lik Na-K tartarat, 1 ml %1'lik CuSO₄ ve 98 ml ayıraç A karıştırılarak ayıraç B hazırlandı.

3- Folin ayıraç (2 N). Hazır bulunan folinden 2 N'e ayarlama yapıldı.

4- Standart bovin serum albumin (BSA) çözeltisi (1 mg/ml). % 0,9'luk NaCl hazır alındı. 10 mg folin tartılarak üzerine 10 ml'lik % 0,9'luk NaCl eklenerek 1 mg/ml lik'lik standart hazırlandı.

5- Doku homojenatı. 0,5 g doku tartılarak 5 ml 0,15 M KCl çözeltisi içinde homojenize edilerek %10'luk homojenat elde edildi. %10'luk doku homojenatı ayrı bir tüp içinde 1/40 oranında % 0,9'luk NaCl ile dilüe edilerek kullanıldı.

3.5.3.2. Çalışma Yöntemi

Kör, standart ve numuneler için üçer adet tüp hazırlandı. Çözeltiler aşağıdaki **Tablo9.**'daki miktarlarda tüplere eklendi:

Çözeltiler	Kör	Standart	Örnek
% 0,9'luk NaCl	0,1 ml	0,875 ml	0,05 ml
Doku homojenatı	-	-	0,05 ml
Ayıraç B	1 ml	1 ml	1 ml
BSA Standartı	-	0,125 ml	-
Bütün tüpler 10 dakika bekletildi.			
Folin ayıracı	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml

Tablo 9. Çözeltilerin içerikleri

Bütün tüpler 45 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 660 nm'de absorbansları okutuldu.

3.5.4. Doku MDA Düzeyi Ölçümü

Sunred Biological Technology Sıçan MDA ELISA (SRB/shanghai, China) kiti kullanılarak, ELISA yöntemiyle ölçüldü. Sunred kiti için Sensitivitesi 1 pmol/ml, efektif aralığı 1 μ M- 100 μ M. Doku MDA düzeyleri proteine oranlanarak nmol/mg Prt olarak verildi.

3.5.5. NO Düzeyi Enzimatik Yöntemle Ölçümü

NO, Cayman Chemicals (Northwest, Life Science Specialties, LLC, Vancouver, WA, CANADA) kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüldü. Cayman kiti için sensitivitesi 1 pmol/ml, efektif aralık 1 μ M- 100 μ M. Doku NO düzeyleri proteine oranlanarak nmol/mg Prt olarak verildi.

3.5.6. Doku GSH Düzeyi Ölçümü

Sunred Biological Technology (SRB/shanghai, China) GSH kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüldü. Sunred kiti için sensitivitesi 1 pmol/ml, efektif aralık 1 μ M-100 μ M. Doku GSH düzeyleri proteine oranlanarak μ g/mg Prt olarak verildi.

3.5.7. Doku SOD Aktivite Ölçümü

Cayman Chemicals Company (Ann Arbor, MI, USA) kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüldü. Cayman kiti için deney içi katsayısı %3,2'dir. Doku SOD aktiviteleri proteine oranlanarak U/mg Prt olarak verildi.

3.5.8. Doku MPO Ölçümü

Sunred Biological Technology (SRB/shanghai, China) kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüldü. Doku MPO düzeyleri proteine oranlanarak ng/mg Prt olarak verildi.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Toplanan verilerin istatistiksel analizi için STATA MP Parallel Edition (Statistics/Data Analysis Stata Corp Texas USA) sürüm 13.1 istatistik programı kullanıldı. Sonuçlar ortanca (çeyrekler arası açıklık [IQR]: %25-75) olarak raporlandı. Sürekli değişkenlerin değerlendirilmesinde ikili gruplar için Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney), ikiden fazla grup arasında değerlendirme için Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. Değişkenler arası korelasyon değerlendirmesi için Spearman'ın sıralama korelasyon katsayısı kullanıldı (68). Yapılan tüm testlerde p değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Sıçanların yaklaşık %25'i (13/51) anestezi sonrası gelişen ani kardiyopulmoner arrest veya ürosepsis nedeniyle deney sonuna kadar yaşamlarını sürdüremedi. Kayıpların tümü ilk 6 haftalık süreçte meydana geldi. **Tablo 11**'de gruplara göre ölen ve hayatta kalan sıçanlar özetlenmiştir.

TOPLAM (n=51) (%100)	SADECE MNU (N=15)	MNU+OZON (N=15)	SADECE OZON (N=15)	SHAM (N=6)
ÖLEN (n=13) (%25,4)	4 (%26,6)	3 (%20)	5 (%33,3)	1 (%16,6)
SAKRİFİYE EDİLEN (n=38) (%74,6)	11 (%73,4)	12 (%80)	10 (%67,6)	5 (%83,4)

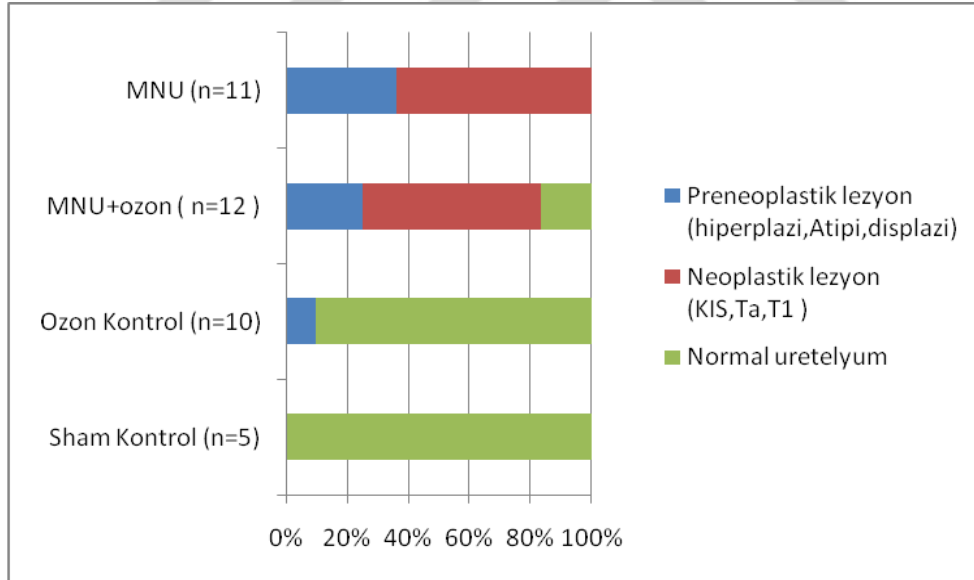
Tablo 11. Deneyde hayatta kalan ve ölen sıçanların dağılımı.

4.1. Histopatolojik Değerlendirme

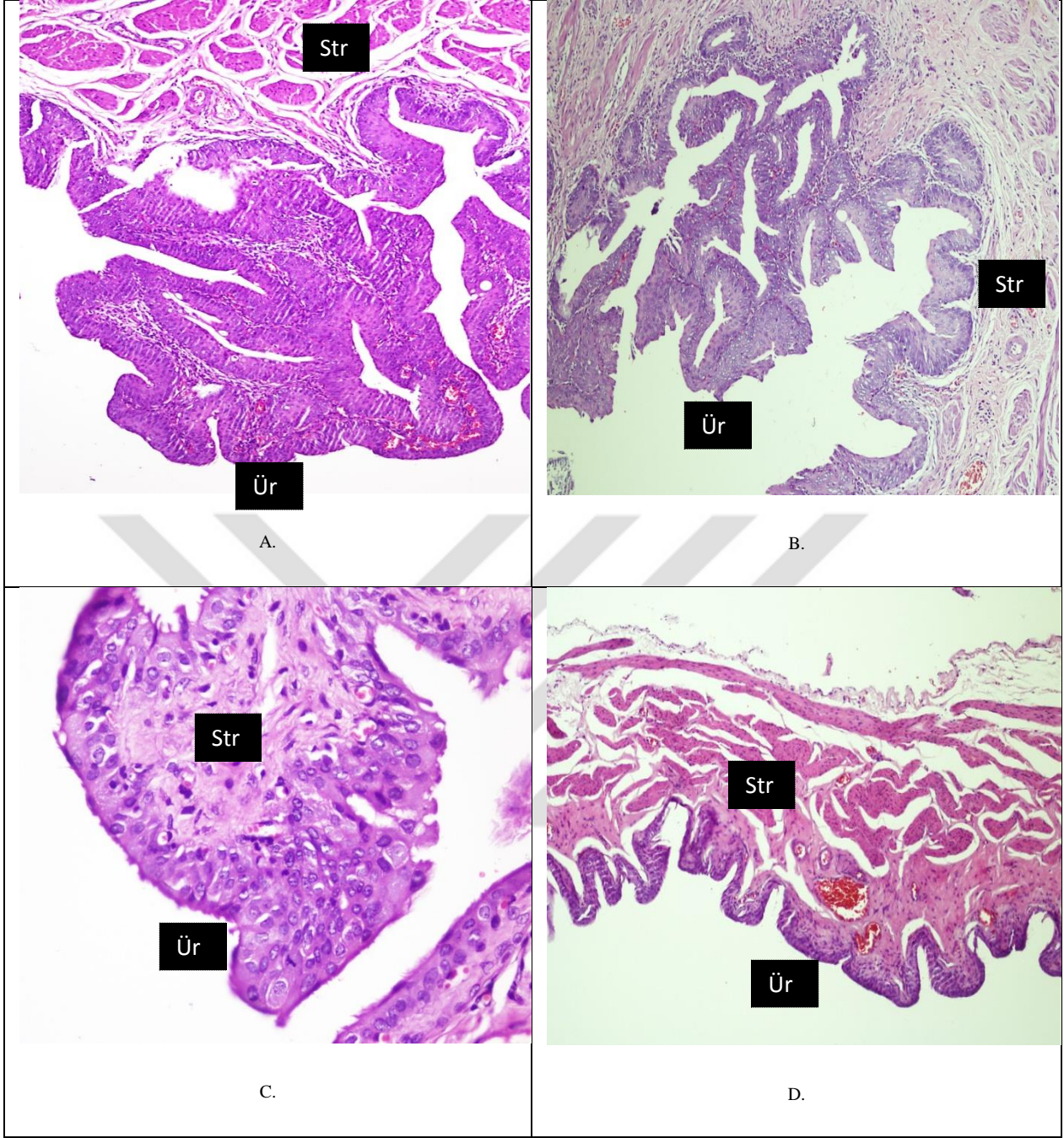
Histopatolojik değerlendirme **Tablo 12.** ve **Tablo 13.**'de özetlenmiştir. Deney sonunda normal üretelyuma sahip olma oranı en yüksek %100 (n =5) ile sham grubunda idi. Ozon, MNU+ozon, MNU grubunda ise sırasıyla %91 (9/10), %16 (2/12), %0 (0/11) idi (**Şekil 11.**). Ozon grubunda görülen tek hiperplazi olgusunda beraberinde mesane içinde dev taş olması dikkat çekti. KİOMK görülme oranı en fazla MNU grubunda olup %63 (7/11) idi. MNU+ozon, Ozon ve Sham gruplarında ise sırasıyla %58 (7/12), %0 (0 /10) ve %0 (0/5) idi. (Preneoplastik ,Neoplastik ve normal üretelyal dokuların mikroskopik görüntüsü **Şekil 12.**) Preneoplastik lezyonların MNU, MNU+ozon, Ozon ve Sham gruplarında görülme oranı sırasıyla, %37 (4/11), %25 (3/12) ve %10 (1/10) idi. KİMT hiçbir denekte izlenmedi.

TOPLAM (n=38) (%100)	MNU (N=11)	MNU+OZON (N=12)	OZON (N=10)	SHAM (N=5)
Normal Üretelyum	0 (%0)	2 (%16)	9 (%90)	5 (%100)
Preneoplastik lezyonlar (hiperplazi,displazi/düşük dereceli intraepitelyal neoplazi)	4 (%37)	3 (%25)	1 (%10)	0 (%0)
KİOMK (CIS/yüksek dereceli intraepitelyal neoplazi, pTa, pT1)	7 (%63)	7 (%58)	0 (%0)	0 (%0)
KİMİK (pT2, pT3, pT4)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)

Tablo 12. Preneoplastik, neoplastik ve normal üretelyum dokularının gruplara göre dağılımı.



Şekil 11. Normal, preneoplastik ve neoplastik lezyonların dağılımı.



Şekil 12. Üretelyum ve stromal hücrelerin HE boyamayla gösterilmesi. **A.** MNU grubunda Yüksek dereceli pT1 Transizyonel hücreli karsinom (10x büyütme), **B.** MNU+ozon grubunda düşük dereceli pT1 transizyonel hücreli karsinom (10x büyütme), **C.** MNU grubunda CIS görüntüsü (40x büyütme), **D.** Ozon grubunda normal üretelyum (10x büyütme). Str: Stroma, Ür: Üretelyum.

TOPLAM (n=38) (%)	MNU (N=11)	MNU+OZON (N=12)	OZON (N=10)	SHAM (N=5)
Normal	0(%0)	2(%16,6)	9(%90)	5(%0)
Hiperplazi	1(%9)	1(%8,3)	1(%10)	0(%0)
Displazi/Atipi (Düşük Dereceli intraepitelial neoplazi)	3(%27,2)	2(%16,6)	0(%0)	0(%0)
KIS (Yüksek Dereceli intraepitelial neoplazi)	3(%27,2)	1(%8,3)	0(%0)	0(%0)
Ta	2(%18,18)	3(%25)	0(%0)	0(%0)
T1	2(%18,18)	3(%25)	0(%0)	0(%0)
T2 ve üstü	0(%0)	0(%0)	0(%0)	0(%0)

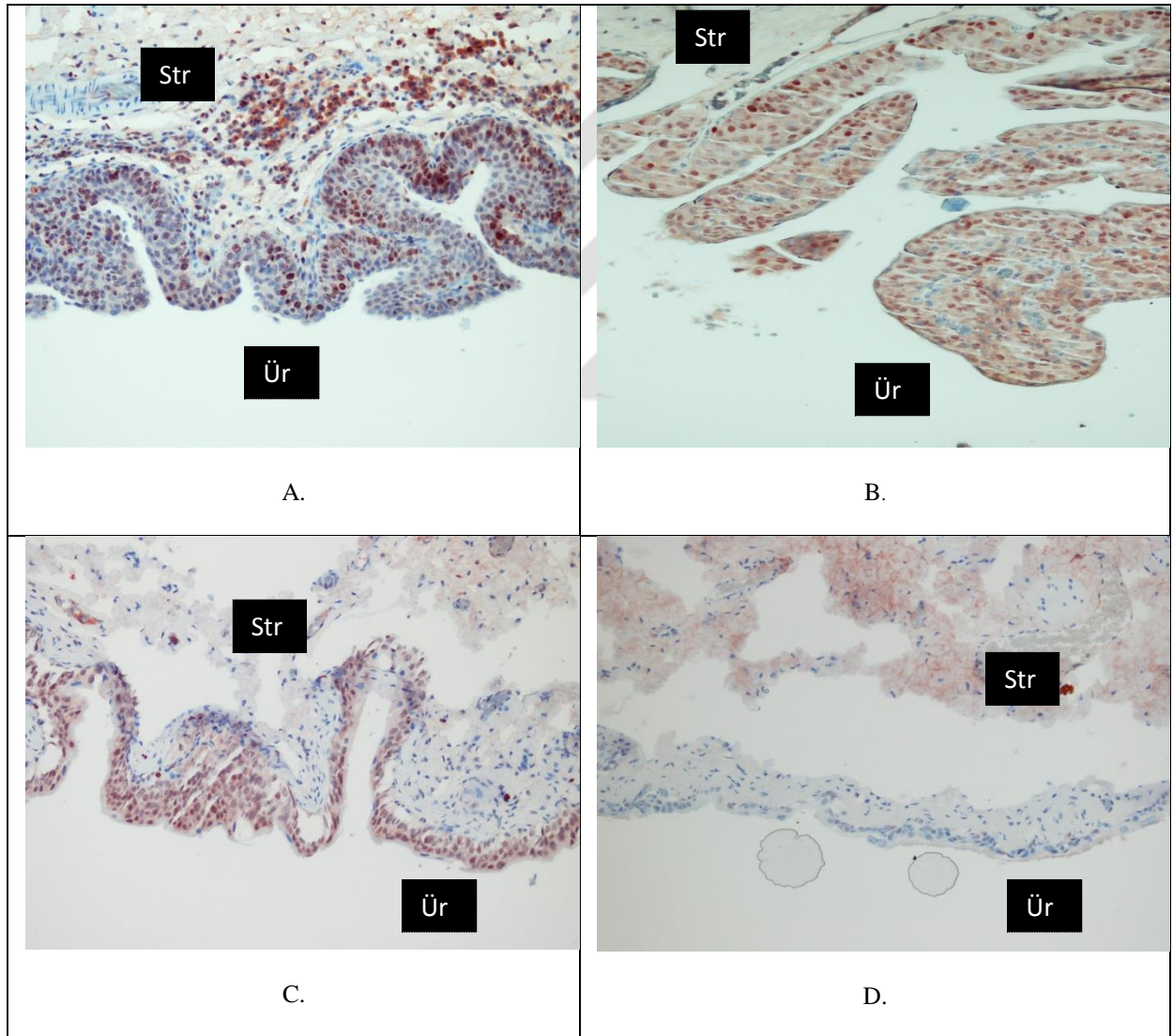
Tablo 13. Gruplara göre ayrıntılı histopatolojik dağılım.

4.2. Proliferatif İndeks Tayini

MNU grubunda sham grubuna göre, MNU+ozon grubunda ise ozon grubuna göre anlamlı olarak proliferatif indeksin artmış olduğu görüldü (sırasıyla $p=0,009$, $p=0,0005$). MNU ve MNU+ ozon arasında istatistiksel açıdan fark izlenmedi ($p=0,385$). (Tablo 14.) Proliferatif indeksin gruplara göre gösterilmesi Şekil 13. gösterilmiştir.

TOPLAM (n=38) (%)	MNU (N=11)	MNU+OZON (N=12)	OZON (N=10)	SHAM (N=5)
Ki 67 %	%15 ^{a,b}	%22,5 ^{a,b}	%0 ^a	%0 ^a

Tablo 14. Gruplara göre proliferatif indeks dağılımı. a: MNU ve MNU+ozon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sham ve Ozon gruplarına göre farklılık var, b: MNU ve MNU+ozon grupları arasında istatistiksel fark yok.



Şekil 13. Proliferatif indeks hesaplanması için kullanılan görüntüler. **A:** MNU grubundan %60 proliferatif indeks LP invazyonu görülmekte (20x). **B:** MNU+ozon grubundan pTa düşük dereceli %15 Ki 67 pozitif örnek (20 x). **C:** Ozon grubundan normal üreteryum Ki 67 %1 (20 x) **D:** Sham grubundan Ki 67 negatif boyama (20 x)

4.3. Biyokimyasal Bulgular

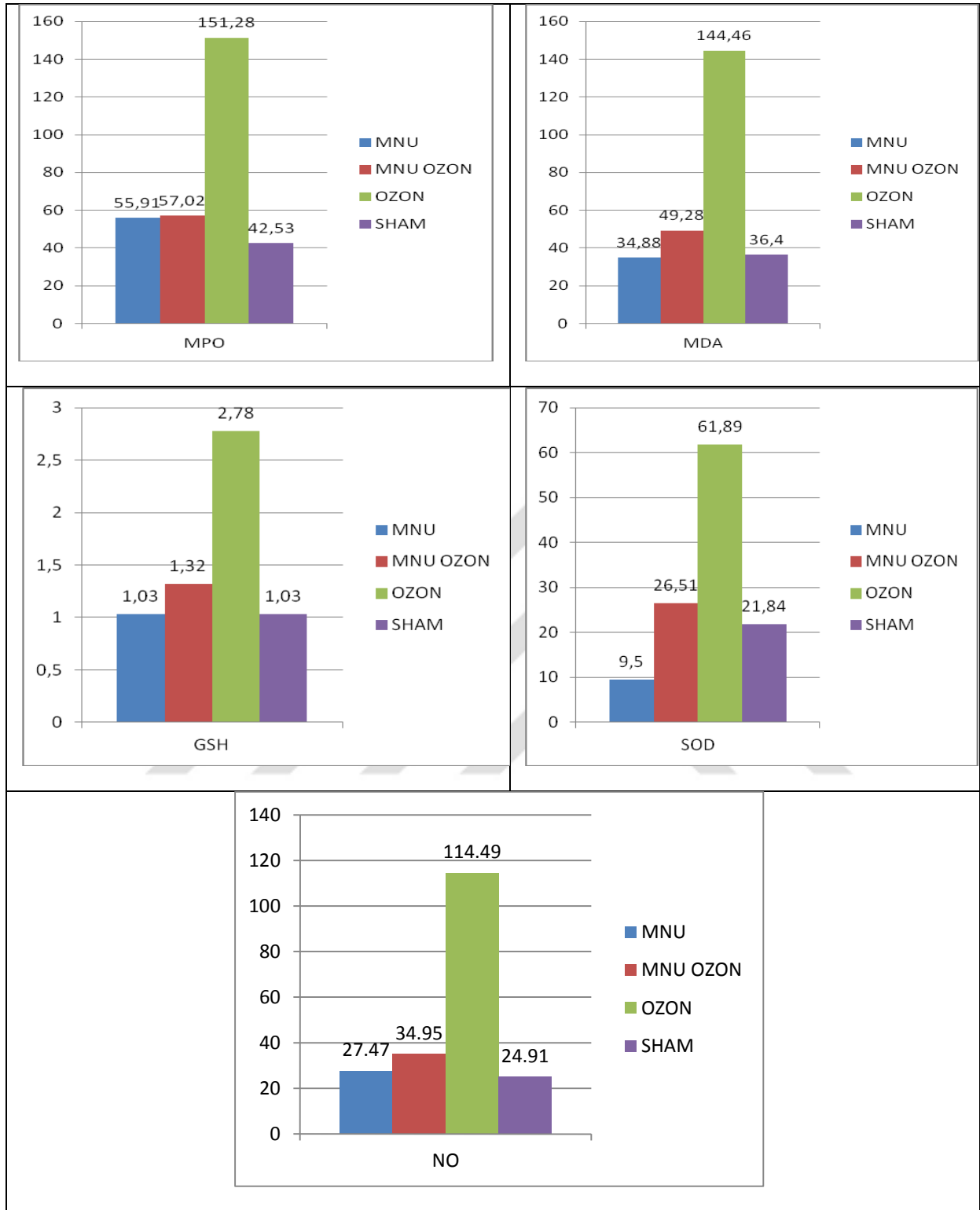
Oksidan ve antioksidan parametrelerin ortanca dağılımının gruplara göre dağılımı **Tablo 15.** 'te özetlendi.

	A-MNU	B-MNU+OZON	% B-A	C-OZON	D-SHAM	% C-D
NO (nmol/mg)	27,47	34,95	+ 27,23	114,49	24,91	+359,6
MPO (ng/mg Prt)	55,91	57,02	+ 1,90	151,28	42,53	+255,7
MDA (nmol/mg Prt)	34,88	49,28	+ 41,28	144,46	36,40	+296,8
Glutatyon (µg/mg Prt)	1,03	1,32	+ 28,15	2,78	1,03	+169,0
SOD (U/mg Prt)	9,50	26,51	+ 179,00	61,89	21,84	+183,3

Tablo 15. Oksidan ve antioksidan parametrelerin median değerlerinin gruplara göre dağılımı.

4.3.1. İntravezikal Ozon Normal Mesane Dokusunda Hem Oksidan Hem de Antioksidan Parametreleri Yükseltiyor (Tablo 15, C eksi D). Ozon, oksidan özelliği olan MPO, NO, MDA miktarını sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p<0,05$) yükseltirken buna paralel olarak antioksidan parametreleri de (SOD ve GSH) istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p<0,05$) yükseltiyor.

4.3.2. İntravezikal Ozon MNU Alan Dokuda Belirgin Antioksidan Kapasiteyi Arttırıyor (Tablo 15, B eksi A). Ozonun MNU grubuna göre MNU+ozon grubunda NO, MPO ve MDA miktarlarında artış yaptığı halde bunun anlamlı bir değişikliğe ulaşmadığı gözlemlendi ($p=0,75$, $p=0,71$, $p=0,75$). Ozona bağlı antioksidan değişiklik GSH'da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,87$). SOD'da da istatistiksel anlamlılık yoktu, ancak belirgin bir yükselme saptandı ($p=0,06$ - Şekil 14).



Şekil 14: Gruplarda Oksidan (MPO, MDA, NO) – Antioksidan SOD, GSH) parametrelerin karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Erkeklerde kadınlara göre mesane kanseri gelişim riski 3 kat fazla olmasına rağmen (10) KİOMK tedavisinde yeni intravezikal tedaviler için deneysel çalışmalarda, bugüne kadar anatomik avantajlar ve kolaylık nedeni ile genellikle dişi sıçanlar (43, 69) kullanılmıştır. Östrojenlerin doğal antioksidan etkisinin (58) intravezikal yeni tedavi modaliteleri ve oksidatif stres araştırılması için yanıtıcı etkisi olabilir. Bu nedenle erkek sıçanları tercih ettik. Erkek sıçanlarda kateterizasyon metodolojisi ve anatomisi iyi bilinmediği için çalışmamızda kendi geliştirdiğimiz kateterizasyon yöntemini kullandık. Yaman ve arkadaşlarının (44) çalışmasında erkek sıçanların transuretral kateterizasyonu ile mesane kanseri modeli oluşturulmuş, 22. haftaya kadar 10/50 (%20) oranında neoplastik değişiklikler izlenmiştir. Bizim çalışmamız, Yaman ve arkadaşlarının çalışmasıyla karşılaştırıldığında, 15 hafta gibi kısa bir sürede 14/23 (%60,8) oranında KİOMK gelişimi izlenmiştir. Çalışmamızda, erkek sıçanlarda intravezikal indüksiyon ile oluşturulmuş KİOMK modelinde intravezikal ozonun etkisi araştırılmış ve oksidatif stres faktörlerindeki değişiklikler incelenmiştir.

Daha önceki dişi sıçan kullanılan, intravezikal indüksiyon ile oluşturulan deneysel karsinogenezis çalışmalarında üretral darlık ve ürosepsis denek kayıplarında önemli bir etken olduğu gösterilmiştir. Halbuki çalışmamızdaki kayıpların hepsi ereksiyonu önlemek için yapılan derin anestezi (ksilazin- ketamin kombinasyonu) uygulaması sonrası 1-2 saat içinde oldu. Ölümün ilk 6 (altı) haftada olması tedaviye 7. haftada eklenen ozonun toksik etkisi olmadığını düşündürmektedir. Bundan dolayı hayvan ölümlerinin uygulanan anesteziye bağlı kardiyopulmoner arrest, hava yolu obstrüksiyonu sonucu olmuş olabileceğini düşündük. 7. haftadan sonra yapılan anestezilerde ölüm olmaması, anesteziye karşı adaptasyon gelişebileceğini ya da sıçanların büyümesine bağlı dayanıklı hale gelmiş olmasını düşündürmektedir. Bu nedenle ereksiyonu engelleyecek kadar derin anestezi sağlayan, ancak kardiyopulmoner arrest oluşturmayacak kadar yan etki profili az olan bir ajana ihtiyaç vardır. Daha önceki çalışmalarda enfeksiyon ve enfeksiyona bağlı skuamöz metaplazi oluşumunu engellemek için antibiyotik kullanımı (37, 45, 51) yaygın olmasına rağmen çalışmamızda olası antioksidan-oksidan dengenin bozulmaması için (62) antibiyotik kullanılmamıştır. Buna rağmen çalışmamızda kayıp oranı %25 (13/51) iken, antibiyotik kullanılan bazı çalışmalarda dahi yüksek oranlarda %25 (51), %11 (45) kayıp bildirilmiş olması, erkek sıçanlarda

yapılacak intravezikal çalışmalarda antibiyotik kullanımının gerekemeyebileceğini düşündürmektedir.

Toplam 6 doz intravezikal MNU uygulaması sonrası sıçanlar 15. haftada sakrifiye edildiğinde KİOMK oluşum oranı MNU ve MNU+ozon gruplarında birbirine benzer (%63, %58) iken, MNU+Ozon grubunda iki denekte normal üreteryumun görülmesi ozonun mesane karsinogenezisini engelleyebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca düşük dereceli intraepitelyal neoplazi riskinin, MNU+ozon grubunda MNU grubuna göre %10,6, yüksek dereceli intraepitelyal neoplazi (CIS) gelişimi riskinin ise MNU+ozon grubunda MNU grubuna göre %18,9 daha az olması (**Tablo 13**), ozonun intraepitelyal lezyonlarda yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Palmeira ve arkadaşlarının insan ve sıçan mesane kanseri modelini karşılaştırdığı çalışmada, insan ve sıçan mesane neoplastik lezyonlarının agresifliği arttıkça Ki-67 proliferatif indeksin arttığı gösterilmiştir (40). Çalışmamızda, MNU alan gruplarda, MNU almayanlara (Sham, sadece ozon) göre istatistiksel anlamlı bir şekilde Ki-67 proliferatif indeksin artmış olduğu görüldü. Ancak MNU ve MNU+ozon grupları arasında istatistiksel bir fark yoktu. Bu sonuç, MNU'nun proliferatif yanıtı neden olduğunu göstermekte, ancak MNU varlığında ozonun antiproliferatif etkisini göstermediğini ortaya koymaktadır (**Tablo 14**).

Oksidatif stres oluşumunda serbest oksijen radikalleri (SOR) rol oynamaktadır. SOR, kanser hücrelerinde hücre siklusu, enerji metabolizması, apoptozis, hücre sağkalımı, hücre morfolojisi, anjiogenezis, hücre hareketi ve adezyonu gibi çok önemli süreçlerde karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca SOR hücre membran hasarı yapabileceği gibi DNA üzerinde de hasara sebep olmaktadır. SOR, DNA hasarı yaparak karsinogeneze katkıda bulunurken, yüksek miktarda SOR hücre apoptozisini artırdığı için kanser terapisinde de rol oynamaktadır. SOR'i vücutta enzimatik (GPX, SOD, katalaz) ve enzimatik olmayan (GSH, C vit. gibi) antioksidan sistemler tarafından ortadan kaldırılırlar (29). E.coli infeksiyonuna karşı ozonun etkisinin değerlendirildiği daha önceki bir çalışmada (24) intravezikal ozonun antioksidanları (SOD, GPX) artırdığı gösterilmişti. Bizim çalışmamızda MNU grubunda sham grubuna göre SOD'un belirgin olarak azalması (p=0,39), intravezikal kullanımda antioksidan olduğu gösterilen ozonun KİOMK tedavisinde yararlı bir ek ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Mesane kanseri ve oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stresin, kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını, mutajenik promoter etkiyi, genetik

instabiliteyi, antikanser ajanlara hücre duyarlılık azalışını, invazyonu ve metastaz gibi birçok aşamayı etkilediği gösterilmiştir (70). Son yıllarda kanser terapisine bağlı yan etkilerin azaltılmasında kanser tedavisinde ve kanserden korunmada antioksidan tedaviler ve SOR üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Antioksidanların tümör gelişiminin 3 evresinde (initasyon, promotör etki, malign transformasyon-immortalizasyon) önleyici etkide olduğu gösterilmiştir. (70).

Antioksidan kullanımı kanser üzerinde 2 temel mekanizma ile etkili olmaktadır. Birincisi SOR temizleyici etkisi ile SOR sinyallerini inhibe ederek tümör gelişimini baskılamaktadır. İkincisinde ise bunun ters etkisi ile antioksidanlar SOR ile ilişkili apoptotik mekanizmaları inhibe ederek kanser insidansını artırabilmektedir. Bu mekanizma ile antioksidanlar, radyoterapi, paklitaksel ve barteomib gibi antikanser ilaçların SOR ile ilişkili antineoplastik etkinliğini azaltabilmektedir (28).

Normal epitel hücreleri üzerine düşük fakat devamlı oksidan etki olması hücrede yüksek oksidatif strese direnç kazandırırken, aynı zamanda antioksidan seviyenin arttığı da gösterilmiştir (28). Yine primer kanser dokularında yapılan çalışmalarda intrensek oksidatif strese bağlı adaptasyon mekanizmaları sonucu antioksidan moleküllerin (SOR temizleyici sistemlerin) arttığı gösterilmiştir (28). Yüksek dozlarda (>80 µg/ml) bilinen en güçlü oksidan ajanlardan olan ozonun, düşük dozda (10-15 µg/ml) antioksidan olduğu gösterilmiş ve bu etkiye paradoksal etki denmiştir. Düşük dozda tekrarlayan dozlarda ozon uygulaması kronik oksidan etki ile antioksidan yanıtın artışına sebep olmaktadır (63). Ozonun iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde (71), iskemik hastalıklarda ve kanserli dokunun oksijenizasyonun sağlanmasında (72) intravasküler kullanılabildiği gibi akut bakteriyel sistitde (24), kronik sistitde (25), hemorajik sistitde (22) ve radyasyona sekonder hematüride (23) intraperitoneal, intravasküler ya da intravezikal olarak yararlı ve antioksidan olduğu gösterilmiştir. Ayrıca çeşitli kanser hücrelerinde in vitro olarak antiproliferatif olduğu (60) gösterilmiştir. Literatürde daha önce mesane kanserinde ozon kullanımı ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmayıp ilk kez bu çalışmada, KİOMK'de intravezikal ozonun etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda, Martinez ve arkadaşlarının çalışmasına (63) benzer şekilde oksidan ve antioksidan parametrelerin ozon verilmiş normal mesane dokusunda birlikte arttığını gösterdik (**Tablo 15**). Ancak ilginç şekilde MNU grubuna göre MNU+ozon grubunda antioksidan SOD'da yaklaşık %179 (GSH'da %28,15) artış var iken, buna karşılık oksidan parametrelerde en fazlası MDA'da olmak üzere %41,28 artış olmuştur. Bundan dolayı KİOMK'nde intravezikal ozonun antioksidan yanıtının oksidan yanıtı göre çok daha fazla

olduğunu göstermiş olduk. Bu bulgularımız, yukarıda referansları ile açıkladığımız gibi mesane kanserinde kronik düşük doz ozonun başlangıçta intrensek oksidan etkiyi artırmasını takiben oluşturduğu reaksiyonel antioksidan artışını iyi örneklemektedir. MNU+ozon grubunda oksidan parametrelerin artışının, sadece ozon grubundaki artıştan çok daha az olması ozonun artırdığı antioksidan kapasitenin SOR temizleyici etkisini düşündürmüştür. Ayrıca ozon kontrol grubunda, bir denekte taş ve taşa sekonder geliştiği düşünülen hiperplazi dışında herhangi bir neoplastik değişim olmaması, ozonun mesane dokusunda güvenle kullanılabilceğini göstermektedir.

Badjatia ve arkadaşlarının çalışmasında (70) yüksek derece ve evreye sahip olan mesane tümörlü hastalarda SOD antioksidan defans sisteminin azalmış olduğu gösterilmiştir. SOD enzimatik bir antioksidan olup O_2^- 'den H_2O_2 üretimini sağlar. Çalışmamızda sham grubuna göre MNU grubunda enzimatik antioksidan olan SOD miktarında düşüş var iken ($p=0,39$), MNU grubuna göre MNU+Ozon grubunda istatistiksel anlamlı olmayan ($p=0,06$) ancak belirgin bir SOD artışı gözlenmesi, ozonun MNU+ozon grubunda antioksidan yanıtı artırdığını göstermiştir (**Şekil 14**). MNU+ozon grubunda SOD'un artması ve histopatolojik olarak MNU grubunda tüm deneklerde preneoplastik ve neoplastik lezyonlar olması, MNU+ozon grubunda ise 2/12 (%16) oranında normal üreteryumun görülmesi, ozonun KİOMK tedavisinde karsinogenez başlangıç evresini inhibe edebileceğini ve antioksidan yanıtı bağlı kemopreventif özelliğinin olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle ozon KİOMK'de intravezikal kullanımda destek veya alternatif tedavi adayı olabilir.

GSH enzimatik olmayan bir antioksidan olup, H_2O_2 'nin GPX tarafından katalize edilmesinde elektron vericisi olarak görev alır (73). Daha önce kalp hastalıkları, HIV enfeksiyonunda ve kanser hastalıklarında destek tedavisi olarak kullanılan N-asetil sistein'in (NAC) GSH miktarını artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca in vitro olarak NAC destek tedavisiyle BCG'nin mesane kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisinin arttığı gösterilmiştir (74). GSH'ın iNOS (indükleyici Nitrik Oksit Sentaz) aktivitesini artırdığı, buna bağlı NO üretiminin artarak mesane kanseri hücrelerinde proliferasyonun inhibe edildiği in vitro olarak gösterilmiştir (75). Çalışmamızda, intravezikal ozonun sham grubuna göre sadece ozon grubunda GSH'ı anlamlı olarak (%169) artırdığı ($p=0,01$), MNU grubuna göre MNU+ozon grubunun karşılaştırmasında ise GSH miktarını daha az (%28,15) artırdığı ($p=0,87$) saptanmıştır. İntravezikal ozon tedavisinin sham grubuna göre sadece ozon grubunda (normal dokuda) oksidan yanıtı (MPO, MDA, ve NO) artırmakla birlikte antioksidan GSH'u da belirgin bir şekilde artırarak oksidatif stres dengesini sağlayabildiğini gösterdik (**Tablo 15**).

Yüksek SOR seviyelerinin antitümöral etkide rol oynayabileceği belirtilmiştir ve bu etki SOR aracılığıyla apoptozisin indüklemesiyle oluşur (29). Mesane kanseri tedavisinde mitomisin-c, epirubisin, adriamisin gibi sitotoksik, BCG gibi immünoterapötik ajanlardan yararlanılmaktadır. TUR-MT sonrası intravezikal kullanılan mitomisin-c'nin, tümör hücrelerine sitotoksik etki yaparken SOR'un arttığı , ayrıca aerob şartlar altında oluşan SOR ile mesane dokusunda DNA hasarına sebep olduğu ve "anthocyan" gibi bir antioksidan ile tedaviyle bu DNA hasarının engellendiği gösterilmiştir (76). Çalışmamızın sonuçlarına göre KİOMK'de belirgin antioksidan (**Tablo 15**) yanıtı olduğu ortaya çıkan ozonun, ileride mitomisin-c gibi antineoplastik ajanlarla kombine edildiği çalışmalar yapılarak mitomisin-C'nin etki ve yan etkilerinin optimize edilebileceği gösterilebilir.

KİOMK'de bilinen en etkili tedavi BCG'dir (54). Kaczmarek ve arkadaşları'nın çalışmasında (77) intravezikal BCG tedavisi öncesi ve sonrası KİOMK'li 12 hastada periferik kandan alınan trombositlerde SOD araştırılarak, BCG sonrası artış gösterilmiş ve metastatik mesane kanseri oluşumunun engellenmesinin SOD artışına bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Hyoudou ve arkadaşları (78) fare ayak tabanına enjekte edilen malign melanom hücreleri (B16-BL6 hücreleri) ile oluşturulan pulmoner metastaz modelinde, majör cerrahi (melanom eksizyonu) sonrası oluşan oksidatif strese bağlı olarak metastatik alanlarda tümör gelişiminin agrave olduğunu ve SOD derivelerinin bu etkiyi inhibe ettiğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada da ekstraselüler SOD'ın farelerde tümör anjiogenezisini inhibe ettiği gösterilmiştir (79). Bundan dolayı çalışmamızda intravezikal ozonun KİOMK 'de SOD artışı yapmasının sonucu olarak, olası neoplastik metastazın ve tümöral anjiogenezisin de engellenebileceği düşünülebilir.

Shah ve arkadaşları, BCG'nin mesane kanseri hücrelerinde H₂O₂ gibi oksidatif stress ürünlerini artırarak, buna bağlı NO ve peroksinitrit üretimini artırdığını göstermişler (80). SOD, O₂⁻ 'den H₂O₂ oluşumuna neden olduğu için (73) çalışmamızda KİOMK'de ozon kullanımı ile artan SOD, H₂O₂ üretimini artıracığı düşünülmektedir. Bundan dolayı ozon, BCG'nin H₂O₂ artırıcı etkisine suplementer olarak tedaviye eklenebileceği düşünülebilir.

NO, Nitrik Oksit Sentaz (NOS) aktivitesiyle arginin'den sentezlenmekte olup, vazodilatör, inflamatuvar ve sitotoksik etkili bir moleküldür. NO düşük dozda in vitro olarak mesane kanseri hücrelerinde proliferasyonu uyarıcı, yüksek dozda ise sitotoksik etkilidir (81). NO mesane kanseri hücrelerinde BCG sonrası makrofaj aracılığı ile sitotoksik rol oynamaktadır (82). Daha önceki çalışmalarda BCG'nin mesane kanseri hücrelerinde kalsiyum

bağımlı ve bağımsız olarak NO üretimini artırdığı gösterilmiştir (83). Başka bir çalışmada ozonun akciğer makrofajlarından NO ve TNF- α salınımını artırarak inflamatuvar süreçte katkıda bulunduğu gösterilmiştir (84). Çalışmamızda, sadece Ozon grubunda sham grubuna göre, MNU+ozon grubunda ise -biraz baskılanmış olmakla birlikte- sadece MNU grubuna göre NO miktarının artması (**Tablo 15**), ozonun mesane kanserli hastalarda mesane hücrelerinden in vivo NO salınımıyla BCG tedavisine suplementer etki yapabileceğini düşündürmektedir.

MPO nötrofil ve monositlerde bulunan lizozomal bir enzim olup güçlü okside edici özelliği ile mikrobisidal etki yapmaktadır. MPO inflamatuvar yanıtın biyokimyasal bir göstergesi olup yüksek olduğu durumlarda artmış immün yanıtı göstermektedir. NK (Doğal Öldürücü) hücrelerinden salınan MPO, güçlü oksidan etki ile inflamasyonda rol oynamaktadır. Güçlü oksidatif etkisi olan MPO'nun karsinogenezi artırıcı etkisi olduğu, ancak MPO polimorfizmlerinde mesane ve akciğer kanseri gelişimi riskinin azaldığı gösterilmiştir (85). E.coli ile oluşturulmuş sistit çalışmasında intravezikal ozon MPO'yu düşürürken (24) bizim çalışmamızda aksine sadece ozon grubunda, sham grubuna göre MPO'nun % 255,7 artmasına karşılık MNU+ozon grubunda sadece MNU grubuna göre bu artışın ancak % 1,9 da kalması, ozonun ve ozonun artırdığı SOD'un MPO'yu baskıladığını düşündürmektedir. Belki de bu nedenle MNU+ozon grubunda (%58) mesanede neoplastik değişim sadece MNU grubuna (%63) göre daha az (**Tablo 12. , Şekil 11.**) olmuştur.

MDA, lipid peroksidasyon ürünü olup hücrel oksidatif stresi gösterir. Ayrıca artan MDA'nın mutajenik özellikte olduğu gösterilmiştir (86). Badjatia ve arkadaşları mesane kanserli hastalarda evre ve dereceyle korele bir şekilde antioksidanların (SOD gibi) azaldığını, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın ise arttığını göstermişlerdir. Ancak çalışmamızda sadece ozon grubunda NO ve MPO'dan belirgin şekilde fazla artan MDA, SOD ve GSH artışı ile dengelenmiş olması, ozonun normal hücrelerde antioksidan artışı sağlayarak oksidanları dengeleyebileceğini düşündürmektedir. MNU+ozon grubunda ise sadece MNU grubuna göre hafif artan (%41,28) MDA'in (p=0,75) belirgin antioksidan SOD (p=0,06) artışı (%179) ile karşılanmış olması, ozonun mesane kanseri modelinde belirgin antioksidan artış sağladığını göstermektedir.

Çalışmamızda normal mesane dokusunda NO ve diğer oksidan belirteçleri artıran etki, SOD ve GSH ile dengelenmiş iken, MNU+ozon grubunda sadece MNU grubuna göre SOD'un belirgin olarak artmış olması ve ozon uygulaması sonrası toksik bir etkinin

görülmemesi, ozonun KiOMK tedavisinde intravezikal olarak güvenli bir suplemler tedavi adayı olabileceğini göstermektedir.



6.ÖZET

Giriş ve Amaç: Deneysel erkek sıçan transüretal metilnitrozüre (MNU) ile oluşturulmuş mesane karsinogenezisinde intravezikal ozon tedavisinin etkinliğini histopatolojik ve oksidan-antioksidan parametrelerle incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: 51 adet 7-8 haftalık 200-250 gr ağırlıklarında Wistar–Albino erkek sıçanlara her uygulama öncesi ketamin ve ksilazin ile anestezi uygulandı. Sıçanlar, Sham grubu (n=6), sadece Ozon grubu (n=15), sadece MNU grubu (n=15) ve MNU+Ozon grubu (n=15) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Sadece MNU ve MNU+ozon gruplarındaki sıçanların mesanelerine 0'dan 10. haftaya kadar transüretal olarak 2 hafta ara ile toplam 6 doz, 2mg/0,2ml MNU verildi. Ozon grubuna 0'dan 10. haftaya kadar aynı protokolde 0,2 ml %0,9 NaCl verildi. Sham grubu sadece anestezi aldı. Ozon ve MNU+ozon gruplarına 7.-10. haftalar arasında haftada iki kez, 11.-12. haftalar arasında haftada üç kez 25 µg/ml ozonize su verildi. Sadece MNU grubuna ise aynı tedavi günlerinde ozon yerine 1 ml %0,9 NaCl instile edildi. 15. haftada sıçanlar sakrifiye edilip randomize bir şekilde mesane dokularının yarısı immünohistopatolojik, yarısı da biyokimyasal ELİSA yöntemi ile SOD, GSH, MPO, MDA ve NO inceleme için ayrıldı. Proliferatif indeks için immünohistokimyasal Ki-67 kullanıldı.

Bulgular: İlk 6 haftada anestezi sonrası 13/51 (%25) sıçan ex oldu. Ozon maruziyetine bağlı bir toksisite izlenmedi. Kalan sıçanlarda KİOMK (kasa invaze olmayan mesane kanseri, pTa, pT1, CIS) görülme oranı sadece MNU, MNU+ozon, sadece Ozon ve sham grubunda sırasıyla 7/11(%63), 7/12(%58), 0/10 (%0) ve 0/5 (%0), preneoplastik lezyon (displazi, hiperplazi) gelişim oranları ise sırasıyla 4/11(%37), 3/12(%25), 1/10(%10), 0/5(%0), normal üreteryum görülme oranları sırasıyla 0/11(%0), 2/12(%16), 9/10(%90) ve 5/5 (%100) idi. Ozon grubunda tek hiperplazi olgusunda mesanede taş oluşumu da dikkat çekti. Ayrıca sadece MNU ve MNU+ozon grubunda, sham ve sadece ozon grubuna göre Ki-67 proliferatif indeksin artmış olduğu izlendi (p<0,05). Ancak, MNU ve MNU+ozon grupları arasında Ki-67 proliferatif indeks açısından anlamlı fark yoktu (p>0,05). Sadece ozon grubunda sham grubuna göre istatistiksel anlamlı bir şekilde (p<0,05) oksidan parametreler (NO, MPO ve MDA) ve antioksidan parametreler (SOD ve GSH) aynı oranda arttığı gözlemlendi. MNU+ozon grubunda ise sadece MNU grubuna göre anlamlı bir NO (p=0,75), MPO (p=0,71), MDA

($p=0,75$) ve GSH($p=0,87$) artışı yok iken (en fazla artış MDA'da % 41,28), antioksidan SOD miktarında istatistiksel anlamlı olmayan ($p=0.06$) ancak belirgin (%179) bir yükselme dikkat çekti.

Sonuç: Tekrarlayan intravezikal ozon uygulaması, normal mesane hücresinde oksidan ve antioksidan parametreleri birlikte ancak dengeli bir şekilde yükseltirken, mesane kanseri modelinde antioksidan yanıtı oksidan yanıtına göre çok daha fazla yükseltmektedir. MNU+ozon grubunda sadece MNU grubuna göre karsinogenezisin %16 oranında az olması intravezikal ozonun belirgin antioksidan özelliğine bağlı olabilir.

Anahtar kelimeler: İntravezikal ozon tedavisi, Sıçan mesane kanseri, MNU, erkek sıçan, oksidatif stress.



7.ABSTRACT

Introduction and aim: We aimed to investigate the effect of intravesical ozone treatment in experimental male rat bladder carcinogenesis model by evaluating histopathological and oxidant- antioxidant changes.

Material and Method: Total of 7 to 8 weeks old 51 wistar-Albino rats were anesthetized by xylazine and ketamine intraperitoneally before the catheterization. Rats were divided into four groups: Sham group (n=6); Ozone group (n=15); MNU group (n=15); and MNU+Ozone group (n=15). MNU and MNU+ozone groups received 2 mg/ 0.2 ml MNU instillation every other weeks for 10 weeks. Ozone group received 0.2 ml %0.9 NaCl instillation at the same time schedule. Sham group received only anesthesia. In addition, ozone and MNU+Ozone groups had 25 µg/ml ozonated water instillation twice a week from 7th to 10th weeks and three times a week from 11th to 12th weeks; however, MNU group had 1 ml % 0.9 NaCl instillation at the same time schedule. All instillations were performed transurethrally. At 15th week all survived rats were sacrificed and all bladder tissues were collected for immunohistopathologic, oxidant and antioxidant studies. Oxidant and antioxidant markers (GSH, SOD, MDA, MPO and NO) were estimated by ELISA. Ki-67 proliferative index and hematoxylin eosin stain were used for immunohistopathologic evaluation.

Results: 13/51(%25) rats died during the first six weeks. No significant toxicity observed related to exposure of ozone. Incidence of NMIBC (Non muscle invasive bladder cancer, pTa, pT1, CIS) in MNU, MNU+ozon, Ozon, sham groups were 7/11(%63), 7/12(%58), 0/10 (%0), 0/5 (%0), respectively. Preneoplastic lesions (dysplasia, hyperplasia) in these groups were observed at 4/11(%37), 3/12(%25), 1/10(%10), and 0/5(%0), respectively. Normal urethelium incidence in these groups were 0/11(%0), 2/12(%16), 9/10(%90), and 5/5 (%100), respectively. There was a bladder stone and hyperplasia in the same case in Ozone group. Ki-67 proliferative index increased in MNU and MNU+ozone groups according to ozone and sham groups ($p < 0,05$). In addition, there was no statistical difference in between MNU and MNU+ozone groups ($p > 0,05$). Oxidant (NO, MDA, MPO) and antioxidant (SOD and GSH) parameters significantly increased ($p < 0,05$) in ozone group compared with sham group. Also oxidant and antioxidant balance did not change in the ozon group. No

significantly difference was observed in the amounts of NO ($p=0.75$), MPO ($p=0.71$), MDA ($p=0.75$) and GSH($p=0.87$) when MNU+Ozone group compared with MNU group. Among oxidant parameters maximum increase was in MDA (%41,28). Amount of SOD increased remarkably (%179) but insignificantly ($p= 0,06$) in MNU+ozone group compared with MNU group.

Conclusion: Therefore, oxidant and antioxidant parameters both increased in ozone treated normal bladder cell. This simultaneous increase maintained the balance between oxidant and antioxidant systems. Interestingly, antioxidant response was remarkably more than oxidant response in bladder carcinogenesis model by ozone treatment. Also, probable antioxidant properties of the repeated intravesical ozone treatment inhibited bladder carcinogenesis 16% in MNU+ozone group.

Key Words: intravesical ozone treatment , rat bladder cancer, MNU, male rat, oxidative stress

8.REFERANSLAR

1. Snell RS. Clinical Anatomy: An Illustrated Review with Questions and Explanations: Lippincott Williams & Wilkins.; 2004.
2. Mills SE. Histology for Pathologists: Wolters Kluwer Health; 2012.
3. JD B. Urinary tract anatomy,. In: Walsh PC RA, Wein AJ, Vauhan ED, editor.: Saunders; 2005. p. 41-80.
4. Junquera L.C CJ, Kelley R.O. Basic Histology1998.
5. Cristina Magi-Galluzzi MZ. Pathology of bladder neoplasms: www.uptodate.com/contents/pathology-of-bladder-neoplasms; 2015.
6. J. Eble JIE, I. A. Sesterhenn & G. Sauter. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 2004.
7. Bostwick DG, & Cheng, L. Urologic Surgical Pathology: Elsevier Health Sciences.; 2014.
8. Jacobs BL LC, Montie JE. Bladder cancer in 2010: how far have we come? CA Cancer J Clin. 2010;60(4):244-72.
9. Schroeder GL, Lorenzo-Gomez MF, Hautmann SH, Friedrich MG, Ekici S, Huland H, et al. A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection. J Urol. 2004 Sep;172(3):1123-6. PubMed PMID: 15311054.
10. M. Babjuk AB, M. Burger, E. Compérat,E. Kaasinen, J. Palou, M. Rouprêt, B.W.G. van Rhijn, S. Shariat, R. Sylvester, R. Zigeuner. Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1 and CIS)2015.
11. J.A. Witjes EC, N.C. Cowan, M. De Santis,G. Gakis, N. James, T. Lebrét, A. Sherif, A.G. van der Heijden, M.J. Ribal. Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer 2015; (5):[10 p.].
12. Brausi M, Witjes JA, Lamm D, Persad R, Palou J, Colombel M, et al. A review of current guidelines and best practice recommendations for the management of nonmuscle invasive bladder cancer by the International Bladder Cancer Group. J Urol. 2011 Dec;186(6):2158-67. PubMed PMID: 22014799.
13. Gardmark T, Jahnsen S, Wahlquist R, Wijkstrom H, Malmstrom PU. Analysis of progression and survival after 10 years of a randomized prospective study comparing mitomycin-C and bacillus Calmette-Guerin in patients with high-risk bladder cancer. BJU Int. 2007 Apr;99(4):817-20. PubMed PMID: 17244282.
14. de Reijke TM, Kurth KH, Sylvester RJ, Hall RR, Brausi M, van de Beek K, et al. Bacillus Calmette-Guerin versus epirubicin for primary, secondary or concurrent carcinoma in situ of the bladder: results of a European Organization for the Research and Treatment of Cancer--Genito-Urinary Group Phase III Trial (30906). J Urol. 2005 Feb;173(2):405-9. PubMed PMID: 15643181.
15. Bouffouq C, Kurth KH, Bono A, Oosterlinck W, Kruger CB, De Pauw M, et al. Intravesical adjuvant chemotherapy for superficial transitional cell bladder carcinoma: results of 2 European Organization for Research and Treatment of Cancer randomized trials with mitomycin C and doxorubicin comparing early versus delayed instillations and short-term versus long-term treatment. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group. J Urol. 1995 Mar;153(3 Pt 2):934-41. PubMed PMID: 7853578.
16. Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA, et al. Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. J Urol. 2000 Apr;163(4):1124-9. PubMed PMID: 10737480.
17. Velio Bocci EB, Valter Travagli and Iacopo Zanardi. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. Medicinal Research Reviews. 2009;29(4):646-82.

18. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res*. 2006 May;37(4):425-35. PubMed PMID: 16624639.
19. Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, et al. Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 2008 Mar 10;581(3):306-14. PubMed PMID: 18093583.
20. Wang L, Chen H, Liu XH, Chen ZY, Weng XD, Qiu T, et al. Ozone oxidative preconditioning inhibits renal fibrosis induced by ischemia and reperfusion injury in rats. *Exp Ther Med*. 2014 Dec;8(6):1764-8. PubMed PMID: 25371729. Pubmed Central PMCID: 4218702.
21. Ekici S, Dogan Ekici AI, Ozturk G, Benli Aksungar F, Sinanoglu O, Turan G, et al. Comparison of melatonin and ozone in the prevention of reperfusion injury following unilateral testicular torsion in rats. *Urology*. 2012 Oct;80(4):899-906. PubMed PMID: 22950989.
22. Tasdemir S, Tasdemir C, Vardi N, Ates B, Taslidere E, Karaaslan MG, et al. Effects of ozone therapy on cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity in rats. *Clin Invest Med*. 2013;36(1):E9-17. PubMed PMID: 23374601.
23. Clavo B, Gutierrez D, Martin D, Suarez G, Hernandez MA, Robaina F. Intravesical ozone therapy for progressive radiation-induced hematuria. *J Altern Complement Med*. 2005 Jun;11(3):539-41. PubMed PMID: 15992242.
24. Tasdemir C, Tasdemir S, Vardi N, Ates B, Onal Y, Erdogan S, et al. Evaluation of the effects of ozone therapy on Escherichia coli-induced cystitis in rat. *Ir J Med Sci*. 2013 Dec;182(4):557-63. PubMed PMID: 23456133.
25. Neimark AI, Nepomnyashchikh LM, Lushnikova EL, Bakarev MA, Abdullaev NA, Sizov KA. Microcirculation and structural reorganization of the bladder mucosa in chronic cystitis under conditions of ozone therapy. *Bull Exp Biol Med*. 2014 Jan;156(3):399-405. PubMed PMID: 24771385.
26. Bayrak O, Erturhan S, Seckiner I, Erbagci A, Ustun A, Karakok M. Chemical cystitis developed in experimental animals model: Topical effect of intravesical ozone application to bladder. *Urol Ann*. 2014 Apr;6(2):122-6. PubMed PMID: 24833822. Pubmed Central PMCID: 4021650.
27. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology* : CB. 2014 May 19;24(10):R453-62. PubMed PMID: 24845678. Pubmed Central PMCID: 4055301.
28. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Jul;8(7):579-91. PubMed PMID: 19478820.
29. Liou GY SP. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 2010;44(5):479-96.
30. Arentsen HC, Hendricksen K, Oosterwijk E, Witjes JA. Experimental rat bladder urothelial cell carcinoma models. *World J Urol*. 2009 Jun;27(3):313-7. PubMed PMID: 19219611. Pubmed Central PMCID: 2694312.
31. Reis LO, Pereira TC, Favaro WJ, Cagnon VH, Lopes-Cendes I, Ferreira U. Experimental animal model and RNA interference: a promising association for bladder cancer research. *World J Urol*. 2009 Jun;27(3):353-61. PubMed PMID: 19214530.
32. Şevket Tolga Tombul TM. Experimental animal models for bladder cancer. *Üroonloloji Bülteni*. 2013;12(1).
33. Chong L, Ruping Y, Jiancheng B, Guohong Y, Yougang F, Jiansong W, et al. Characterization of a novel transplantable orthotopic murine xenograft model of a human bladder transitional cell tumor (BIU-87). *Cancer Biol Ther*. 2006 Apr;5(4):394-8. PubMed PMID: 16481738.
34. Xiao Z, McCallum TJ, Brown KM, Miller GG, Halls SB, Parney I, et al. Characterization of a novel transplantable orthotopic rat bladder transitional cell tumour model. *Br J Cancer*. 1999 Oct;81(4):638-46. PubMed PMID: 10574249. Pubmed Central PMCID: 2362887.
35. Crallan RA, Georgopoulos NT, Southgate J. Experimental models of human bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2006 Mar;27(3):374-81. PubMed PMID: 16287878.
36. Cohen SM. Urinary bladder carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 1998 Jan-Feb;26(1):121-7. PubMed PMID: 9502394.

37. Steinberg GD, Brendler CB, Ichikawa T, Squire RA, Isaacs JT. Characterization of an N-methyl-N-nitrosourea-induced autochthonous rat bladder cancer model. *Cancer Res.* 1990 Oct 15;50(20):6668-74. PubMed PMID: 2208131.
38. Kunze E, Graewe T, Scherber S, Weber J, Gellhar P. Cell cycle dependence of N-methyl-N-nitrosourea-induced tumour development in the proliferating, partially resected rat urinary bladder. *Br J Exp Pathol.* 1989 Apr;70(2):125-42. PubMed PMID: 2730838. Pubmed Central PMCID: 2040540.
39. Hicks RM, Wakefield JS. Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea. I. Histology. *Chem Biol Interact.* 1972 Jul;5(2):139-52. PubMed PMID: 5041565.
40. Palmeira C OP, Lameiras C, Amaro T, Silva VM, Lopes C, Santos L. Biological similarities between murine chemical-induced and natural human bladder carcinogenesis. *Oncol Lett.* 2010;1(2):373-7.
41. Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Capitanio U, et al. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Jan 21;101(2):114-9. PubMed PMID: 19141773.
42. Reis LO, Ferrari K, Zamuner M, Rocha GZ, Billis A, Favaro WJ. Urothelial carcinogen resistance driven by stronger Toll-like receptor 2 (TLR2) and Uroplakin III (UP III) defense mechanisms: a new model. *World J Urol.* 2015 Mar;33(3):413-9. PubMed PMID: 24871424.
43. PA Oliveira MP, C Nóbrega, R Arantes-Rodrigues, AM Calado, J Carrola, M Ginja, A Colaço. Technical Report: Technique of Bladder Catheterization in Female Mice and Rats for Intravesical Instillation in Models of Bladder Cancer. *Scand J Lab Anim Sci* 2009;36(1).
44. Yaman O, Ozdiler E, Sozen S, Gogus O. Transmurally absorbed intravesical chemotherapy with dimethylsulfoxide in an animal model. *Int J Urol.* 1999 Feb;6(2):87-92. PubMed PMID: 10226813.
45. Qian L, Ding H, Zhou J, Wang X, Shao P, Wu S, et al. Intravesical N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and adriamycin induces apoptosis in bladder cancer. *Front Biosci.* 2006;11:2045-51. PubMed PMID: 16720290.
46. Reis LO, Ferreira U, Billis A, Cagnon VH, Favaro WJ. Anti-angiogenic effects of the superantigen staphylococcal enterotoxin B and bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol.* 2012 Feb;187(2):438-45. PubMed PMID: 22177150.
47. Perabo FG, Demant AW, Wirger A, Schmidt DH, Sitia M, Wardelmann E, et al. Carboxyamido-triazole (CAI) reverses the balance between proliferation and apoptosis in a rat bladder cancer model. *Anticancer Res.* 2005 Mar-Apr;25(2A):725-9. PubMed PMID: 15868902.
48. Reis LO, Favaro WJ, Ferreira U, Billis A, Fazuoli MG, Cagnon VH. Evolution on experimental animal model for upper urothelium carcinogenesis. *World J Urol.* 2010 Aug;28(4):499-505. PubMed PMID: 20373103.
49. Tian B, Wang Z, Zhao Y, Wang D, Li Y, Ma L, et al. Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model. *Cancer Lett.* 2008 Jun 18;264(2):299-308. PubMed PMID: 18342436.
50. Li J, Qu W, Cheng Y, Sun Y, Jiang Y, Zou T, et al. The inhibitory effect of intravesical fisetin against bladder cancer by induction of p53 and down-regulation of NF-kappa B pathways in a rat bladder carcinogenesis model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014 Oct;115(4):321-9. PubMed PMID: 24646039.
51. Steinberg GD, Brendler CB, Squire RA, Isaacs JT. Experimental intravesical therapy for superficial transitional cell carcinoma in a rat bladder tumor model. *J Urol.* 1991 Mar;145(3):647-53. PubMed PMID: 1997724.
52. Zeng J, Sun Y, Wu K, Li L, Zhang G, Yang Z, et al. Chemopreventive and chemotherapeutic effects of intravesical silibinin against bladder cancer by acting on mitochondria. *Mol Cancer Ther.* 2011 Jan;10(1):104-16. PubMed PMID: 21220495.
53. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014 Jan-Feb;64(1):9-29. PubMed PMID: 24399786.
54. Williams SK, Hoenig DM, Ghavamian R, Soloway M. Intravesical therapy for bladder cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2010 Apr;11(6):947-58. PubMed PMID: 20205607.

55. Shen Z, Shen T, Wientjes MG, O'Donnell MA, Au JL. Intravesical treatments of bladder cancer: review. *Pharm Res.* 2008 Jul;25(7):1500-10. PubMed PMID: 18369709. Pubmed Central PMCID: 2440939.
56. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J.* 2007 Jan 1;401(1):1-11. PubMed PMID: 17150040.
57. Shureiqi I, Reddy P, Brenner DE. Chemoprevention: general perspective. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000 Mar;33(3):157-67. PubMed PMID: 10789490.
58. Tang M, Abplanalp W, Ayres S, Subbiah MT. Superior and distinct antioxidant effects of selected estrogen metabolites on lipid peroxidation. *Metabolism.* 1996 Apr;45(4):411-4. PubMed PMID: 8609824.
59. Cohen SM, Ohnishi T, Arnold LL, Le XC. Arsenic-induced bladder cancer in an animal model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 Aug 1;222(3):258-63. PubMed PMID: 17109909.
60. Sweet F, Kao MS, Lee SC, Hagar WL, Sweet WE. Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells. *Science.* 1980 Aug 22;209(4459):931-3. PubMed PMID: 7403859.
61. Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, Silvestri S. Studies on the biological effects of ozone: 6. Production of transforming growth factor 1 by human blood after ozone treatment. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1994 Oct-Dec;8(4):108-12. PubMed PMID: 7660851.
62. Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, MacDonald IC, Martell JD, Takahashi N, et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 May 20;111(20):E2100-9. PubMed PMID: 24803433. Pubmed Central PMCID: 4034191.
63. G. Martínez- Sánchez GP-D, L. Re and A. Giuliani. Ozone as U-shaped Dose Responses Molecules (Hormetins). *Dose Response.* 2011;9(3):443.
64. Pilkington K. Ozone therapy 2013.
65. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006;20(3):133-8. PubMed PMID: 16788956.
66. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med.* 2011 Jan;2(1):66-70. PubMed PMID: 22470237. Pubmed Central PMCID: 3312702.
67. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry.* 1951 Nov;193(1):265-75. PubMed PMID: 14907713.
68. Spearman C. The proof and measurement of association between two things. By C. Spearman, 1904. *Am J Psychol.* 1987 Fall-Winter;100(3-4):441-71. PubMed PMID: 3322052.
69. Reis LO, Sopena JM, Favaro WJ, Martin MC, Simao AF, Reis RB, et al. Anatomical features of the urethra and urinary bladder catheterization in female mice and rats. An essential translational tool. *Acta Cir Bras.* 2011;26 Suppl 2:106-10. PubMed PMID: 22030824.
70. Badjatia N, Satyam A, Singh P, Seth A, Sharma A. Altered antioxidant status and lipid peroxidation in Indian patients with urothelial bladder carcinoma. *Urol Oncol.* 2010 Jul-Aug;28(4):360-7. PubMed PMID: 19171490.
71. Wang L, Chen H, Liu XH, Chen ZY, Weng XD, Qiu T, et al. The protective effect of ozone oxidative preconditioning against hypoxia/reoxygenation injury in rat kidney cells. *Ren Fail.* 2014 Oct;36(9):1449-54. PubMed PMID: 25246346.
72. Clavo B, Perez JL, Lopez L, Suarez G, Lloret M, Rodriguez V, et al. Ozone Therapy for Tumor Oxygenation: a Pilot Study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2004 Jun 1;1(1):93-8. PubMed PMID: 15257330. Pubmed Central PMCID: 442111.
73. Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev.* 2012;58(1):1-9. PubMed PMID: 22450278.
74. Pook SH, Esuvaranathan K, Mahendran R. N-acetylcysteine augments the cellular redox changes and cytotoxic activity of internalized mycobacterium bovis in human bladder cancer cells. *J Urol.* 2002 Aug;168(2):780-5. PubMed PMID: 12131368.
75. Jansson OT, Morcos E, Brundin L, Lundberg JO, Adolfsson J, Soderhall M, et al. The role of nitric oxide in bacillus Calmette-Guerin mediated anti-tumour effects in human bladder cancer. *Br J Cancer.* 1998 Sep;78(5):588-92. PubMed PMID: 9744496. Pubmed Central PMCID: 2063061.

76. Higgins JA ZM, Brown K, Jones GD. Anthocyanins as tertiary chemopreventive agents in bladder cancer: anti-oxidant mechanisms and interaction with mitomycin C. *Mutagenesis*. 2014;29(4):227-35.
77. Kaczmarek P, Buczynski A, Niemirowicz J, Gnitecki W, Kocur E, Karpinski J. [Lipids peroxidation in platelets in patients with bladder cancer treated with Mycobacterium suspension]. *Pol Merkur Lekarski*. 2001 Dec;11(66):484-6. PubMed PMID: 11899843. Metabolizm tlenowy w krwinkach płytkowych u chorych na raka pęcherza moczowego leczonych zawiesiną prątków.
78. Hyoudou K, Nishikawa M, Kobayashi Y, Ikemura M, Yamashita F, Hashida M. SOD derivatives prevent metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(5):531-6. PubMed PMID: 18357506.
79. Marikovsky M, Nevo N, Vadai E, Harris-Cerruti C. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *Int J Cancer*. 2002 Jan 1;97(1):34-41. PubMed PMID: 11774241.
80. Shah G, Zielonka J, Chen F, Zhang G, Cao Y, Kalyanaraman B, et al. H₂O₂ generation by bacillus Calmette-Guerin induces the cellular oxidative stress response required for bacillus Calmette-Guerin direct effects on urothelial carcinoma biology. *J Urol*. 2014 Oct;192(4):1238-48. PubMed PMID: 24928267.
81. Morcos E, Jansson OT, Adolfsson J, Kratz G, Wiklund NP. Endogenously formed nitric oxide modulates cell growth in bladder cancer cell lines. *Urology*. 1999 Jun;53(6):1252-7. PubMed PMID: 10367864.
82. Koskela LR, Poljakovic M, Ehren I, Wiklund NP, de Verdier PJ. Localization and expression of inducible nitric oxide synthase in patients after BCG treatment for bladder cancer. *Nitric Oxide*. 2012 Oct 15;27(3):185-91. PubMed PMID: 22819699.
83. Morcos E, Jansson OT, Adolfsson J, Ehren I, Wiklund NP. Bacillus Calmette-Guerin induces long-term local formation of nitric oxide in the bladder via the induction of nitric oxide synthase activity in urothelial cells. *J Urol*. 2001 Feb;165(2):678-82. PubMed PMID: 11176457.
84. Fakhrzadeh L, Laskin JD, Laskin DL. Ozone-induced production of nitric oxide and TNF- α and tissue injury are dependent on NF- κ B p50. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Aug;287(2):L279-85. PubMed PMID: 15064226.
85. Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D, et al. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*. 2004 Jun;25(6):973-8. PubMed PMID: 14729580.
86. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*. 1999 Mar 8;424(1-2):83-95. PubMed PMID: 10064852.