ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE KANSERİNDE POTANSİYEL BİYOBELİRTEÇLERİN OMİKS (METABOLOMİKS) YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

ALEYNA BALTACIOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aysel Özpınar

İSTANBUL-2025

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE KANSERİNDE POTANSİYEL BİYOBELİRTEÇLERİN OMİKS (METABOLOMİKS) YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

ALEYNA BALTACIOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aysel Özpınar

İSTANBUL-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

15/12/2025
Aleyna Baltacıoğlu

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Mesane kanseri, gerek görülme sıklığı gerekse yineleme ve ilerleme riski nedeniyle klinik açıdan önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Hastalığın tanı ve takibinde kullanılan mevcut yöntemler çoğu zaman invaziv, maliyetli ve hasta konforunu olumsuz etkileyen uygulamaları içermektedir. Bu nedenle, daha az invaziv, güvenilir ve uygulanabilir biyobelirteçlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar güncelliğini korumaktadır.

Bu tez çalışmasında, serum düzeylerinde Trimethylamine N-oxide (TMAO) ve öncüllerinin (karnitin, kolin, betain) mesane kanseri ile ilişkisi araştırılmış; bu metabolitlerin hastalığın tanı, evreleme ve olası biyobelirteç potansiyelleri değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen bulguların, mesane kanserinde metabolomik yaklaşımlara katkı sağlayacağı ve ileride yapılacak daha kapsamlı araştırmalara destek olacağı düşünülmektedir. Bu süreç, sadece bilimsel bir gerekliliği yerine getirmekle kalmayıp, araştırma sırasında edindiğim deneyimler, geliştirdiğim veri analizi becerileri benim için önemli bir eğitim olmakla birlikte bilimsel bakış açımı geliştirmeme de katkı sağlamıştır.

Öncelikle, bilimsel yaklaşımı, titizliği ve yönlendirmeleri bu tezin şekillenmesinde belirleyici olan, tez çalışmamın her aşamasında bilgi, birikim ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan, sadece akademik anlamda gelişmemde değil hayata dair tecrübe edinmemde de büyük katkısı olan tez danışmanım Prof. Dr. Aysel Özpınar'a,

LC-MS/MS analizlerinin gerçekleştirilmesinde, laboratuvar uygulamaları ve istatistiksel değerlendirme süreçlerinde yoğun iş temposu içerisinde yardımlarını, yol gösteriliciğini esirgemeyen değerli katkılarını sunan Prof. Dr. Muhittin Abdulkadir Serdar'a,

Lisansüstü eğitimimim boyunca bilgi ve birikimlerini içtenlikle paylaşan Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, her kararımda arkamda durarak bana cesaret veren, sabırları, anlayışları ve koşulsuz sevgileri ile beni daima güçlendiren canım aileme; yoğun geçen tez ve eğitim sürecinde bir cümleleriyle yeniden motive olmamı sağlayan, en zorlandığım anlarda bile pes etmememi sağlayan ve onların desteği olmadan bu noktaya gelemeyeceğimi bildiğim babam Selçuk Baltacıoğlu, annem Funda Baltacıoğlu, abim Batuhan Baltacıoğlu ve kardeşim Ege Baltacıoğlu'na içtenlikle ve gönülden teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak, lisans ve lisansüstü eğitimim süresince beni farklı bakış açılarıyla tanıştıran, bilimsel merakımı besleyen ve eğitim hayatım boyunca katkısı olan herkese teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN iii

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iv

İÇİNDEKİLER vi

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ viii

ŞEKİLLER LİSTESİ x

TABLOLAR LİSTESİ xi

ÖZET 1

ABSTRACT 2

1 GİRİŞ VE AMAÇ 3

2 GENEL BİLGİLER 5

2.1 Mesanenin Anatomisi, Fizyolojisi ve Histolojik Yapısı 5
2.2 Mesane Kanseri 6
2.2.1 Epidemiyolojisi, risk faktörleri ve moleküler temelleri 6
2.2.2 Mesane kanserinde evreleme 9
2.2.3 Mevcut tanı yöntemleri ve sınırlılıkları 11
2.3 Metabolomik Yaklaşımlar ve Serum Temelli Biyobelirteçlerin Mesane Kanseri Tanısındaki Rolü 13
2.4 Mikrobiyota-Kanser Etkileşimi 14
2.5 Trimethylamine-N-oxide (TMAO) 17
2.6 Trimethylamine-N-oxide (TMAO) Öncüllerinin Kanser Gelişimine Etkileri 22
2.6.1 Kolin 22
2.6.2 Betain 22
2.6.3 Karnitin 23
2.6.4 Prekürsörlerin kanser biyolojisindeki rolü 23
2.7 Çalışmanın Amacı ve Hipotezi 24

3 GEREÇ VE YÖNTEM 26

3.1 Araştırma Dizaynı 26
3.2 Kimyasallar ve İç Standartlar 28
3.3 Örnek Hazırlama 29
3.4 LC-MS/MS Analizi 29
3.5 İstatistiksel Analizler 31

4 BULGULAR 32

4.1 Çalışma Gruplarına Ait Demografik Veriler 32
4.2 Metabolit Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması 35
4.3 Korelasyon Analizi 43
4.4 ROC Analizi ile Metabolitlerin Tanısal Performanslarının Değerlendirilmesi 47
4.4.1 Kontrol ve tümör (genel) grupları arasında Roc analizi 48
4.4.2 Kontrol ve pTa grupları arasında ROC analizi 50
4.4.3 Kontrol ve pT1 grupları arasında ROC analizi 52
4.4.4 pTa ve pT1 grupları arasında ROC analizi 54
4.4.5 ROC analizlerinin genel değerlendirmesi 55
4.5 Lojistik Regresyon Analizi 56
4.5.1 Kontrol - tümör genel arasındaki lojistik regresyon analizi 56
4.5.2 Kontrol – Ta evresi arasındaki lojistik regresyon analizi 57
4.5.3 Kontrol – T1 grubu arasındaki lojistik regresyon analizi 58
4.5.4 Ta – T1 grubu arasındaki lojistik regresyon analizi 59
4.5.5 Tüm lojistik regresyon modellerinin genel değerlendirmesi 60
4.6 Risk Skoru Tabanlı Tanısal Performans Analizi 61
4.6.1 Risk skorunun hesaplanması 61
4.6.2 ROC analizi ile risk skorunun değerlendirilmesi 62
4.6.3 Genel yorum 62

5 TARTIŞMA 63

5.1 TMAO'nun Kanser Gelişimi ve Tümör Mikrosistemine Etkileri 63
5.2 Karnitin, Kolin ve Betaine'in Kanserle İlişkisi ve Tanısal Potansiyeli 64
5.2.1 Karnitin 64
5.2.2 Kolin 65
5.2.3 Betaine 65
5.3 Mevcut Tanı Yöntemleriyle Karşılaştırma ve Klinik Potansiyel 66
5.4 Çalışmanın Kısıtlılıkları 69
5.5 Gelecek Çalışmalar için Öneriler 70
5.5.1 Geniş ve çeşitli kohortlarda doğrulama 70
5.5.2 İdrar temelli metabolit analizleri 71
5.5.3 Mikrobiyota analizleri ile entegrasyon 71
5.5.4 Metabolit kombinasyonlarının kullanımı 71
5.5.5 Moleküler ve mekanistik çalışmalar 72
5.5.6 Klinik uygulama için standardizasyon 72

6 SONUÇ 73

7 KAYNAKLAR 75

8 EKLER 81

EK 1. Etik Kurul Onayı 81
EK 2. Etik Kurul Kararı (Tez Başlığı Onayı) 83

9 ÖZGEÇMİŞ 84

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

ACN	Acetonitrile (Asetonitril)
AUC	Area Under the Curve (Eğri Altındaki Alan)
BTA	Bladder Tumor Antigen (Mesane Tümör Antijeni)
CE	Collision Energy (Çarpışma Enerjisi)
CHKA	Choline Kinase-α (Kolin Kinaz-α)
CI	Confidence Interval (Güven Aralığı)
CRIP1	Cysteine Rich Protein 1 (Sistein Zengin Protein 1)
CXP	Collision Cell Exit Potential (Çarpışma Hücresi Çıkış Potansiyeli)
Da	Dalton (Atomik Kütle Birimi)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
DP	Declustering Potential (Kümelenme Çözme Potansiyeli)
ER	Endoplasmic Reticulum (Endoplazmik Retikulum)
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3)
FMO	Flavin Monooxygenase (Flavin Monooksijenaz)
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory (Küresel Kanser Gözlemevi)
HDACi	Histone Deacetylase Inhibitor (Histon Deasetilaz İnhibitörü)
IL-6	Interleukin 6 (İnterlökin 6)
ILK	Integrin-Linked Kinase (İntegrin Bağlantılı Kinaz)
IQR	Interquartile Range (Çeyrekler Arası Aralık)
LC–MS/MS	Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (Sıvı Kromatografi–Tandem Kütle Spektrometresi)
MRM	Multiple Reaction Monitoring (Çoklu Tepki İzleme)
NF-κB	Nuclear Factor kappa-B (Nükleer Faktör kappa-B)
NMP22	Nuclear Matrix Protein 22 (Nükleer Matris Proteini 22)
PET	Positron Emission Tomography (Pozitron Emisyon Tomografisi)
ROC	Receiver Operating Characteristic (Alıcı İşlem Özellikleri Eğrisi)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
RT	Retention Time (Retansiyon Süresi)

SAM	S-adenosylmethionine (S-adenosilmetiyonin)
SCFA	Short-Chain Fatty Acids (Kısa Zincirli Yağ Asitleri)
SD	Standard Deviation (Standart Sapma)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (İstatistiksel Paket Programı)
SW	Shapiro–Wilk Test (Shapiro–Wilk Testi)
TMA	Trimethylamine (Trimetilamin)
TMAO	Trimethylamine-N-oxide (Trimetilamin-N-oksit)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha (Tümör Nekroz Faktörü alfa)
TNM	Tumor, Node, Metastasis (Tümör, Nodül, Metastaz Evreleme Sistemi)
UBC	Urinary Bladder Cancer Test (Mesane Kanseri Testi)
UPEC	Uropathogenic Escherichia coli (Üropatojenik Escherichia coli)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Mesane duvarının histolojik yapısı 5

Şekil 2. Mesane kanseri risk faktörleri. Created with BioRender.com. 8

Şekil 3. Mesane kanserinde evreleme 10

Şekil 4. Mesane kanserinde mevcut tanı yöntemleri 12

Şekil 5. TMAO biyosentezi 18

Şekil 6. TMAO'nun hücresel etkileri 21

Şekil 7. Araştırmanın iş akış şeması ve çalışma kohortunu gösteren akış diyagramı. Created with BioRender.com. 27

Şekil 8. Klinik gruba göre betain ve karnitinin serum konsantrasyonları 38

Şekil 9. Klinik gruba göre TMAO ve kolinin serum konsantrasyonları 41

Şekil 10. Spearman korelasyon analizine ait ısı haritası (heatmap) 46

Şekil 11. Kontrol ve tüm mesane kanseri hasta grubu arasında betain, karnitin, kolin ve TMAO için ROC eğrileri 48

Şekil 12. Kontrol ve pTa gruplarında betain, karnitin, kolin ve TMAO için ROC eğrileri 50

Şekil 13. Kontrol ve pT1 gruplarında betain, karnitin, kolin ve TMAO için ROC eğrileri 52

Şekil 14. pTa ve pT1 gruplarında betain, karnitin, kolin ve TMAO için ROC eğrileri54

Şekil 15. Erken evre mesane kanserini (pTa + pT1) sağlıklı kontrollerden ayırt etmeye yönelik bileşik risk skoruna ait alıcı işletim karakteristiği (ROC) eğrisi. 61

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Analitler için kütle geçişleri 30

Tablo 2. Çalışma grubuna ait demografik veriler ve serum metabolit düzeylerinin tanımlayıcı istatistikleri 33

Tablo 3. Gruplar arası serum metabolit düzeylerinin karşılaştırılması 36

Tablo 4. Serum metabolitleri, evre, yaş, kilo, boy ve beden kitle indeksi arasındaki Spearman korelasyon katsayıları (rs) ve %95 güven aralıkları 44

Tablo 5. Max Youden index'e göre belirlenen cut-off değerleri ile ROC analizi ve Fisher's Exact Test sonuçları (Kontrol vs Tümör Genel) 49

Tablo 6. Kontrol ve pTa gruplarında, maksimum Youden index'e göre belirlenen cut-off değerleri ile ROC analizi ve Fisher's Exact Test sonuçları 51

Tablo 7. Kontrol ve pT1 gruplarında, maksimum Youden index'e göre belirlenen cut-off değerleri ile ROC analizi ve Fisher's Exact Test sonuçları 53

Tablo 8. pTa ve pT1 gruplarında, maksimum Youden index'e göre belirlenen cut-off değerleri ile ROC analizi ve Fisher's Exact Test sonuçları 55

Tablo 9. K-T genel regresyon modeline ait değişkenlerin katsayıları, anlamlılık düzeyleri ve odds ratio değerleri 57

Tablo 10. K-Ta regresyon modeline ait değişkenlerin katsayıları, anlamlılık düzeyleri ve odds ratio değerleri 58

Tablo 11. K-T1 regresyon modeline ait değişkenlerin katsayıları, anlamlılık düzeyleri ve odds ratio değerleri 59

Tablo 12. Ta–T1 regresyon modeline ait değişkenlerin katsayıları, anlamlılık düzeyleri ve odds ratio değerleri 60

Tablo 13. Risk skorlarına dayalı ROC analizi sonuçları 62

Tablo 14. Mevcut mesane kanseri tanı yöntemlerinin klinik özellikleri ve çalışmamızla kıyaslaması 67

ÖZET

Mesane Kanserinde Potansiyel Biyobelirteçlerin Omiks (Metabolomiks) Yöntemleri ile Araştırılması

Kasa invaziv olmayan mesane kanseri (NMIBC) yaşam boyu invaziv sistoskopik izlem gerektirmekte olup, sistoskopiye eşlik edebilecek güvenilir non-invaziv biyobelirteçlere gereksinim duyulmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası kaynaklı bir metabolit olan trimetilamin-N-oksit (TMAO), diyetle alınan kolin, karnitin ve betain üzerinden oluşmakta ve inflamasyon ile karsinogenezde rol aldığı bildirilmektedir; ancak mesane kanseri ile ilişkisi belirsizdir bu nedenle yapılan olgu-kontrol çalışmasında, LC–MS/MS yöntemi kullanılarak erken evre NMIBC'li 50 erkek hastada (25 pTa, 25 pT1) ve yaş açısından benzer 52 sağlıklı kontrolde serum TMAO ve diyet öncülleri nicel olarak analiz edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmede parametrik olmayan testler, Spearman korelasyonu, ROC analizi ve çok değişkenli lojistik regresyon kullanılmıştır. Serum TMAO, karnitin ve kolin düzeyleri NMİMK hastalarında kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek saptanırken, betain yalnızca anlamlı olmayan hafif bir artış eğilimi göstermiştir. TMAO, kolin, karnitin cümlleeri düzenle Tümör evresi ile en güçlü korelasyon TMAO, ardından karnitin ve kolin için gözlenmiştir. ROC analizinde TMAO, en yüksek bireysel tanısal performansı sağlamıştır. Karnitin ve kolin daha dengeli duyarlılık-özgüllük profilleri sunarken, betainin ayırt edici gücü sınırlı kalmıştır. Çok değişkenli lojistik regresyonda TMAO, karnitin ve kolin mesane kanseri için bağımsız belirteçler olarak kalmış; betain ise anlamlı bulunmamıştır. Bu üç metabolitten türetilen bileşik risk skoru mükemmele yakın ayırt edicilik göstermiştir. Observational nitelikteki bu tek merkezli kohortta, serum TMAO, karnitin ve kolin erken evre mesane kanseri için umut verici non-invaziv biyobelirteçler olarak öne çıkmaktadır. Bulguların daha büyük ve çok merkezli çalışmalarla doğrulanması ve TMAO eksenine ilişkin mikrobiyota ve genomik verilerle bütünleştirilmesi gerektiği düşülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Biyobelirteç, LC–MS/MS, Mesane kanseri, Metabolomik, Trimetilamin-N-oksit

ABSTRACT

Investigation of Potential Biomarkers in Bladder Cancer Using Omics (Metabolomics) Approaches

Non–muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) requires life-long invasive surveillance, and there is a need for reliable non-invasive biomarkers to complement cystoscopy. Trimethylamine-N-oxide (TMAO), a gut microbiota–derived metabolite generated from dietary choline, carnitine and betaine, has been implicated in inflammation and carcinogenesis, but its role in bladder cancer is unclear. In this case–control study, we quantified serum TMAO and its dietary precursors in 50 male patients with early-stage NMIBC (25 pTa, 25 pT1) and 52 age-matched healthy controls using LC–MS/MS. Non-parametric tests, Spearman's correlation, receiver operating characteristic (ROC) analysis and multivariable logistic regression were applied. Serum TMAO, carnitine and choline concentrations were significantly higher in NMIBC patients than in controls, whereas betaine showed only a non-significant trend towards elevation. Tumor stage correlated most strongly with TMAO, followed by carnitine and choline. In ROC analysis, TMAO yielded the highest individual diagnostic performance, while carnitine and choline exhibited more balanced sensitivity and specificity. Betaine displayed limited discriminatory ability. In multivariable logistic regression, TMAO, carnitine and choline remained independent predictors of bladder cancer, whereas betaine was not significant. A composite risk score derived from these three metabolites showed excellent discriminative power. In this exploratory, single-center cohort, serum TMAO, carnitine and choline—alone and particularly in combination—emerged as promising non-invasive biomarkers for early-stage bladder cancer. These findings warrant validation in larger, multi-center cohorts and integration with microbiota and genomic analyses to clarify mechanisms along the TMAO axis.

Keywords: Biomarkers, Bladder cancer, LC–MS/MS, Metabolomics, Trimethylamine-N-oxide

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri, üriner sistemin en yaygın görülen malignitelerinden (kötü huylu tümörler) biridir. GLOBOCAN 2022 tarafından bildirilen verilere göre, mesane kanseri küresel olarak en yaygın 9. kanser sırasında yer almakta, 614.298 yeni tanı ile ve 220.596 ölüme neden olarak dünya çapında kanserden ölümlerin 13. önde gelen nedeni olmaktadır (GLOBOCAN, 2022) . Hastalığın küresel yükü önemli bir artış eğilimi göstermekte olup, GLOBOCAN'ın 'Cancer Tomorrow' projeksiyonları yeni vakaların 2025 yılına kadar yaklaşık 656.000'e ulaşacağını tahmin etmektedir (GLOBOCAN, 2025). Klinik heterojenitesi yüksek olan bu tümör grubunda nüks, progresyon ve mortalite oranları, hastalığın evresine bağlı olarak önemli düzeyde değişkenlik gösterebilmektedir. Kasa invaziv olmayan mesane kanserinin alt tipleri olan pTa ve pT1 evreleri, erken evre tümörler olarak kabul edilmekte ve hastalığın seyri ile tedavi yaklaşımlarını belirleyici rol oynamaktadır.

Günümüzde mesane kanseri tanısında sistoskopi ve idrar sitolojisi yaygın olarak kullanılmalarına rağmen, bu yöntemlerin invaziv yapısı, düşük dereceli tümörlerde sınırlı duyarlılık sunması ve hasta uyumunu azaltması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle, daha güvenilir, non-invaziv ve tekrarlanabilir biyobelirteçlerin geliştirilmesine yönelik ihtiyaç artmaktadır. Bu noktada, metabolomik yaklaşımlar güçlü bir alternatif sunmaktadır. Mesane kanseri özelinde yapılan metabolomik çalışmalarda, tümör dokusu ve biyolojik sıvılarda anlamlı şekilde farklılık gösteren metabolitlerin varlığı bildirilmiş; bazı metabolitlerin yüksek tanısal doğruluk sağlayabildiği gösterilmiştir (1,2). Ayrıca, bağırsak mikrobiyotasının kanser üzerindeki etkisi giderek daha fazla araştırılmakta; TMAO, kolin, karnitin ve betain gibi metabolitlerin inflamasyon, oksidatif stres ve epigenetik mekanizmalar aracılığıyla tümör gelişimini etkileyebildiği belirtilmektedir (3–5).

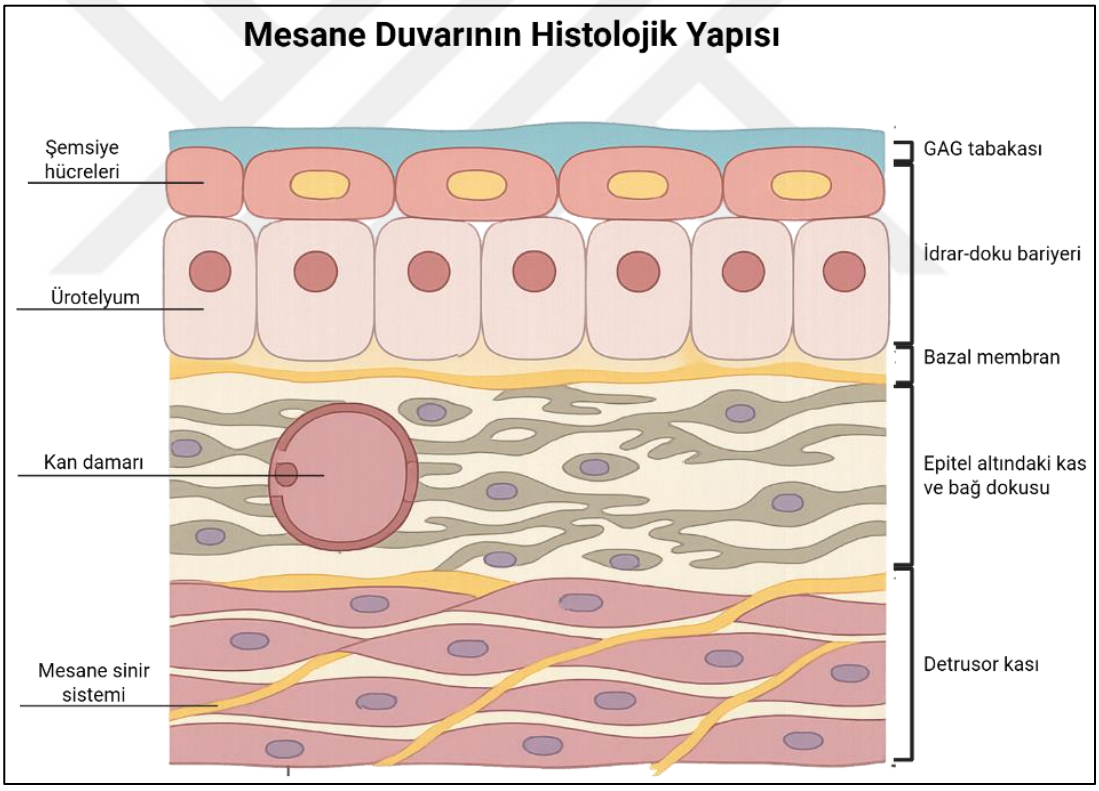
Bu tez çalışması, pTa ve pT1 evresinde yer alan mesane kanseri hastalarının ve sağlıklı bireylerin serum örneklerinde TMAO, kolin, karnitin ve betain düzeylerini LC-MS/MS yöntemiyle kantitatif olarak analiz etmeyi amaçlamaktadır. Elde edilecek veriler ile bu metabolitlerin erken evrede tanısal biyobelirteç potansiyeli

değerlendirilerek, mesane kanserine yönelik daha etkili ve non-invaziv tanı stratejilerinin geliştirilmesine katkı sunulması hedeflenmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Mesanenin Anatomisi, Fizyolojisi ve Histolojik Yapısı

Mesane, idrarın geçici olarak depolanmasından ve uygun koşullarda dışarı atılmasından sorumlu, esnek yapılı, kas tabakasından oluşan boşluklu bir organdır. Ortalama kapasitesi 400–600 mL olan mesane, pelviste simfiz pubisin arkasında, kadınlarda uterusun, erkeklerde ise rektumun önünde konumlanır. Mesane duvarı üç temel katmandan oluşur: içte ürotelyum (transizyonel epitel), ortada lamina propria ve dışta detrusor kası. Bu katmanlar, hem idrarla temas eden maddelere karşı bir bariyer görevi görür hem de mesanenin kasılıp gevşemesine olanak tanır.



Şekil 1. Mesane duvarının histolojik yapısı

Mesane duvarı tabakalarının şematik görünümü. En üstte mesane lümenini kaplayan glikozaminoglikan (GAG) tabakası bulunur; bu tabaka ürotelyumu idrardaki toksik ve enfektif ajanlara karşı koruyucu bir bariyer görevi görür. GAG tabakasının altında ürotelyum (transisyonel epitel) yer alır. Bunun altında bağ dokusundan zengin lamina propria bulunur. Daha derinde düz kas liflerinden oluşan kas tabakası (detrüsor kası) yer alırken, en altta bağ ve yağ dokusunu içeren adventisya tabakası bulunur. GAG: Glikozaminoglikan, Ürotelyum: Transisyonel epitel tabakası, Lamina propria: Bağ dokusu tabakası, Kas tabakası: Detrüsor kası. Created with BioRender.com.

Mesanenin iç yüzeyini döşeyen ürotelyum, idrardaki toksik metabolitlere karşı koruyucu görev üstlenen özelleşmiş bir epitel tabakasıdır. Bu epitelin yüzeyinde bulunan "umbrella hücreleri", apikal membranlarında ürotelyal plaklar sayesinde geçirgenliği en aza indirir ve mesaneyi aşındırıcı maddelere karşı korur. Mesane boşaldığında bu hücreler yüzey alanını azaltarak epitelin hasar almasını önler. Bu dinamik yapı, mesane doluluğuna göre şekil değiştirebilme yeteneğine sahiptir.

Histolojik olarak ürotelyumun altında yer alan lamina propria, bağ dokusu yapısıyla destekleyici görev üstlenirken, daha derindeki detrusor kası ise parasempatik sinir sistemi aracılığıyla işeme refleksini kontrol eder. Mesane fizyolojisinin sağlıklı işleyişi hem nörolojik hem de hücresel düzeyde pek çok mekanizmanın uyum içinde çalışmasına bağlıdır. Bu sistemin herhangi bir bileşeninde ortaya çıkan bozulmalar, enfeksiyondan tümöre uzanan geniş bir patolojik yelpazeye neden olabilir.

Mesane, dış ortamla sürekli temas hâlinde olan idrarın içinde yer alan potansiyel toksinler, kimyasal ajanlar, enfeksiyon etkenleri ve inflamatuar moleküllerle doğrudan etkileşim hâlindedir. Bu durum, özellikle ürotelyal hücrelerde stres yanıtlarını ve proliferatif süreçleri tetikleyerek onarım mekanizmalarını devreye sokar. Ancak bu hızlı rejeneratif kapasite, beraberinde mutasyon birikimi ve hücresel farklılaşma bozukluklarını da getirebilir. Dolayısıyla mesane hem savunmada hem de kanserleşme sürecinde kritik bir organdır.

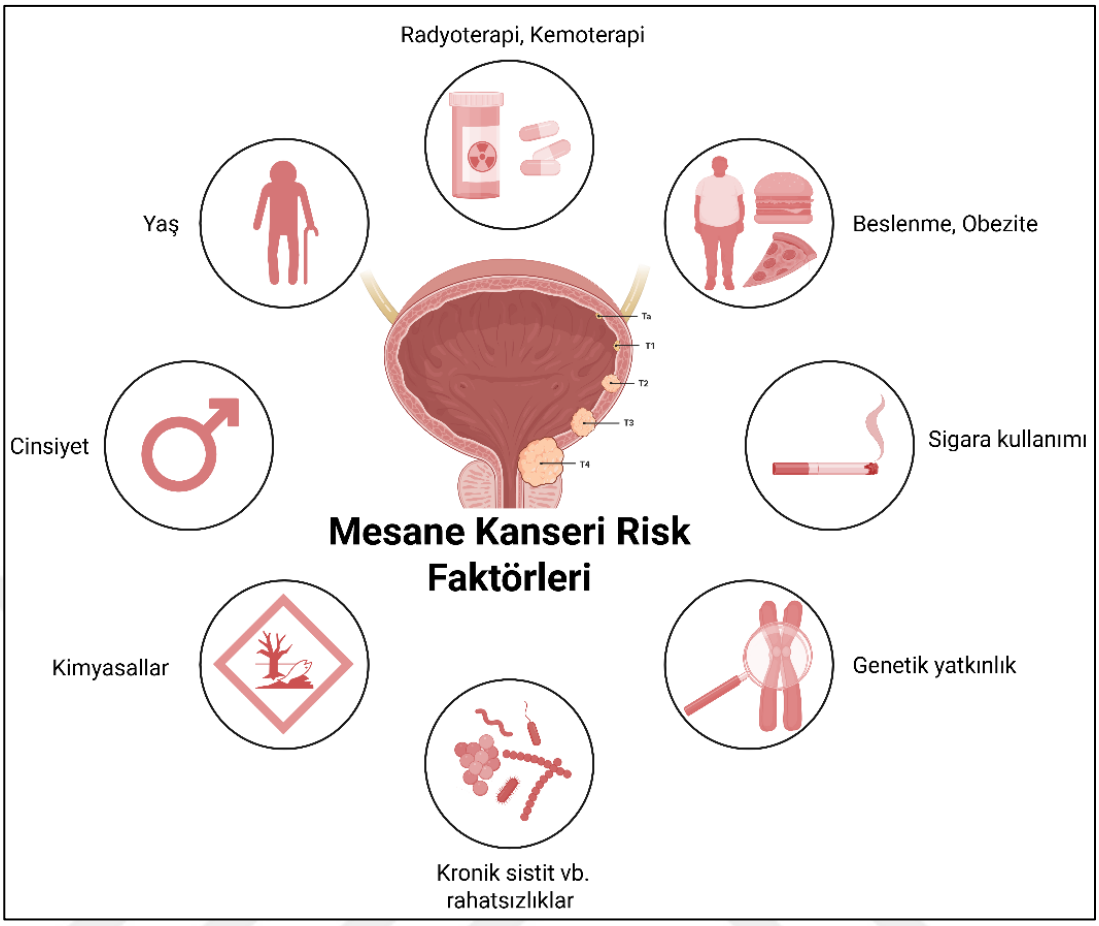
2.2 Mesane Kanseri

2.2.1 Epidemiyolojisi, risk faktörleri ve moleküler temelleri

Mesane kanseri, genellikle mesane iç yüzeyini kaplayan ürotelyumdan kaynaklanan malign bir tümördür ve genitoüriner sistemin en yaygın kanserlerinden biridir. Dünya genelinde erkeklerde daha sık görülürken, kadınlarda daha az sıklıkta ortaya çıkar; ancak kadınlarda tanı genellikle daha geç konulduğundan prognoz daha kötü seyretmektedir.

Klinik olarak genellikle iki ana alt tipe ayrılır: yüzeyel (non-invaziv) ve invaziv tümörler. Yüzeyel tümörler (pTa, pT1), genellikle düşük dereceli ve daha iyi prognozludur; ancak nüks etme eğilimindedir. İnvaziv tümörler ise kas tabakasına yayılmış (≥pT2) olup daha agresif seyirli, metastaz potansiyeli yüksek lezyonlardır. Histopatolojik olarak en sık gözlenen alt tip %90 oranında ürotelyal karsinomdur. Daha nadir olarak skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom gibi histolojik varyantlar da görülebilmektedir.

Mesane kanseri gelişiminde çevresel, genetik ve epigenetik birçok faktör rol oynamaktadır. En belirgin risk faktörü sigara kullanımı olup, sigaradaki aromatik aminler gibi karsinojenik bileşikler mesaneye ulaşarak DNA hasarına yol açar. Ayrıca boya, tekstil, plastik ve petrokimya endüstrilerinde çalışan bireylerde aromatik amin maruziyetine bağlı risk artışı gözlemlenmiştir. Kronik sistit, taş, parazit enfeksiyonları (örneğin Schistosoma haematobium) ve uzun süreli kateterizasyon gibi kronik irritasyon oluşturan durumlar da özellikle skuamöz hücreli karsinom gelişimine zemin hazırlayabilir.



Şekil 2. Mesane kanseri risk faktörleri. Created with BioRender.com.

Moleküler düzeyde mesane kanseri, genetik ve epigenetik değişikliklerin kümülatif etkisiyle ortaya çıkar. FGFR3, TP53, TERT promotoru, RAS ailesi genlerinde meydana gelen mutasyonlar sık görülür. Düşük dereceli, yüzeyel tümörlerde sıklıkla FGFR3 mutasyonları izlenirken, yüksek dereceli invaziv tümörlerde TP53 mutasyonları ve genomik instabilite daha yaygındır. Ayrıca epigenetik değişiklikler, örneğin DNA metilasyon bozuklukları ve histon modifikasyonları, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına neden olarak karsinogenez sürecini hızlandırmaktadır.

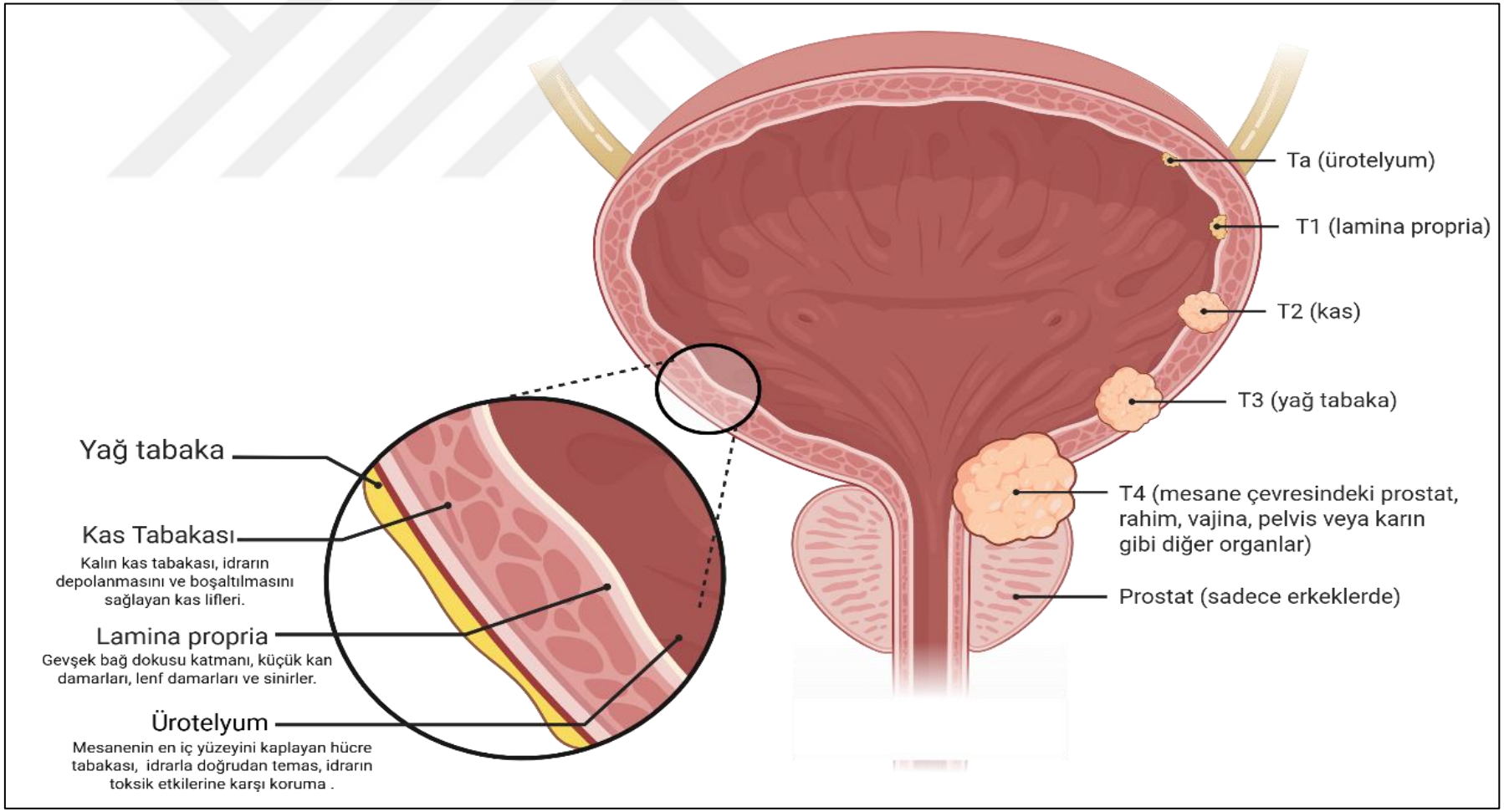
Mikroçevresel etkenler, özellikle inflamasyon ve oksidatif stres, mesane kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Bu bağlamda, hem mesane epitelinin dış etkenlere maruz kalması hem de sistemik metabolitlerin (örneğin TMAO gibi) inflamatuvar ve gen düzenleyici etkileri, bu kanser türünün

kompleks doğasına katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle mesane kanserinde biyobelirteç araştırmaları, erken tanı, prognoz belirleme ve tedaviye yanıt öngörüsü açısından güncel literatürde oldukça önemli bir alan hâline gelmiştir.

2.2.2 Mesane kanserinde evreleme

Mesane kanseri, tümörün mesane duvarı katmanlarına ve çevre dokulara invazyon derecesine göre evrelendirilmektedir. Uluslararası TNM (Tümör, Nodül, Metastaz) sistemine göre evreleme şu şekilde tanımlanır:

- pTa: Non-invaziv papiller tümörler; sadece ürotelyumda sınırlıdır.
- pT1: Lamina propriaya invazyon vardır, ancak kas tabakasına ulaşılmamıştır.
- pT2: Kas tabakasına invazyon söz konusudur (pT2a: yüzeyel kas; pT2b: derin kas).
- pT3: Perivezikal yağ dokusuna invazyon mevcuttur.
- pT4: Komşu organlara (prostat, uterus, vajina, bağırsak) veya pelvis duvarına invazyon vardır.



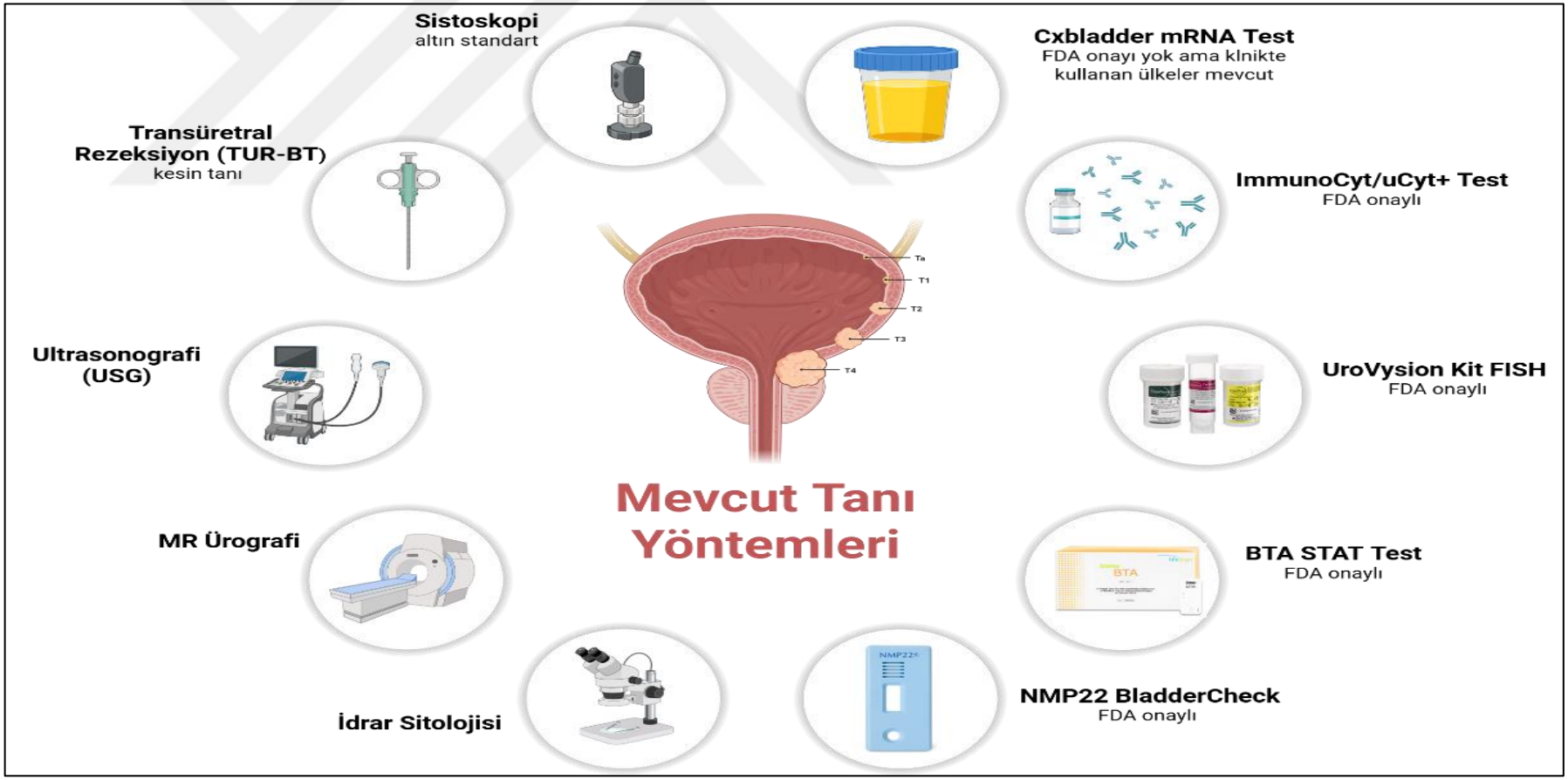
Şekil 3. Mesane kanserinde evreleme

Mesane kanserinde histolojik invazyon derinliğine göre evreleme. Created with BioRender.com.

Tümörlerin derecelendirilmesi ise hücresel farklılaşma derecesine dayanmaktadır. Düşük dereceli tümörler (Low-grade), yavaş büyür ve invazyon yapma riski düşüktür. Yüksek dereceli tümörler (High-grade) ise daha hızlı büyür, invazif ve metastatik potansiyele sahiptir. Evreleme ve derecelendirme sonuçları hem prognozun belirlenmesinde hem de uygun tedavi planlamasında kritik rol oynamaktadır. Histopatolojik açıdan bakıldığında, mesane tümörlerinin büyük çoğunluğu ürotelyal karsinom (transizyonel hücreli karsinom) olarak sınıflandırılmaktadır. Bunun yanında, kronik irritasyon ve enfeksiyonlara bağlı gelişebilen skuamöz hücreli karsinomlar ve nadir olarak adenokarsinomlar da mesanede görülebilmektedir (6). Tümörlerin derecelendirilmesi, biyolojik davranışları hakkında önemli bilgiler sağlamakta olup, düşük dereceli tümörler genellikle daha iyi prognoz sergilerken, yüksek dereceli tümörler daha agresif bir seyir göstermektedir (6,7).

2.2.3 Mevcut tanı yöntemleri ve sınırlılıkları

Mesane kanserinde tanı ve izlem amacıyla uzun yıllardır sistoskopi ve idrar sitolojisi kullanılmaktadır. Sistoskopi, ürotelyal anomalilerin doğrudan görsel tespitine olanak tanıyan, altın standart bir yöntemdir. Ancak invaziv bir işlem olması, yüksek maliyet, hasta konforunu olumsuz etkileme ve uzmanlık gerektirme gibi dezavantajlara sahiptir (8). İdrar sitolojisi ise özellikle yüksek dereceli tümörlerde yüksek özgüllük (%86) göstermesine rağmen, düşük dereceli tümörlerde duyarlılığın (~%48) yetersiz kalması, kullanımını sınırlamaktadır (8). Son yıllarda geliştirilen ve FDA tarafından onaylanan idrar temelli biyobelirteç testleri (örneğin NMP22, BTA stat, UroVysion, ImmunoCyt/uCyt) de sistoskopiye alternatif olamamış; bu testlerin de özgüllük ve hassasiyet açısından sınırlamaları olduğu bildirilmiştir(8,9). Ayrıca idrarda kontaminasyon riski, standardizasyon güçlükleri ve düşük sensitivite değerleri, özellikle nüks takibinde güvenilirliğini azaltmaktadır. İdrar temelli biyobelirteçlerde, örnek toplama ve idrarın karmaşık yapısı sebebiyle standardizasyon zorlukları da yaşanmaktadır.



Şekil 4. Mesane kanserinde mevcut tanı yöntemleri

Mesane kanseri tanısında kullanılan başlıca yöntemler. İdrar bazlı testler arasında sitoloji ve FDA onaylı biyobelirteçler (NMP22, BTA-Stat/BTA-Trak, UroVysion FISH, ImmunoCyt) yer almaktadır. Görüntüleme yöntemleri ultrasonografi ve BT/MR ürografiyi kapsar. Endoskopik yöntem olan sistoskopi, tümörlerin doğrudan görüntülenmesini sağlar. Kesin tanı ve evreleme ise transüretral rezeksiyon (TUR-BT) ile elde edilen biyopsi materyalinin histopatolojik incelenmesi ile konulur. NMP22: Nuclear Matrix Protein 22; BTA: Bladder Tumor Antigen; FISH: Fluorescence in situ hybridization; TUR-BT: Transüretral Rezeksiyon-Biyopsi; BT: Bilgisayarlı Tomografi; MR: Manyetik Rezonans. Created with BioRender.com.

Hastalığın seyri heterojen olduğundan, erken evrelerde tanı ve düzenli takip, yaşam süresi ve yaşam kalitesinin artırılması açısından kritik önem taşımaktadır. Bu nedenle hem daha az invaziv hem de daha hassas yöntemlere olan ihtiyaç, yeni biyobelirteç araştırmalarını hızlandırmıştır. Serum temelli biyobelirteçlerin, kontaminasyona daha az açık olması ve daha stabil olması araştırmalarda önemli bir avantaj sağlamaktadır (1). Bununla birlikte, LC-MS/MS gibi ileri teknolojilerle hassas kantitatif ölçümlerin yapılabilmesi, potansiyel biyobelirteç adaylarının keşfinde oldukça önemlidir (9–11).

2.3 Metabolomik Yaklaşımlar ve Serum Temelli Biyobelirteçlerin Mesane Kanseri Tanısındaki Rolü

Son yıllarda omik teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte, kanser biyolojisini daha derinlemesine anlamaya yönelik sistem biyolojisi yaklaşımları ön plana çıkmıştır. Bu yaklaşımlardan biri olan metabolomik, organizmadaki küçük moleküllü metabolitlerin bütüncül analizini sağlayarak hücresel metabolizmanın dinamik bir yansımasını sunar. Metabolomik, hücrelerin genetik yapıları ve çevresel etkilerle nasıl etkileşime girdiğini ortaya koyar ve hastalıkların erken tanısı, sınıflandırılması ve prognozunun belirlenmesinde önemli bir araç olarak değerlendirilmektedir (9,12,13).

Mesane kanseri gibi heterojen yapılı tümörlerde, genetik mutasyonlar kadar metabolik yolaklarda da önemli bozulmalar olduğu gösterilmiştir. Bu bozulmalar, hücrelerin enerji üretimi, membran sentezi, redoks dengesi ve biyosentetik yollarında değişimlere neden olur. Metabolomik analizler, bu değişimlerin doğrudan sonucunu yansıttığı için kanser hücrelerinin fenotipik durumlarını anlamada yüksek hassasiyet ve özgüllük sağlar (14). Bu bağlamda metabolomik profilleme, erken evre mesane tümörlerinin ayırt edilmesinde, nüks riskinin belirlenmesinde ve tedaviye yanıtın öngörülmesinde umut verici sonuçlar sunmaktadır (15).

Serum örnekleri, sistemik metabolit profillerinin kolay erişilebilir, invaziv olmayan ve tekrarlanabilir şekilde elde edilebilmesi açısından klinik uygulamalarda

tercih edilen biyolojik materyallerdir. Mesane gibi üriner sistem organlarına ait patolojik süreçler, yalnızca idrarda değil, sistemik dolaşımdaki metabolit düzeylerinde de yansıtılabilir. Ayrıca, idrar örnekleri bireyler arası hidrasyon durumu, diürez oranı ve diyet gibi faktörlere oldukça duyarlıdır. Buna karşın, serum metabolomikleri daha stabil bir ortam sunarak tanı ve takip için daha güvenilir biyobelirteçler elde edilmesini sağlayabilir (16,17).

Özellikle sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC–MS/MS) gibi yüksek hassasiyetli analitik tekniklerin kullanılması, serumda düşük konsantrasyonda bulunan metabolitlerin bile güvenilir şekilde tespit edilmesini mümkün kılmaktadır. Bu da metabolomik analizleri, klasik tanı yöntemlerine ek olarak kullanılabilecek güçlü tamamlayıcı araçlar hâline getirmiştir (9,16,17). Nitekim yapılan çalışmalarda, kanser hücrelerinin farklı metabolit profilleri sergilediği ve bu profillerin tümör evresi, derecesi ve biyolojik davranışı hakkında önemli bilgiler sunduğu gösterilmiştir (14,18).

Sonuç olarak, metabolomik temelli yaklaşımlar, mesane kanserinin tanı ve prognozunda yeni nesil biyobelirteçlerin keşfi açısından yüksek potansiyele sahiptir. Bu alandaki güncel araştırmalar, özellikle serum temelli biyobelirteçlerin, non-invaziv, hassas ve tekrarlanabilir tanı aracı olarak klinik uygulamalara kazandırılabileceğini göstermektedir. Bu nedenle metabolomik analizler, mesane kanseriyle ilişkili moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlarken aynı zamanda kişiselleştirilmiş tıbbın da önünü açmaktadır.

2.4 Mikrobiyota-Kanser Etkileşimi

Bağırsak mikrobiyotası, insan sağlığı üzerinde çok yönlü etkiler gösteren ve başta bağışıklık sistemi olmak üzere metabolik denge, inflamasyon süreçleri ve epigenetik mekanizmaların düzenlenmesinde temel rol oynayan kompleks bir ekosistemdir. Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışma, bu mikrobiyal dengenin bozulması, yani disbiyozisin, yalnızca gastrointestinal sistem hastalıkları ile sınırlı

kalmayıp; sistemik inflamasyon, bağışıklık yanıt bozuklukları ve çeşitli kanser türlerinin gelişimi ile yakından ilişkili olabileceğini göstermiştir (4,19–21).

Mikrobiyota tarafından diyetsel bileşenlerin fermantasyonu sonucunda kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar), ikincil safra asitleri, fenolik bileşikler, indoller ve trimetilamin (TMA) gibi metabolitler üretilir. Bu metabolitler, hücresel proliferasyon, apoptoz, DNA onarımı, immün hücre aktivasyonu ve epigenetik düzenleme gibi temel biyolojik süreçlerde düzenleyici etkilere sahiptir. Örneğin, SCFA'lardan biri olan butirat, kolonik epitelde apoptozu desteklemesinin yanı sıra histon deasetilaz inhibitörü (HDACi) gibi davranarak epigenetik regülasyona katkı sağlar ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu artırabilir (5,22). Buna karşılık, bazı ikincil safra asitleri ve azot içeren mikrobiyal metabolitler, özellikle TMA ve karaciğerde oksitlenerek oluşan TMAO DNA hasarını artırarak, inflamatuvar sinyal yollarını aktive ederek ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini uyararak tümör mikroçevresinin oluşumuna katkıda bulunabilir (23–25).

Bağışıklık sistemi ile mikrobiyal metabolitler arasında çift yönlü bir etkileşim söz konusudur. SCFA'lar, başta asetat, propiyonat ve butirat olmak üzere, bağışıklık hücrelerinin sitokin üretimini ve aktivitesini düzenleyerek sistemik inflamasyonu baskılayabilir. Buna karşın, TMAO gibi metabolitler inflamatuvar sinyalleri artırarak, özellikle NF-κB yolunun aktivasyonu aracılığıyla, kanser gelişimini destekleyici bir mikroçevre yaratabilir (25,26). Bu bağlamda, bağışıklık sistemi ile mikrobiyota arasında kurulan dengenin bozulması hem lokal hem de sistemik düzeyde tümör oluşumuna zemin hazırlayan patolojik bir çevre meydana getirebilir.

Mikrobiyotanın yapısı bireyden bireye değişmekle birlikte; diyet, yaş, antibiyotik kullanımı, çevresel toksinler ve genetik altyapı gibi faktörlerden etkilenir. Özellikle yüksek yağlı ve düşük lifli diyetler disbiyozise neden olmakta, bu durum da zararlı metabolitlerin üretimini artırarak hem gastrointestinal sistemde hem de sistemik organlarda tümör oluşumuna zemin hazırlamaktadır (21,27,28). Diyet-mikrobiyota etkileşimi, yalnızca metabolit düzeylerinde değil, aynı zamanda immün yanıt ve epitel bariyer bütünlüğü üzerinde de belirleyici etkilere sahiptir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, belirli bakteriyel türlerin kanser gelişiminde doğrudan rol oynayabileceğini göstermiştir. Fusobacterium nucleatum, Escherichia coli ve Bacteroides fragilis gibi bakteriler hücresel sinyal yollarını doğrudan etkileyerek, DNA hasarına neden olabilecek toksinler salgılayarak ya da lokal inflamasyonu artırarak tümör gelişimini tetikleyebilir (25,29,30).

Özellikle mesane kanseri bağlamında, uropathogenic Escherichia coli (UPEC) türlerinin mesane epiteline tutunarak enfeksiyon başlatması ve kronik inflamasyonu tetiklemesi; bu sürecin TMAO düzeyleri ile şiddetlenerek tümöral mikroçevreyi güçlendirebileceği ileri sürülmektedir (31).

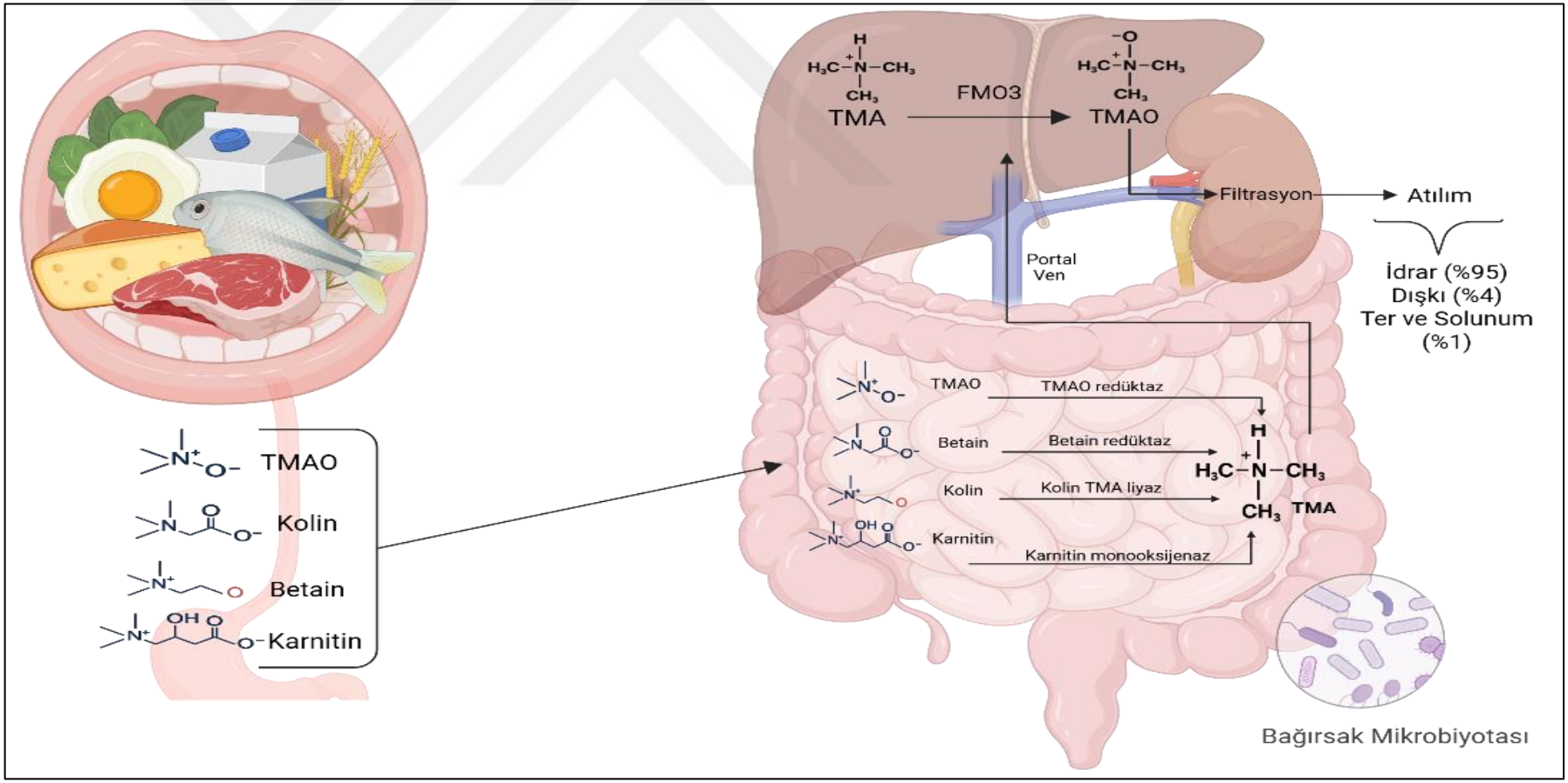
Bağırsak mikrobiyotasının bu etkileri yalnızca kolorektal kanserle sınırlı olmayıp; meme, prostat ve mesane gibi sistemik malignitelerde de benzer etkileşimlerin söz konusu olduğu görülmektedir. Özellikle fenilasetilglisin, serotonin ve indol türevleri gibi mikrobiyal ürünlerin sistemik dolaşıma geçerek hormonal ve bağışıklık yanıtlarını modüle ettikleri gösterilmiştir (32,33).

Bu süreçte, inflamatuvar bakteri türlerinin (örneğin Enterobacteriaceae) artması ve faydalı türlerin (örneğin Lactobacillus, Bifidobacterium) azalması da tümörojenik risklerin artmasına yol açabilir (34).

Tüm bu bulgular, bağırsak mikrobiyotasının ve onun ürettiği metabolitlerin, yalnızca sindirim sisteminin değil, aynı zamanda sistemik hastalıkların ve özellikle kanserin gelişiminde merkezi bir role sahip olduğunu göstermektedir. Mikrobiyotanın bağışıklık sistemiyle olan etkileşimi, metabolit profili ve epigenetik regülasyon üzerindeki etkileri dikkate alındığında, bu ekosistemin hedeflenmesiyle kanser riskinin azaltılması veya tedaviye yanıtın artırılması mümkün olabilir. Bu bağlamda probiyotik ve prebiyotik uygulamalar ile kişiselleştirilmiş diyet yaklaşımlarının, gelecekte kanser önleme ve destekleyici tedavi stratejilerinin bir parçası olabileceği düşünülmektedir.

2.5 Trimethylamine-N-oxide (TMAO)

Trimethylamine-N-oxide (TMAO), diyetsel kolin, karnitin ve betain gibi bileşiklerin bağırsak mikrobiyotası tarafından trimetilamin (TMA)'ye dönüştürülmesi ve bu ara ürünün karaciğerde flavin monooxygenase (FMO) enzimleri aracılığıyla oksitlenmesi sonucu oluşan küçük, hidrofilik bir moleküldür (35). TMAO, ilk olarak kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiş olsa da son yıllarda inflamasyon, oksidatif stres ve anjiyogenez gibi mekanizmalar üzerindeki etkileri nedeniyle kanser dahil pek çok sistemik hastalığın patofizyolojisinde potansiyel bir aktör olarak değerlendirilmektedir (36–39).



Şekil 5. TMAO biyosentezi

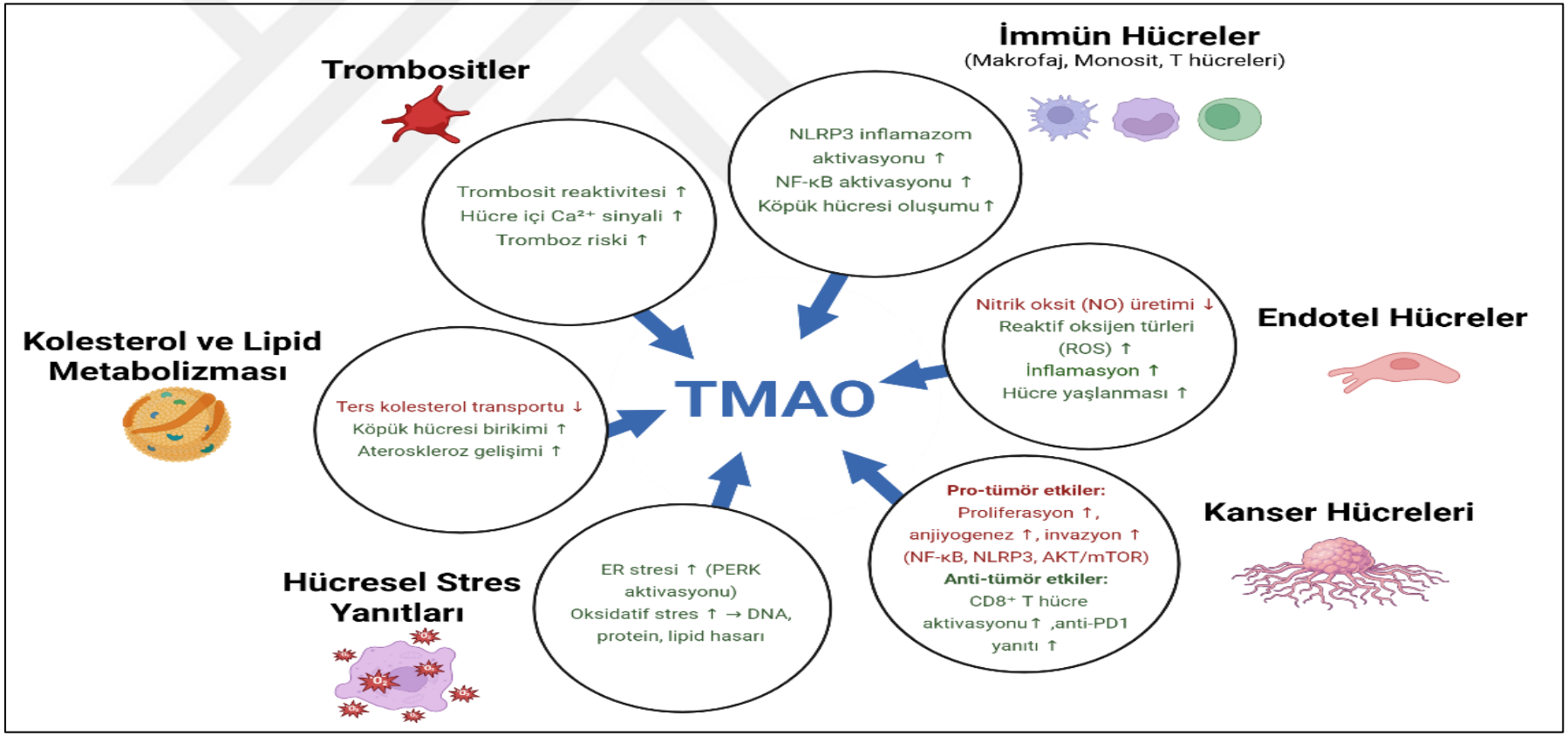
Diyetle alınan kolin, betain ve karnitin bağırsak mikrobiyotası tarafından trimetilamin (TMA)'e dönüştürülür. Bu süreçte kolin TMA liyaz, betain redüktaz ve karnitin monooksijenaz gibi enzimler görev alır. TMA, portal ven yoluyla karaciğere taşınarak flavin monooksijenaz 3 (FMO3) enzimi aracılığıyla TMAO'ya okside edilir. TMAO'nun büyük kısmı böbreklerden idrarla atılırken, küçük bir kısmı dışkı ve ter yoluyla elimine edilir. TMA: Trimetilamin; TMAO: Trimetilamin-N-oksit; FMO3: Flavin monooksijenaz 3. Created with BioRender.com.

Literatürdeki birçok çalışma, TMAO'nun hücresel düzeyde çeşitli sinyal yollarını aktive ederek tümör gelişimiyle ilişkili süreçleri destekleyebileceğini ortaya koymuştur. Özellikle NF-κB gibi proinflamatuvar sinyal yollarının TMAO aracılığıyla aktive edilmesi sonucunda IL-6 ve TNF-α gibi sitokinlerin ekspresyonunun arttığı, bunun da kronik inflamatuvar mikroçevrenin oluşumuna katkı sunduğu gösterilmiştir (25,28,35). Ayrıca TMAO'nun vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) üzerinden anjiyogenezi uyararak tümör hücrelerinin proliferasyonu ve invazyonunu destekleyebileceği bildirilmektedir (40,41). Bunun yanı sıra, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak DNA hasarına yol açması ve endoplazmik retikulum (ER) stresini tetiklemesi, TMAO'nun hücre içi homeostazı bozarak mutagenez riskini artırabileceğini düşündürmektedir (42–44).

Mesane kanseri bağlamında TMAO'nun rolünü doğrudan inceleyen çalışmalar sınırlı olsa da eldeki bazı veriler bu molekülün bu kanser türüyle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Wu ve arkadaşları (2023), TMAO ile ön işlemden geçirilen mesane epitel hücrelerinin uropatojenik Escherichia coli (UPEC) enfeksiyonuna daha duyarlı hâle geldiğini ve bu durumun enfeksiyona bağlı kronik inflamasyonu tetikleyebileceğini raporlamıştır (31). Tekrarlayan üriner enfeksiyonların mesane kanseri için bilinen bir risk faktörü olduğu göz önüne alındığında, bu bulgular TMAO'nun dolaylı yoldan tümör gelişimini destekleyebileceğini düşündürmektedir.

TMAO'nun mesane epiteli üzerindeki etkileri yalnızca enfeksiyon duyarlılığı ile sınırlı değildir. Bu molekül, karaciğerde sentezlendikten sonra büyük oranda idrarla atıldığından, mesane mukozasıyla sürekli temas hâlindedir. Renal fonksiyon bozukluğu veya TMAO üretimindeki artış, idrarda TMAO birikimini artırabilir (45–47). Bu durumun, epitel bariyer bütünlüğünün bozulmasına, sitokin üretiminin artmasına ve doku düzeyinde yeniden şekillenmeye neden olabileceği, dolayısıyla kanserojen değişimleri kolaylaştırabileceği öne sürülmektedir. TMAO'nun oksidatif stres ve ER stresi gibi hücresel baskılayıcı mekanizmaları devreye sokması, bu molekülün mesane kanserinde potansiyel bir risk faktörü olabileceğini desteklemektedir (42,43).

Her ne kadar TMAO ile mesane kanseri arasındaki doğrudan mekanistik bağlantılar henüz yeterince detaylandırılmamış olsa da diğer solid tümör modellerinden elde edilen bulgular, benzer patolojik süreçlerin mesane dokusunda da geçerli olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle kolorektal kanser çalışmalarında TMAO'nun VEGF üzerinden anjiyogenez, ROS üzerinden DNA hasarı ve NF-κB aracılığıyla inflamasyon oluşturduğu gösterilmiştir (40,41). Bu bulgular ışığında, mesane kanseri hastalarının serum ve idrar örneklerinde TMAO düzeylerinin değerlendirilmesi hem tanı hem de prognostik açıdan önemli bilgiler sunabilir.



Şekil 6. TMAO'nun hücresel etkileri

TMAO, farklı hücre tiplerinde çeşitli biyolojik süreçleri etkiler. Endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) üretimini azaltır, oksidatif stresi artırır ve hücre yaşlanmasını hızlandırır. İmmün hücrelerde NLRP3 inflammasomunu ve NF-κB sinyal yolunu aktive ederek pro-inflamatuar yanıtı güçlendirir, köpük hücre oluşumunu teşvik eder. Trombositlerde reaktiviteyi ve tromboz riskini artırır. Kolesterol metabolizmasında ters kolesterol transportunu baskılar ve ateroskleroz gelişimine katkıda bulunur. Hücrelerde ER stresi ve oksidatif stres mekanizmalarını aktive eder. Kanser hücrelerinde bağlama bağlı olarak pro-tümör (proliferasyon, anjiyogenez, invazyon) veya anti-tümör ($CD8^+$ T hücre aktivasyonu) etkiler gösterebilir. NO: Nitrik oksit; ROS: Reaktif oksijen türleri; NLRP3: NOD-like reseptör ailesi pyrin domain içeren 3; NF-κB: Nükleer faktör kappa B; ER: Endoplazmik retikulum; AKT: Protein kinaz B; mTOR: Mammalian target of rapamycin; GSDME; PD1: Programmed cell death protein 1. Created with BioRender.com.

Sonuç olarak, bağırsak mikrobiyotası kaynaklı bir metabolit olan TMAO, yalnızca sistemik inflamasyon ve metabolik regülasyon üzerinde değil, aynı zamanda mesane epiteli ile olan teması ve enfeksiyon eğilimini artırıcı etkileri aracılığıyla mesane kanseri gelişiminde potansiyel bir rol oynayabilir. Bu nedenle, TMAO'nun tanısal biyobelirteç olarak değerlendirilebilmesi ve bu eksende prebiyotik, probiyotik veya diyet müdahalelerinin araştırılması, ilerleyen dönemlerde mesane kanserine yönelik bütüncül stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

2.6 Trimethylamine-N-oxide (TMAO) Öncüllerinin Kanser Gelişimine Etkileri

2.6.1 Kolin

Kolin, hücre membranlarının yapısında yer alan fosfatidilkolin'in temel bileşenlerinden biri olmasının yanı sıra, bir karbon metabolizmasında metil donörü olarak görev alır. Kolin, betain'e oksidatif olarak dönüştürülerek DNA metilasyonu gibi epigenetik süreçlerde önemli rol oynayan metilasyon döngüsüne katkı sağlar (48). Bu döngü, özellikle tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik bir öneme sahiptir (49). Bae et al. (2014), kolin eksikliğinin DNA hipometilasyonuna, genetik instabiliteye ve böylece karsinogenezise yol açabileceğini bildirmiştir (50). Ayrıca, aşırı kolin alımının da belirli koruyucu genlerin hipermetilasyonunu artırabileceği ve bu yolla onkogen ekspresyonunu tetikleyebileceği öne sürülmektedir (51). Kolin aynı zamanda bağırsak mikrobiyotası tarafından TMA üretiminde kullanılan önemli bir substrattır. Bu yönüyle kolin alımı, TMAO üretimini etkileyerek inflamasyon, oksidatif stres ve tümör mikroçevresinin oluşumu gibi mekanizmaları dolaylı olarak modüle edebilir (52).

2.6.2 Betain

Betain, kolinden türeyen ve metil donörü olarak görev yapan bir osmolittir. DNA metilasyonu üzerindeki düzenleyici etkisi sayesinde gen ekspresyonunun stabilitesini korur ve epigenetik dengenin sağlanmasına katkı sunar. Xie et al. (2023),

yetersiz betain düzeylerinin DNA hasarına ve genomik instabiliteye neden olabileceğini; bunun da tümör oluşumu açısından bir risk faktörü oluşturduğunu belirtmiştir (45). Ayrıca, betainin insülin duyarlılığı üzerindeki olumlu etkileri, bazı metabolik hastalıklar ve bunlarla ilişkili kanser türlerinde koruyucu rol oynayabileceğini düşündürmektedir (53–55). Ancak bu etkilerin dokular arası ve hastalık bağlamına göre değişkenlik gösterebileceği unutulmamalıdır.

2.6.3 Karnitin

Karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasında görev alarak enerji metabolizmasının düzenlenmesinde temel bir rol oynar. Bununla birlikte, kolin gibi karnitin de bağırsak mikrobiyotası tarafından TMA üretiminde substrat olarak kullanılır. Bazı çalışmalarda, karnitin alımının TMAO düzeylerini artırabileceğini ve bu artışın inflamasyon, oksidatif stres ve ROS üretimi gibi mekanizmaları tetikleyerek çeşitli kanser türlerinin gelişimini destekleyebileceği gösterilmiştir (54,56,57). Shi et al. (2024) ise karnitin ve TMAO metabolizmasının tiroid kanseri gibi malignitelerle olan ilişkisini ortaya koymuştur (58).

2.6.4 Prekürsörlerin kanser biyolojisindeki rolü

Kolin, betain ve karnitin yalnızca TMAO'nun biyosentezinde görev alan öncül moleküller değil; aynı zamanda gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi, enerji metabolizması ve inflamatuvar yanıt gibi temel süreçler üzerinde de doğrudan etkilere sahiptir. Bu moleküllerin metilasyon döngüsü üzerindeki etkileri, tümör baskılayıcı ve onkogenlerin ekspresyonunu belirleyerek karsinogenez sürecini etkileyebilir. Ayrıca, bu bileşiklerin mikrobiyota ile etkileşimi, TMA üretimi üzerinden TMAO oluşumunu artırarak sistemik inflamasyonu ve pro-tümörijenik ortamların gelişimini destekleyebilir. Dolayısıyla, bu metabolitlerin düzeylerinin diyet, mikrobiyota kompozisyonu ve genetik altyapı ile birlikte değerlendirilmesi, kanser biyolojisinin anlaşılmasında ve bireyselleştirilmiş beslenme yaklaşımlarının geliştirilmesinde önemli katkılar sağlayabilir.

2.7 Çalışmanın Amacı ve Hipotezi

Bu tez çalışmasının temel amacı, literatürde potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilen Trimethylamine-N-oxide (TMAO), kolin, karnitin ve betain düzeylerini, mesane kanseri hastaları ile sağlıklı bireylerin serum örneklerinde LC-MS/MS yöntemiyle kantitatif olarak analiz etmektir. Çalışma kapsamında elde edilecek bulguların, bu metabolitlerin mesane kanseri tanısındaki ayırt edici performanslarını ortaya koyması ve erken tanı ile risk sınıflandırma süreçlerine katkı sağlaması hedeflenmektedir.

Araştırmanın hipotezi, TMAO, kolin, karnitin ve betain düzeylerinin mesane kanseri hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği ve bu farklılıkların tanısal açıdan kullanılabilir biyobelirteç potansiyeli taşıdığı yönündedir. Özellikle erken evre (Ta ve T1) hastalıkta bu metabolitlerin biyobelirteç olarak değer taşıyabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışmanın özgünlüğü, literatürde ilk kez TMAO ve onun öncül metabolitlerinin birlikte mesane kanseriyle ilişkilendirilerek metabolomik düzeyde karşılaştırmalı analizinin yapılacak olmasıdır. Mevcut bilgiler doğrultusunda, bu dört metabolitin birlikte değerlendirildiği kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışma sonucunda ulaşılması planlanan hedefler şunlardır:

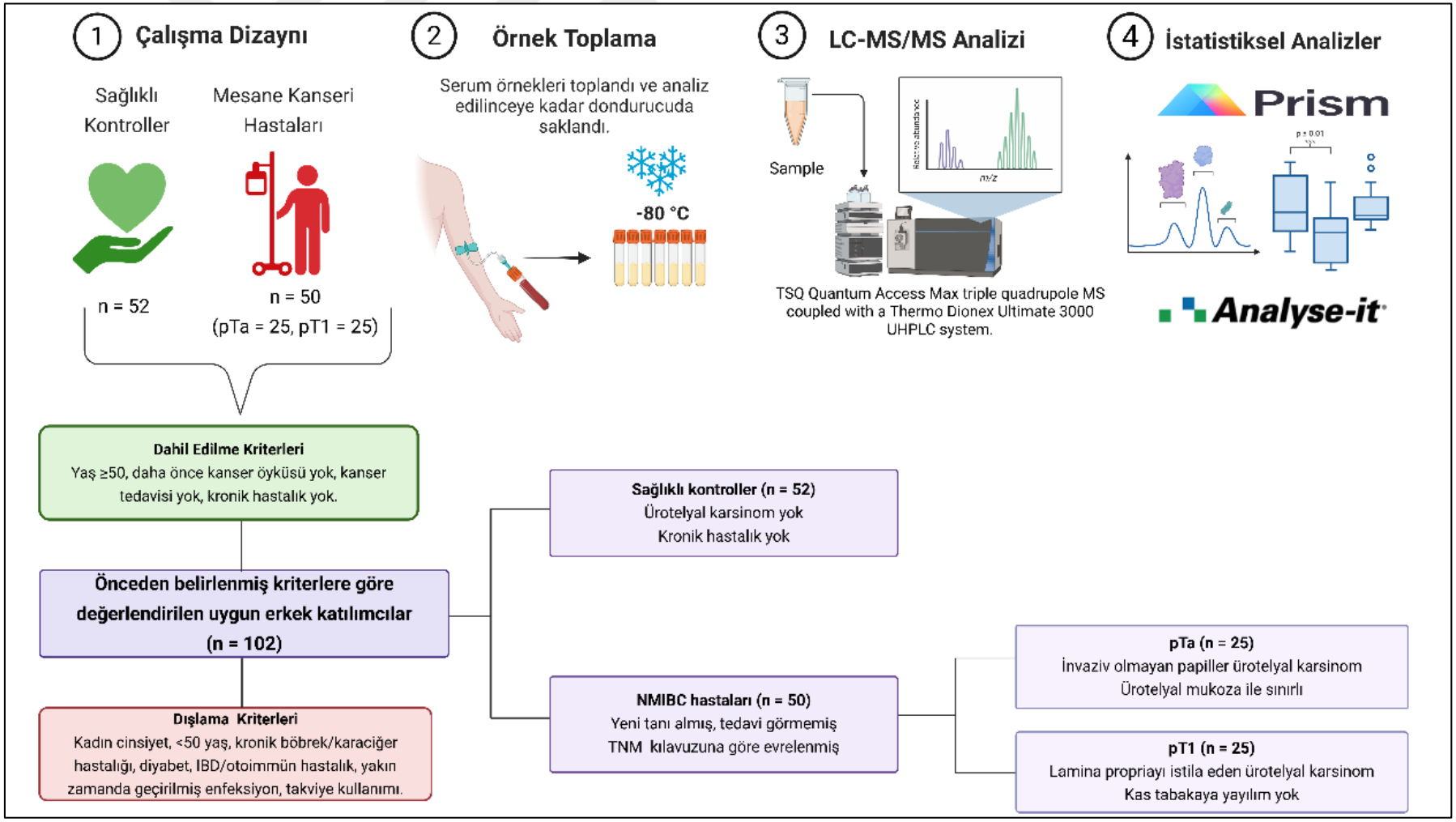
- TMAO, kolin, karnitin ve betain düzeylerinin mesane kanseri evrelerine göre dağılımı metabolomik yaklaşımlarla tanımlanacaktır,
- ROC analizi yoluyla bu metabolitlerin erken evre tanıda kullanılabilirlik performansları değerlendirilecektir,
- Elde edilen bulgular ışığında potansiyel biyobelirteç adayları belirlenecek ve özellikle kasa-invaziv olmayan mesane kanserinde erken tanı stratejilerine katkı sunulacaktır.

Bu tez, mesane kanserinde metabolit temelli tanısal araç geliştirme alanında önemli bir boşluğu doldurmayı ve gelecekte klinik uygulamalarda değerlendirilebilecek yeni biyobelirteçlerin önünü açmayı hedeflemektedir.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırma Dizaynı

Bu tez çalışması, ATADEK 2024-7/274 kodlu etik kurul onayına sahip proje kapsamında yürütülmüştür. Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerden bilgilendirilmiş gönüllü onam formları alınmış ve etik ilkelere uygun şekilde örnekleme süreci gerçekleştirilmiştir.



Şekil 7. Araştırmanın iş akış şeması ve çalışma kohortunu gösteren akış diyagramı. Created with BioRender.com.

Mesane kanseri hasta grubu, Acıbadem Maslak Hastanesi Üroloji kliniklerine başvuran, ameliyat öncesi tanı ve tedavi sürecinde rutin kan örneği alınmış hastalardan oluşturulmuştur. Serum örnekleri, tanı anında rutin klinik prosedürler çerçevesinde preoperatif dönemde alınmış ve daha sonra analizlerde kullanılmak üzere -80 °C'de dondurularak saklanmıştır. Serum örnekleri analiz öncesinde yalnızca bir kez çözülerek kullanılmış, tekrar dondurulma işlemi yapılmamıştır.

Bu kapsamda toplam 102 serum örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Bunların 50'si mesane kanseri tanısı almış hastalara (25 pTa evresi, 25 pT1 evresi), diğer 52'si ise sağlıklı bireylerden oluşmaktadır. Sağlıklı kontrol grubundaki bireyler, herhangi bir kanser, sistemik hastalık veya inflamatuar hastalık öyküsü bulunmayan bireylerden seçilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen mesane kanseri tanısı almış bireylerde yaş ≥ 50 ve erkek cinsiyet temel dahil etme kriterleridir. Çalışma dışı bırakılma kriterleri arasında; kadın cinsiyet, aktif kemoterapi veya radyoterapi öyküsü, antioksidan takviyesi kullanımı, son üç ay içerisinde geçirilmiş aktif enfeksiyon, ayrıca böbrek yetmezliği, diyabet, kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı ya da karaciğer yetmezliği öyküsü yer almaktadır.

Bu hasta kohortu, literatürle uyumlu şekilde sadece erkek ve 50 yaş üstü bireyleri içerecek şekilde sınırlandırılmıştır. Bu yaklaşım, TMAO ve öncüllerinin serum düzeylerini etkileyebilecek yaş ve cinsiyet farklılıklarının etkisini minimize etmek amacıyla tercih edilmiştir.

3.2 Kimyasallar ve İç Standartlar

Bu çalışmada kantitatif olarak analiz edilen metabolitler şunlardır: trimetilamin-N-oksit (TMAO), kolin, betain ve karnitin. Tüm analitik standartlar Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir:

- Kolin (C7017-5G)

- Betain (61962-50G)
- Karnitin (8400920025)
- TMAO (CAS No: 1184-78-7)

TMAO tayininde izotopik iç standart olarak TMAO-d9 (500 ng/mL) kullanılmıştır. Glipizid (Glucotrol® X) ise genel iç standart olarak tüm örneklere eklenmiştir. Tüm çözücüler LC-MS derecesinde olup, asetonitril ve formik asit Merck (Darmstadt, Germany) firmasından sağlanmıştır.

3.3 Örnek Hazırlama

Serum örneklerinde TMAO düzeylerinin belirlenmesinde, (58) Li et al. (2021) ve Buczko et al. (2020) tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Her bir serum örneğinden 50 µL alınarak, 10 µL iç standart çözeltisi (TMAO-d9, 500 ng/mL; Sigma-Aldrich) ve 200 µL soğuk asetonitril (ACN) eklenmiştir. Karışım 10 dakika vortexlenmiş, ardından 14.000 rpm'de 5 dakika süreyle 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan 50 µL alınarak 50 µL %30 ACN çözeltisiyle karıştırılmıştır. Son olarak, bu nihai karışımdan 5 µL LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir.

Kolin, betain ve karnitin düzeylerinin kantifikasyonu için de aynı örnek hazırlama protokolü uygulanmıştır. Bu üç analit, TMAO ile birlikte aynı enjeksiyonla analiz edilmiş olup, ölçümleri sistemde tanımlı özgün MRM geçişlerine göre gerçekleştirilmiştir. Her bir analit için ayrı kalibrasyon eğrileri hazırlanmış ve bu eğriler üzerinden kantifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerde enjeksiyon farklarını ve sistem stabilitesini kontrol etmek amacıyla glipizid iç standart olarak kullanılmıştır.

3.4 LC-MS/MS Analizi

TMAO, kolin, betain ve karnitin düzeylerinin kantifikasyonu için analizler, Thermo Dionex Ultimate 3000 UHPLC sistemi ile entegre edilmiş TSQ Quantum

Access Max (Thermo Scientific, USA) üçlü kuadrupol kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayırma işlemi için Phenomenex marka C18 kolon (100 × 3 mm, 3 µm partikül boyutu) kullanılmıştır. Mobil fazlar olarak iki ayrı pompa ile hazırlanmış çözeltiler kullanılmıştır: Pompa A, 5 mM amonyum asetat içeren su; Pompa B ise %100 asetonitrilden oluşmaktadır. Gradient elüsyon programı şu şekilde uygulanmıştır: 0.0 dakikada %80 A, 1.5 dakikada %20 A'ya lineer geçiş, 2.5 dakikada %80 A'ya geri dönüş ve 6.0 dakikaya kadar sabit tutulma. Mobil faz akış hızı 0.5 mL/dk olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı 30 °C'de sabitlenmiştir.

Kütle spektrometre ayarları şu şekilde yapılmıştır: kapiler sıcaklığı 225 °C, vaporizatör sıcaklığı 350 °C, sheath gas basıncı 25 Arb, aux gas basıncı 15 Arb. Analizler, Çoklu Tepki İzleme (MRM – Multiple Reaction Monitoring) modunda gerçekleştirilmiş olup, tüm analitlere ait kütle geçişleri detaylı bir şekilde Tablo.1 de gösterilmiştir.

Tablo 1. Analitler için kütle geçişleri

Analit	**Q1 kütle (Da) [1]**	**Q3 kütle (Da) [2]**	**Zaman (ms)**	**CE (V)**	**CXP (V)**	**DP (V)**	**RT (dk)**
Karnitin	162.1	103.1 [2]	50	25	10	84	0.92
	162.1	104.0	50	19	14	80	
	162.1	60.1	50	19	14	91	
	162.1	86.0	50	23	10	93	
Betain	118.4	58.1	50	35	14	110	0.91
	118.4	59.1 [2]	50	23	12	65	
	118.4	43.2	50	59	18	83	
Kolin	104.1	61.1	50	23	16	60	0.85
	104.1	60.1 [2]	50	23	16	60	
	104.1	45.2	50	31	10	28	
TMAO	76.0	59.0	50	15	16	60	0.90
	76.0	58.1 [2]	50	27	14	81	
	76.0	42.2	50	43	10	34	
Glipizid	444.1	318.9 [2]	50	-30	-25	-200	3.67
	444.1	169.9	50	-42	-17	-200	

1 Glipizid negatif modda analiz edilmiştir, diğer tüm analitler pozitif modda analiz edilmiştir. **2** Kantifikasyon (nicel analiz) için kullanılan iyon çiftleridir. CE: çarpışma enerjisi (collision energy), CXP: çarpışma hücresi çıkış potansiyeli (collision cell exit potential), DP: kümelenme çözme potansiyeli (declustering potential), RT: retansiyon süresi (retention time), TMAO: trimetilamin-N-oksit (trimethylamine-N-oxide).

3.5 İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizleri, IBM SPSS Statistics v26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) ve Analyse-it (Analyse-it Software, Ltd., Leeds, Birleşik Krallık) yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değişkenlerin dağılım özellikleri Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiş, normal dağılım göstermeyen veriler için tanımlayıcı istatistikler medyan (minimum–maksimum) şeklinde ifade edilmiştir.

Gruplar arası karşılaştırmalarda parametrik olmayan testlerden Kruskal–Wallis testi kullanılmış; anlamlı fark saptanan değişkenler için Bonferroni düzeltmeli ikili karşılaştırmalar yapılmıştır.

TMAO, kolin, betain ve karnitin düzeylerinin tanısal performansını değerlendirmek amacıyla Alıcı İşlem Özellikleri Eğrisi (Receiver Operating Characteristic – ROC) analizi uygulanmıştır. ROC analizleri üç farklı karşılaştırma için ayrı ayrı yürütülmüştür: Kontrol grubu ile pTa evresi karşılaştırması, kontrol grubu ile pT1 evresi karşılaştırması ve kontrol grubu ile tümör grubu (pTa+pT1) karşılaştırması. Her bir biyobelirteç için duyarlılık (sensitivite), özgüllük (spesifite), kesim değeri (cut-off), eğri altındaki alan (Area Under the Curve – AUC) ve Youden indeksi hesaplanmıştır. Tüm istatistiksel testlerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Grafiksel gösterimler için ayrıca GraphPad Prism v9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) yazılımı kullanılmıştır.

4 BULGULAR

4.1 Çalışma Gruplarına Ait Demografik Veriler

Çalışma grubuna ait demografik veriler ve serum metabolit düzeylerinin tanımlayıcı istatistikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışma grubuna ait demografik veriler ve serum metabolit düzeylerinin tanımlayıcı istatistikleri

	Control (n =52)			pTa (n=25)			pT1 (n=25)		
	Mean ± SD	**Min–Max**	**p – value (S-W)**	**Mean ± SD**	**Min–Max**	**p – value (S-W)**	**Mean ± SD**	**Min–Max**	**p – value (S-W)**
BMI (kg/m^2)	24.42 ± 3.31	19.03–31.24	0.003	26.83 ± 4.93	19.81–33.24	0.454	25.52 ± 4.00	19.61–34.72	0.272
HEIGHT (m)	1.69 ± 0.08	1.53–1.85	0.095	1.69 ± 0.07	1.58–1.85	0.074	1.71 ± 0.09	1.50–1.85	0.502
AGE (years)	71.02 ± 8.18	51–87	0.820	66.68 ± 4.97	53–76	0.204	71.00 ± 7.93	54–83	0.183
WEIGHT (kg)	72.87 ± 9.69	55–93	0.217	76.36 ± 14.53	60–107	0.027	74.12 ± 10.10	58–93	0.158
BETAINE (µM/L)	18.87 ± 8.70	6.07–50.02	0.000	24.66 ± 11.07	3.42–51.46	0.716	24.78 ± 12.77	9.61–50.84	0.042
CARNITINE (µM/L)	59.05 ± 19.36	21.51–96.39	0.277	94.11 ± 24.04	55.53–144.40	0.057	80.49 ± 20.69	28.04–115.19	0.538
CHOLINE (µM/L)	61.30 ± 45.64	7.98–302.88	0.000	127.88 ± 94.45	13.53–470.57	0.001	120.79 ± 70.28	28.36–274.35	0.045
TMAO (µM/L)	1.06 ± 0.41	0.45–1.84	0.000	1.76 ± 0.40	1.06–2.61	0.024	2.78 ± 2.34	1.06–9.10	0.000

Veriler ortalama ± standart sapma (SD), minimum–maksimum değerler olarak sunulmuştur. p-değeri, ilgili değişkenin grup içindeki dağılımının normalliğini değerlendiren Shapiro–Wilk testi sonuçlarını göstermektedir.

Çalışma gruplarına ait demografik ve biyokimyasal özellikler Tablo 2'te sunulmuştur. Yaş dağılımı incelendiğinde, kontrol grubunun ortalama yaşı 71,02 ± 8,18 yıl, pT1 grubunun ortalama yaşı ise 71,00 ± 7,93 yıl olup birbirine oldukça benzerdir. pTa grubunda ise ortalama yaş 66,68 ± 4,97 yıl ile diğer gruplara kıyasla daha düşük saptanmıştır. Shapiro–Wilk normalite testi sonuçları, her üç grupta da yaş dağılımının normal dağılımla uyumlu olduğunu göstermektedir (kontrol $p = 0.820$, pTa $p = 0.204$, pT1 $p = 0.183$).

Vücut kitle indeksi (BMI) açısından, kontrol grubunda ortalama değer 24,42 ± 3,31 kg/m², pTa grubunda 26,83 ± 4,93 kg/m² ve pT1 grubunda 25,52 ± 4,00 kg/m² olarak belirlenmiştir. Normalite analizi, kontrol grubunda BMI dağılımının normalden sapma gösterdiğini ($p = 0.003$), pTa ($p = 0.454$) ve pT1 ($p = 0.272$) gruplarında ise normal dağılım varsayımının sağlandığını ortaya koymuştur. Boy uzunluğu bakımından gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmemiş; ortalama boy kontrol grubunda 1,69 ± 0,08 m, pTa grubunda 1,69 ± 0,07 m ve pT1 grubunda 1,71 ± 0,09 m olarak saptanmıştır. Shapiro–Wilk testi, her üç grup için de boy dağılımının normal dağılıma yakın seyrettiğini göstermiştir ($p > 0.05$). Vücut ağırlığı açısından en yüksek ortalama değer pTa grubunda 76,36 ± 14,53 kg olarak bulunmuş, bunu pT1 grubu (74,12 ± 10,10 kg) ve kontrol grubu (72,87 ± 9,69 kg) izlemiştir. Normalite analizi, pTa grubunda vücut ağırlığı dağılımının normalden sapma gösterdiğine ($p = 0.027$), kontrol ($p = 0.217$) ve pT1 ($p = 0.158$) gruplarında ise normal dağılımla uyumlu olduğuna işaret etmektedir.

Metabolit düzeyleri incelendiğinde;

- Betain: Kontrol grubunda 18,87 ± 8,70 µM/L, pTa grubunda 24,66 ± 11,07 µM/L ve pT1 grubunda 24,78 ± 12,77 µM/L olarak saptanmıştır. Normalite testi, kontrol ($p < 0.001$) ve pT1 ($p = 0.042$) gruplarında dağılımın normalden saptığını, pTa grubunda ise ($p = 0.716$) normal dağılım varsayımının sağlandığını göstermektedir.
- Karnitin: Kontrol grubunda 59,05 ± 19,36 µM/L, pTa grubunda 94,11 ± 24,04 µM/L ve pT1 grubunda 80,49 ± 20,69 µM/L düzeylerine ulaşmıştır. Shapiro–

Wilk testi, karnitin düzeylerinin tüm gruplarda normal dağılımla uyumlu olduğunu göstermektedir (kontrol p = 0.277, pTa p = 0.057, pT1 p = 0.538).

- Kolin: Kontrol grubunda 61,30 ± 45,64 µM/L, pTa grubunda 127,88 ± 94,45 µM/L ve pT1 grubunda 120,79 ± 70,28 µM/L olarak gözlenmiştir. Normalite analizi, hem kontrol ($p < 0.001$) hem pTa ($p = 0.001$) hem de pT1 ($p = 0.045$) gruplarında kolin dağılımının normalden belirgin biçimde saptığını göstermektedir.
- TMAO: Kontrol grubunda 1,06 ± 0,41 µM/L, pTa grubunda 1,76 ± 0,40 µM/L ve pT1 grubunda 2,78 ± 2,34 µM/L olarak saptanmıştır. Shapiro–Wilk testi, kontrol ($p < 0.001$) ve pT1 ($p < 0.001$) gruplarında dağılımın normalden sapma gösterdiğini, pTa grubunda ise ($p = 0.024$) sınırda olmakla birlikte normal dağılımdan anlamlı sapma olduğunu ortaya koymuştur.

Normalite analizleri sonucunda özellikle betain, kolin ve TMAO düzeylerinde, ayrıca bazı demografik değişkenlerde (kontrol grubunda BMI, pTa grubunda vücut ağırlığı) dağılımın normalden sapma gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle ileri grup karşılaştırmalarında parametrik olmayan (non-parametrik) istatistiksel yöntemler tercih edilmiştir.

4.2 Metabolit Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması

Çalışma kapsamında dört farklı metabolitin (betain, karnitin, kolin ve TMAO) yanı sıra temel demografik değişkenlerin de (BMI, boy, yaş ve vücut ağırlığı) kontrol, pTa ve pT1 grupları arasındaki düzey farklılıkları Kruskal–Wallis testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanan metabolitler için post-hoc analiz olarak Mann–Whitney U testi uygulanmış ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılık gösteren gruplar tabloda yıldız işareti (*) ile belirtilmiştir. Elde edilen bulgular Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo 3. Gruplar arası serum metabolit düzeylerinin karşılaştırılması

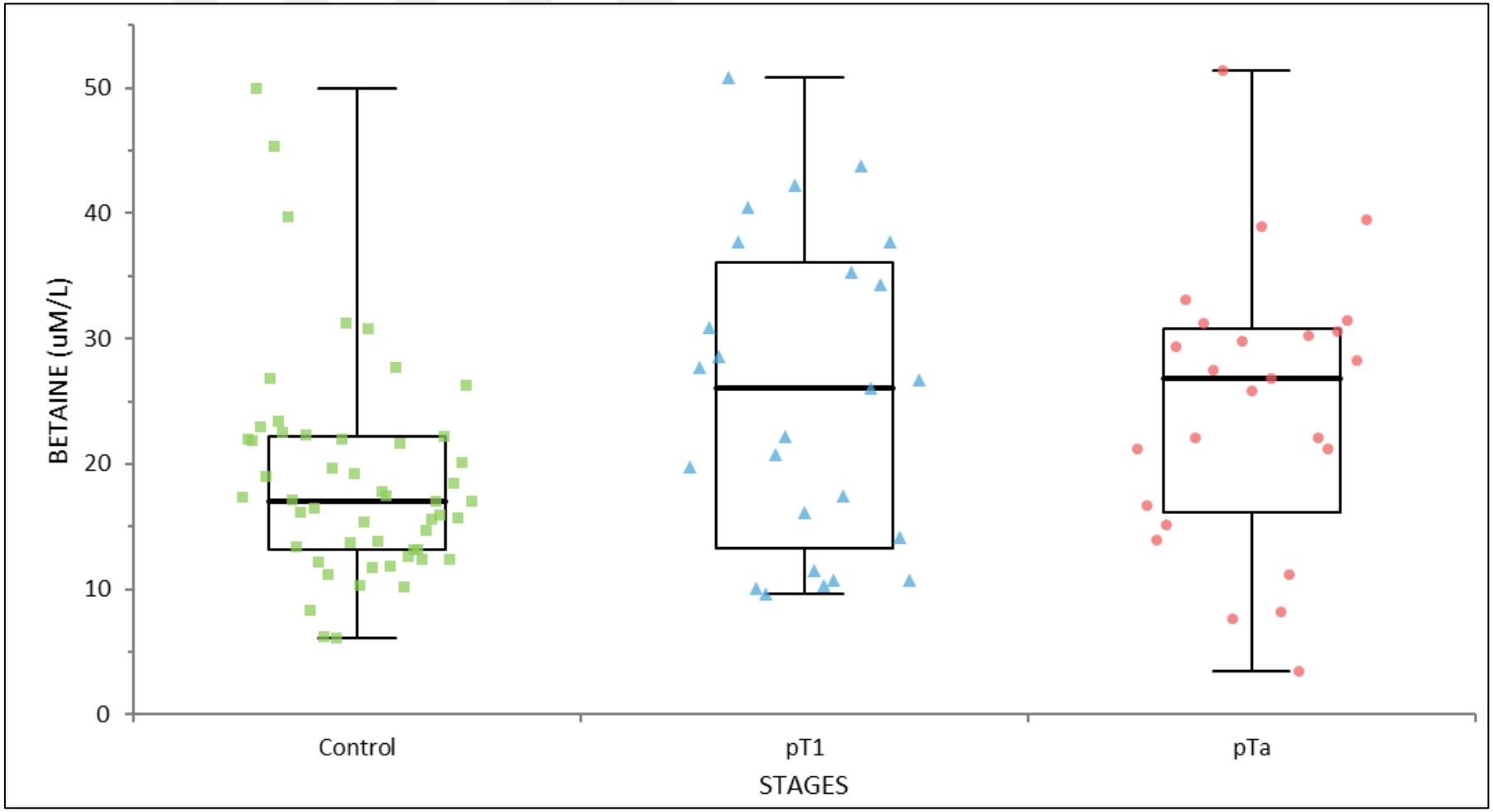
	Control (n=52) Median (IQR)	**pTa (n=25) Median (IQR)**	**pT1 (n=25) Median (IQR)**	**p- value**
BMI (kg/m2)	23.65 (21.55–28.19)	25.78 (23.40–29.32)	24.22 (21.97–28.76)	0.144
HEIGHT (m)	1.70 (1.63–1.75)	1.68 (1.62–1.76)	1.70 (1.65–1.80)	0.672
AGE (years)	71.50 (66.00–76.00)	66.00 (64.00–70.00)	71.00 (66.00–79.00)	0.095
WEIGHT (kg)	73.50 (65.00–80.00)	72.00 (64.50–86.50)	75.00 (65.00–82.50)	0.695
BETAINE (uM/L)	17.07 (13.19- 22,18)	26.77 (15.89–30.91)	22.17 (11.2- 36,08)	0.094
CARNITINE (uM/L)	60.96 (43.43- 71.71)	92.69* (77.79–102.40)	78.35* (69.06- 99.12)	< 0.0001
CHOLINE (uM/L)	57,52 (38.39- 65.38)	98.83* (65.74 –164.93)	120.54* (65.28- 146.62)	< 0.0001
TMAO (uM/L)	0.85 (0.80- 1.45)	1.95* (1.42- 2.00)	1.82* (1.33- 2.71)	< 0.0001

Veriler medyan (25.–75. Persentil, IQR) olarak sunulmuştur. Kruskal–Wallis testi ile genel grup farkları analiz edilmiştir. Yıldız işareti (*), kontrol grubuna kıyasla Mann–Whitney U testine göre anlamlı fark bulunan grupları göstermektedir ($p < 0,05$).

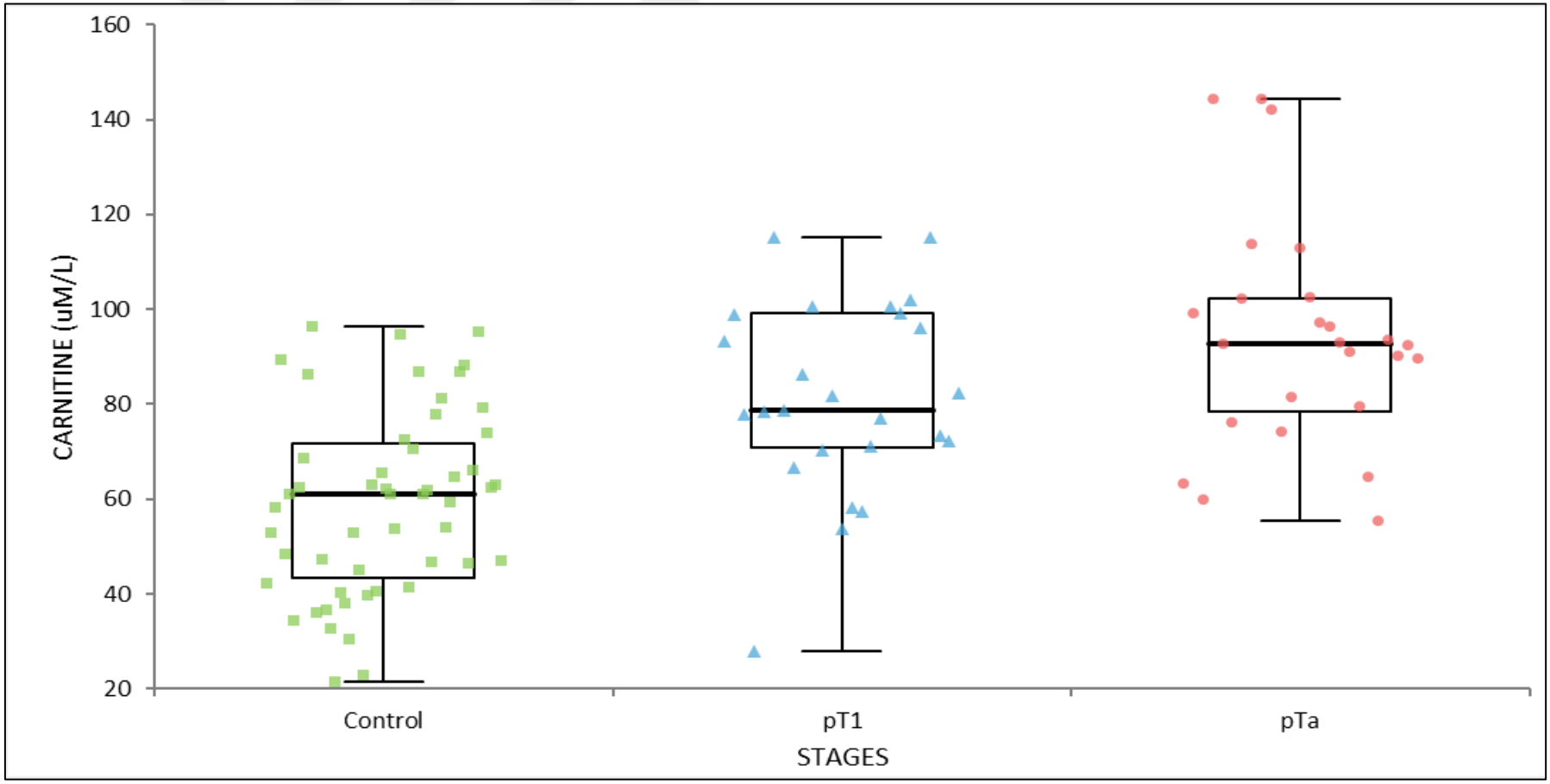
Demografik değişkenler incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. BMI açısından kontrol, pTa ve pT1 gruplarının medyan değerleri sırasıyla 23,65 kg/m² (IQR: 21,55–28,19), 25,78 kg/m² (IQR: 23,40–29,32) ve 24,22 kg/m² (IQR: 21,97–28,76) olup, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,144$). Benzer şekilde, boy uzunluğu kontrol, pTa ve pT1 gruplarında sırasıyla 1,70 m (IQR: 1,63–1,75), 1,68 m (IQR: 1,62–1,76) ve 1,70 m (IQR: 1,65–1,80) olup anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p = 0,672$). Yaş dağılımı kontrol grubunda 71,50 yıl (IQR: 66,00–76,00), pTa grubunda 66,00 yıl (IQR: 64,00–70,00) ve pT1 grubunda 71,00 yıl (IQR: 66,00–79,00) olarak saptanmış; pTa grubunda yaşın daha düşük olması dikkati çekmekle birlikte, bu fark istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır ($p = 0,095$). Vücut ağırlığı bakımından da gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiş; medyan değerler kontrol, pTa ve pT1

gruplarında sırasıyla 73,50 kg (IQR: 65,00–80,00), 72,00 kg (IQR: 64,50–86,50) ve 75,00 kg (IQR: 65,00–82,50) olarak belirlenmiştir ($p = 0,695$). Bu sonuçlar, gruplar arasında temel demografik özellikler açısından belirgin bir dengesizlik olmadığını göstermektedir.

Metabolit düzeyleri açısından kontrol, pTa ve pT1 grupları karşılaştırıldığında, betain hariç tüm metabolitler için istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Betain düzeyleri kontrol, pTa ve pT1 gruplarında sırasıyla 17,07 µM/L (IQR: 13,19–22,18), 26,77 µM/L (IQR: 15,89–30,91) ve 22,17 µM/L (IQR: 11,20–36,08) olarak gözlenmiş; tümör gruplarında medyan değerler daha yüksek olmakla birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,094$). Buna karşılık, karnitin, kolin ve TMAO düzeylerinde belirgin ve anlamlı artışlar saptanmıştır (tümünde $p < 0,0001$).



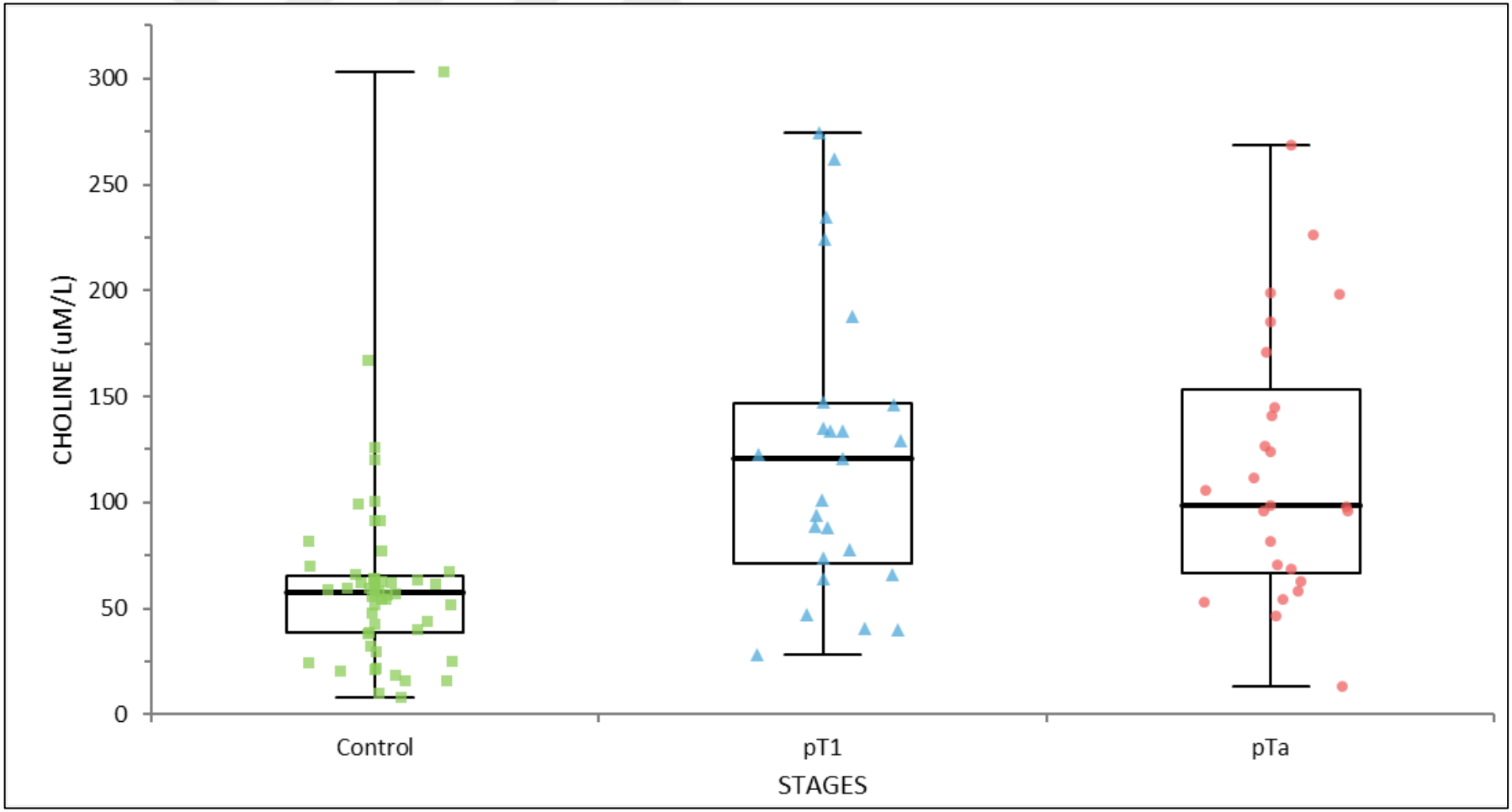
Şekil 8. Klinik gruba göre betain ve karnitinin serum konsantrasyonları



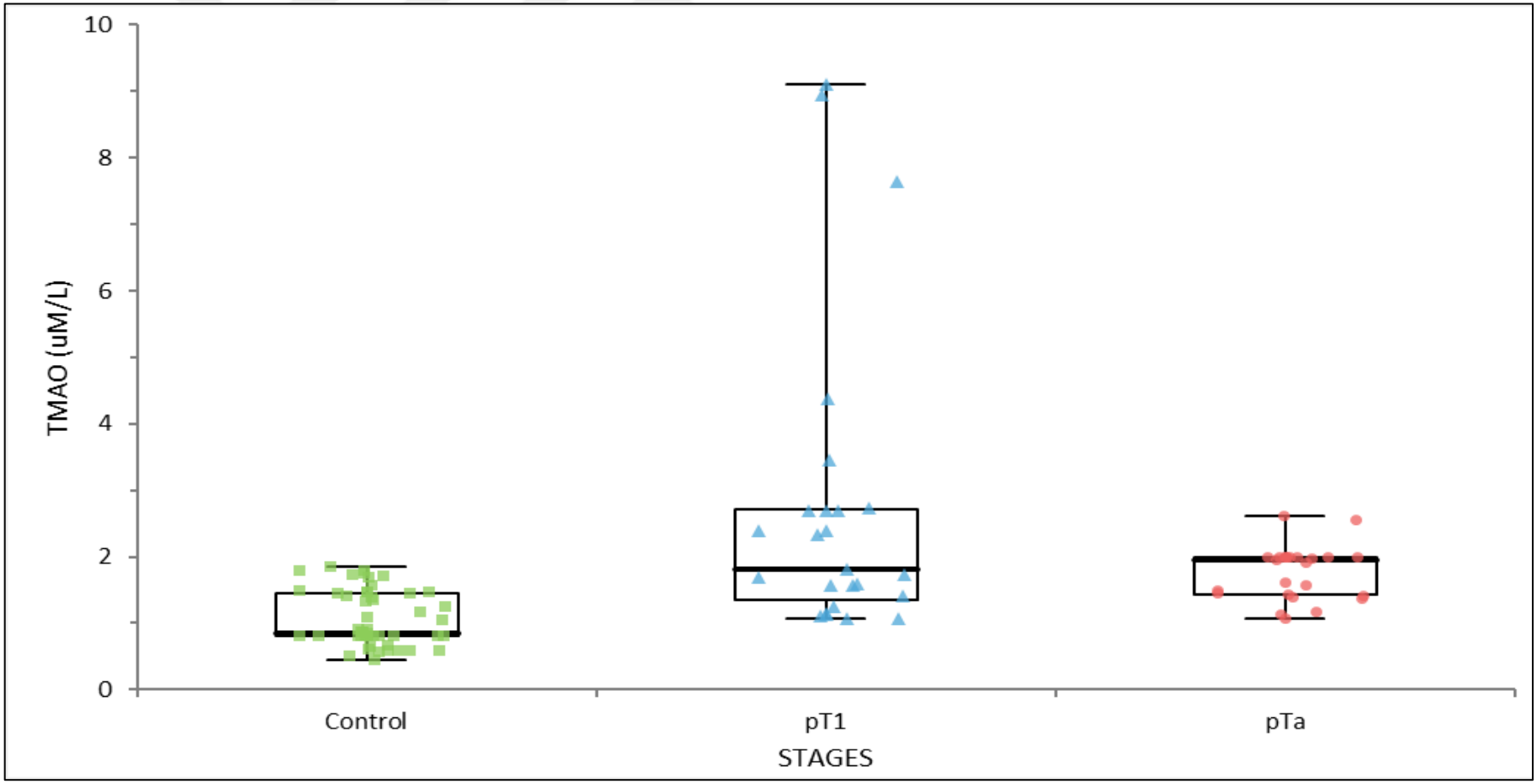
Şekil 8. Klinik gruba göre betain ve karnitinin serum konsantrasyonları (devam)

Sağlıklı kontrollerde (C, yeşil kareler), pT1 hastalarında (mavi üçgenler) ve pTa hastalarında (kırmızı daireler) serum seviyelerini gösteren bireysel veri noktalarına sahip kutu ve bıyık çizimleri. Kutular çeyrekler arası aralığı (IQR), yatay çizgiler medyanı ve bıyıklar 5.-95. persentilleri göstermektedir; semboller bireysel gözlemlere karşılık gelmektedir.

Karnitin düzeyleri de kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde yüksektir: kontrol grubunda 60,96 µM/L (IQR: 43,43–71,71) olan medyan düzey, pTa grubunda 92,69 µM/L (IQR: 77,79–102,40) ve pT1 grubunda 78,35 µM/L (IQR: 69,06–99,12) olarak belirlenmiştir. Kruskal–Wallis testi ile anlamlı fark saptanan metabolitler için post-hoc analiz olarak Mann–Whitney U testi uygulanmış ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılık gösteren tümör grupları Tablo 3'te yıldız işareti (*) ile gösterilmiştir.



Şekil 9. Klinik gruba göre TMAO ve kolinin serum konsantrasyonları



Şekil 9. Klinik gruba göre TMAO ve kolinin serum konsantrasyonları (devam)

Sağlıklı kontrollerde (C, yeşil kareler), pT1 hastalarında (mavi üçgenler) ve pTa hastalarında (kırmızı daireler) serum seviyelerini gösteren bireysel veri noktalarına sahip kutu ve bıyık çizimleri. Kutular çeyrekler arası aralığı (IQR), yatay çizgiler medyanı ve bıyıklar 5.-95. persentilleri göstermektedir; semboller bireysel gözlemlere karşılık gelmektedir.

En dikkat çekici bulgu, TMAO düzeylerindeki artıştır. Kontrol grubunda medyan TMAO düzeyi 0,85 µM/L (IQR: 0,80–1,45) iken, pTa ve pT1 gruplarında sırasıyla 1,95 µM/L (IQR: 1,42–2,00) ve 1,82 µM/L (IQR: 1,33–2,71) düzeylerine yükselmiş; her iki tümör grubunda da kontrol grubuna göre anlamlı fark gözlenmiştir. Benzer şekilde, kolin düzeyleri de tümör gruplarında belirgin olarak artmış; kontrol grubunda 57,52 µM/L (IQR: 38,39–65,38) olan medyan kolin düzeyi, pTa grubunda 98,83 µM/L (IQR: 65,74–164,93) ve pT1 grubunda 120,54 µM/L (IQR: 65,28–146,62) seviyelerine ulaşmıştır.

Genel olarak, elde edilen veriler TMAO, kolin ve karnitin düzeylerinin tümörlü bireylerde anlamlı düzeyde yükseldiğini ve bu metabolitlerin mesane kanseri ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu farklılıkların hem pTa hem de pT1 evrelerinde gözlenmesi, söz konusu metabolitlerin erken evre mesane kanserinde olası tanısal biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

4.3 Korelasyon Analizi

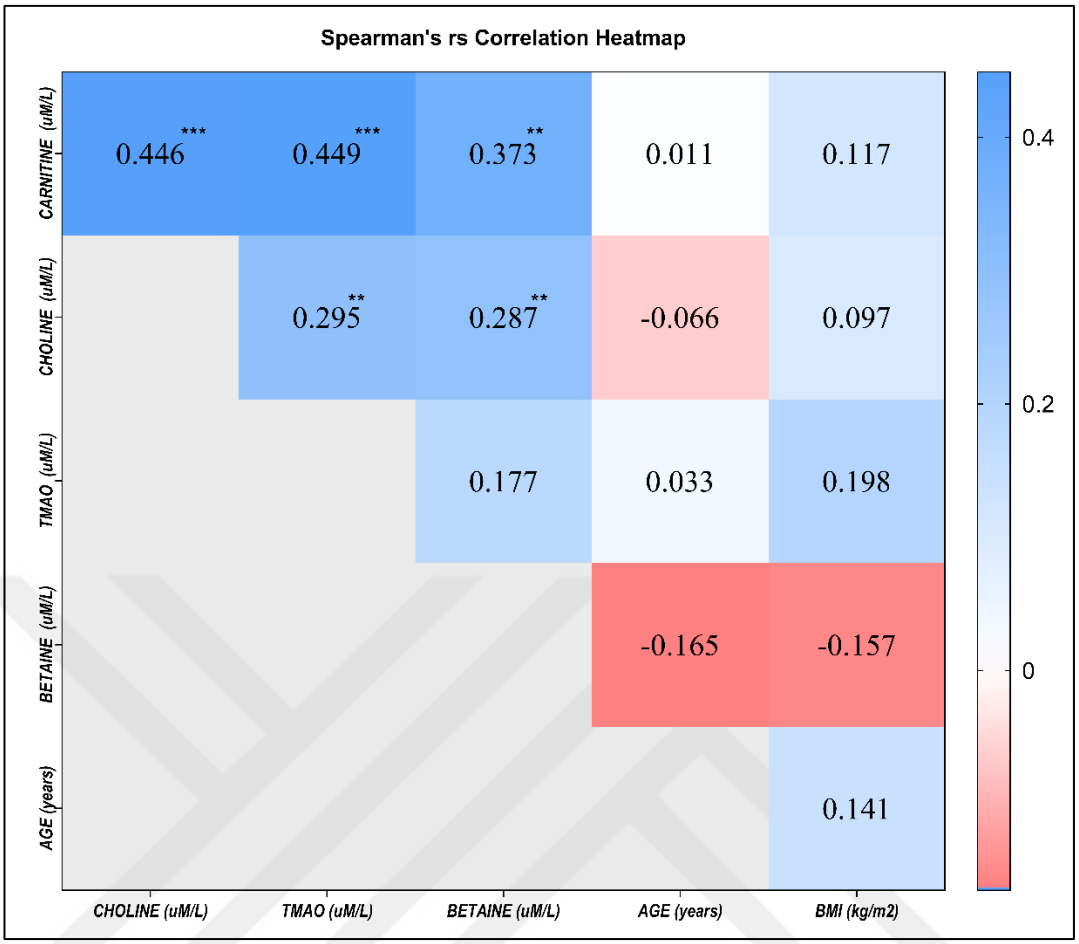
Serum metabolit düzeyleri ile yaş ve beden kitle indeksi (BMI) gibi klinik değişkenler arasındaki ilişkileri değerlendirmek amacıyla Spearman korelasyon analizi uygulanmıştır. Aynı zamanda metabolitler arasındaki karşılıklı ilişkiler de incelenmiştir. Korelasyon katsayıları (rs), %95 güven aralıkları ve p-değerleri Tablo 4'te sunulmuştur. Bulgular, Şekil Y'de heatmap formatında görselleştirilmiştir.

Tablo 4. Serum metabolitleri, evre, yaş, kilo, boy ve beden kitle indeksi arasındaki Spearman korelasyon katsayıları (rs) ve %95 güven aralıkları

	CARNITINE (µM/L)	*CHOLINE (µM/L)*	*TMAO (µM/L)*	*BETAINE (µM/L)*	*YAŞ (yıl)*	*p value*
CHOLINE (µM/L)	0,446 (0,270- 0,593)					<0,0001
TMAO (µM/L)	0,449 (0,273- 0,596)					<0,0001
		0,295 (0,101- 0,468)				0,0026
BETAINE (µM/L)	0,373 (0,186- 0,533)					0,0001
		0,287 (0,093- 0,461)				0,0034
			0,177 (-0,024- 0,367)			0,0748
YAŞ (yıl)	0,011 (-0,190- 0,210)					0,92
		-0,066 (-0,263- 0,135)				0,51
			0,033 (-0,168- 0,232)			0,74
				‘-0,165 (-0,353- 0,036)		0,10

Tablo 4. Serum metabolitleri, evre, yaş, kilo, boy ve beden kitle indeksi arasındaki Spearman korelasyon katsayıları (rs) ve %95 güven aralıkları (devam)

	CARNITINE (µM/L)	*CHOLINE (µM/L)*	*TMAO (µM/L)*	*BETAINE (µM/L)*	*YAŞ (yıl)*	*p value*
BMI (kg/m2)	0,117 (-0,085- 0,310)					0,24
		0,097 (-0,105- 0,291)				0,33
			0,198 (-0,002- 0,383)			0,05
				-0,157 (-0,346-0,045)		0,32
					0,141 (-0,061- 0,332)	0,16



Şekil 10. Spearman korelasyon analizine ait ısı haritası (heatmap)

Renk yoğunluğu korelasyon katsayısının büyüklüğünü temsil eder; koyu mavi tonlar güçlü pozitif korelasyonları, açık tonlar ise zayıf pozitif ya da negatif korelasyonları göstermektedir. Hücrelerde yer alan sayılar rs katsayılarını ifade etmektedir.

Spearman korelasyon analizi, özellikle karnitin, kolin ve TMAO arasında belirgin ve tutarlı ilişkiler olduğunu ortaya koymuştur. Karnitin düzeyleri, kolin (rs = 0,446; p < 0,0001), TMAO (rs = 0,449; p < 0,0001) ve betain (rs = 0,373; p = 0,0001) ile orta düzeyde pozitif korelasyon göstermiştir. Kolin, hem TMAO (rs = 0,295; p = 0,0026) hem betain (rs = 0,287; p = 0,0034) ile pozitif ilişkili bulunmuştur. Buna karşın TMAO ile betain arasındaki ilişki zayıf kalmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (rs = 0,177; p = 0,0748).

Demografik değişkenler açısından değerlendirildiğinde, yaşın hiçbir metabolit ile anlamlı korelasyon göstermemesi (p > 0,05), gözlenen metabolit değişimlerinin yaşın doğrudan bir yansıması olmadığını düşündürmektedir. BMI ile TMAO

arasındaki ilişki sınırda anlamlılık düzeyinde pozitif bir eğilim göstermektedir (rs = 0,198; p = 0,050), ancak diğer metabolitlerle anlamlı korelasyon saptanmamıştır.

Bu bulgular, özellikle karnitin, kolin ve TMAO'nun hem birbirleriyle yakın bağlantı içinde olduğunu; betainin ise daha zayıf ama yine de ilişkili bir metabolit olduğunu ortaya koymaktadır. Demografik parametrelerin büyük ölçüde metabolitlerle ilişkili olmaması, bu metabolitlerin mesane kanseri biyolojisiyle doğrudan ilişkili potansiyel biyobelirteçler olabileceğini desteklemektedir.

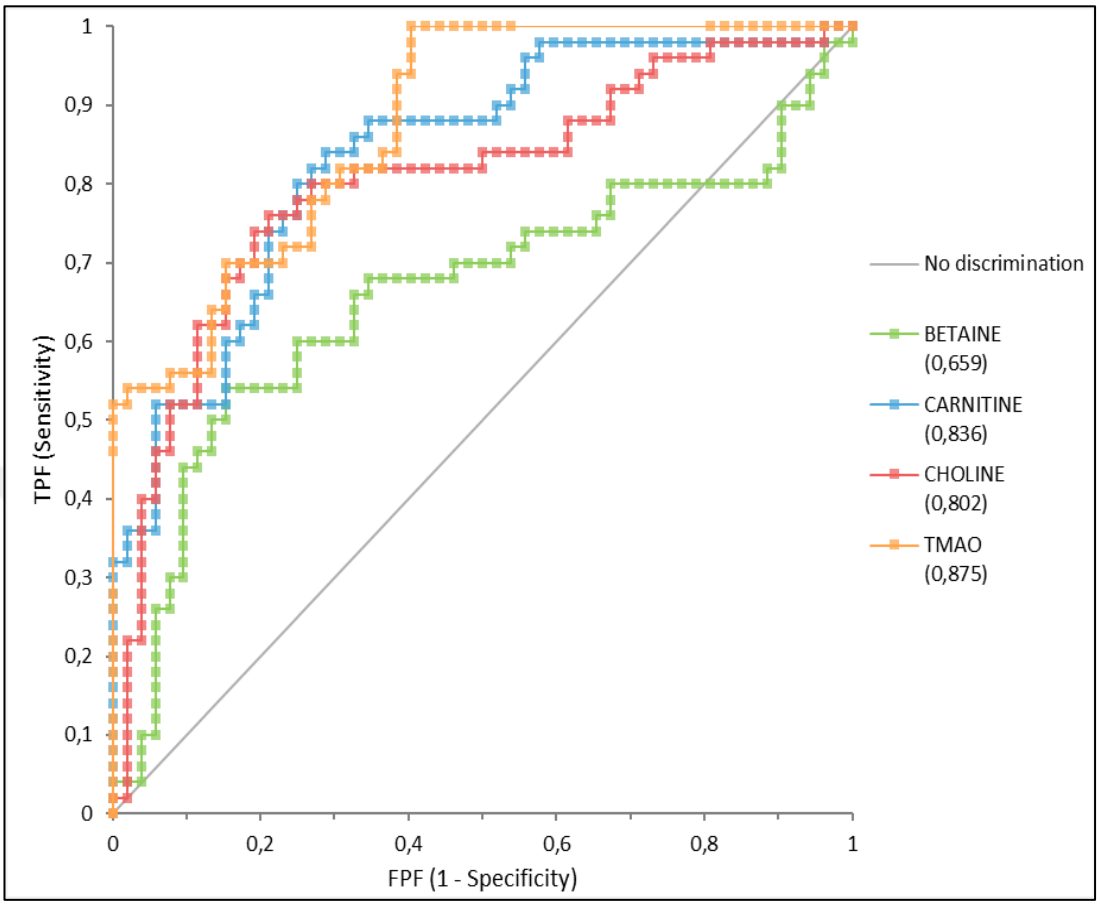
4.4 ROC Analizi ile Metabolitlerin Tanısal Performanslarının Değerlendirilmesi

Mesane kanseri hastalarını sağlıklı bireylerden ayırt etmede serum metabolitlerinin tanısal performanslarını değerlendirmek amacıyla ROC (Receiver Operating Characteristic) analizi uygulanmıştır. Bu analiz kapsamında her bir metabolit için eğri altındaki alan (AUC), cut-off değeri, duyarlılık (sensitivity), özgüllük (specificity) ve Youden indeksi hesaplanmıştır.

Cut-off değerleri, maksimum Youden indeksini sağlayan eşik noktalar esas alınarak belirlenmiş ve bu eşik değerler doğrultusunda metabolit düzeyleri binary (ikili) forma dönüştürülmüştür. Dönüştürülen veriler üzerinden gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek üzere Fisher'ın kesin testi (Fisher's Exact Test) uygulanmıştır.

ROC analizleri, metabolitlerin hem mesane kanseri varlığını belirlemedeki tanısal potansiyelini hem de tümör evreleri arasındaki ayrım gücünü değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda analizler; kontrol grubuna karşı tümörlü bireylerin genel olarak, ayrıca evre bazında pTa, pT1 ve pTa–pT1 gruplarının karşılaştırıldığı dört farklı düzeyde yapılmıştır. Elde edilen bulgular ilgili tablolar altında sunulmuş ve bilimsel olarak yorumlanmıştır.

4.4.1 Kontrol ve tümör (genel) grupları arasında Roc analizi



Şekil 11. Kontrol ve tüm mesane kanseri hasta grubu arasında betain, karnitin, kolin ve TMAO için ROC eğrileri

ROC analizi ile her bir biyobelirtecin hastalık tanısındaki ayırt edici gücü değerlendirilmiştir. Parantez içinde sunulan değerler, eğri altında kalan alanı (AUC) göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre, en yüksek tanısal performans TMAO'ya ait olup AUC değeri 0,875 olarak hesaplanmıştır. Bunu sırasıyla karnitin (AUC = 0,836), kolin (AUC = 0,802) ve betain (AUC = 0,659) izlemiştir.

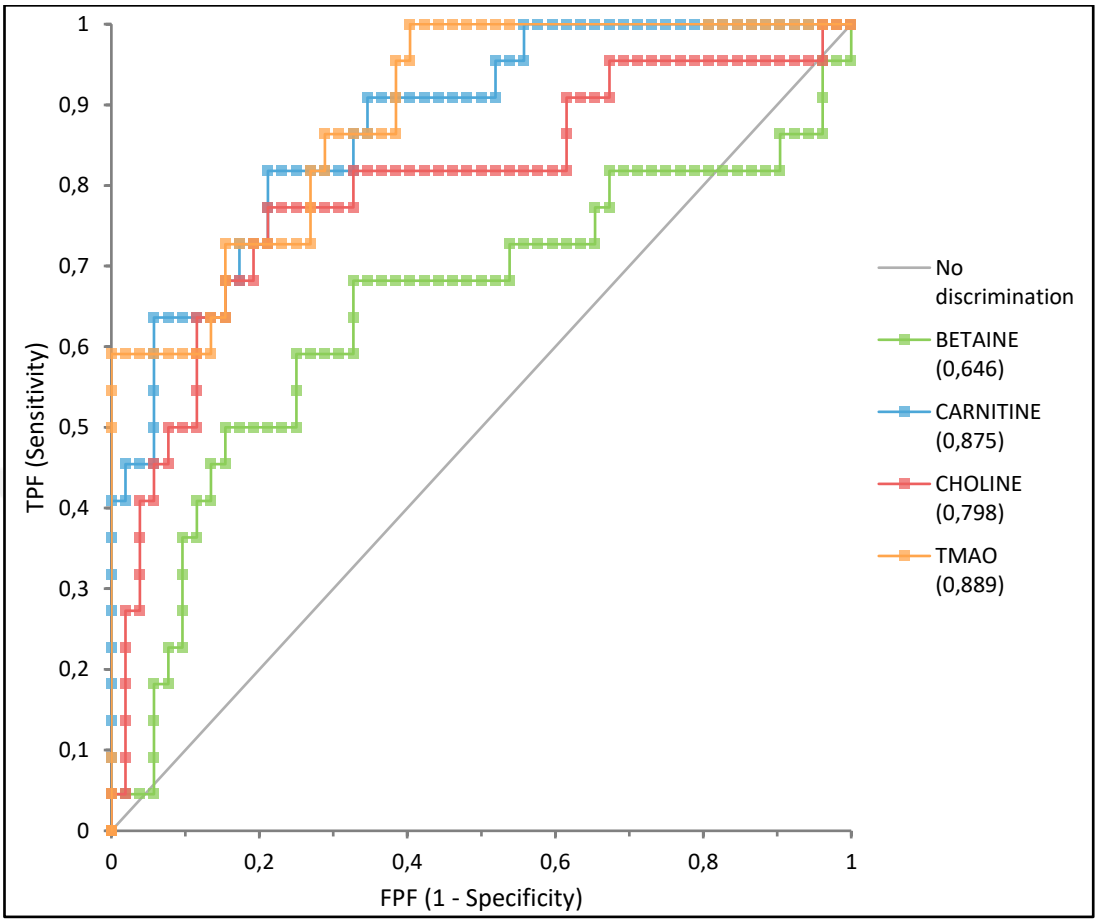
Tablo 5. Max Youden index'e göre belirlenen cut-off değerleri ile ROC analizi ve Fisher's Exact Test sonuçları (Kontrol vs Tümör Genel)

	AUC (95% CI)	Cut-off Value	Sensitivity	Specificity	Youden's index	p-value (Fisher test)
BETAINE (uM/L)	0.659 (0.548- 0.771)	23.44	0.540	0.846	0.386	<0.0001
CARNITINE (uM/L)	0.836 (0.759- 0.913)	66.07	0.840	0.712	0.552	<0.0001
CHOLINE (uM/L)	0.802 (0.714- 0.891)	67.34	0.760	0.788	0.548	<0.0001
TMAO (uM/L)	0.875 (0.812- 0.939)	1.06	1.000	0.596	0.596	<0.0001

Veriler ROC analizinden elde edilen en yüksek Youden index'e göre belirlenen cut-off noktalarına göre binary forma dönüştürülmüş ve gruplar arası karşılaştırmalar Fisher's Exact Test ile değerlendirilmiştir. AUC: Eğri altında kalan alan; CI: Güven aralığı. p<0,05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

ROC analizi sonuçlarına göre en yüksek tanısal performans TMAO için elde edilmiştir (AUC = 0,875; %95 CI: 0,812–0,939). Bu metabolit için belirlenen cut-off değeri 1,06 µM/L olup, bu eşik değerin üzerinde kalan tüm hastalar doğru şekilde tanımlanmış (%100 duyarlılık), özgüllük ise %59,6 bulunmuştur (Youden index = 0,596; p < 0,0001). Karnitin, 66,07 µM/L cut-off değeri ile %84 duyarlılık ve %71,2 özgüllük sağlamış; AUC değeri ise 0,836 olarak hesaplanmıştır (%95 CI: 0,759–0,913; p < 0,0001). Kolin, 67,34 µM/L cut-off ile %76 duyarlılık ve %78,8 özgüllük sağlayarak tanısal açıdan güçlü bir belirteç olarak öne çıkmıştır (AUC = 0,802; %95 CI: 0,714–0,891; p < 0,0001). Betain için AUC değeri 0,659 olup (%95 CI: 0,548–0,771, cut-off değeri 23,44 µM/L'de %54 duyarlılık ve %84,6 özgüllük ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Youden index = 0,386; p < 0,0001); ancak diğer metabolitlere kıyasla daha düşük bir ayırt edici güce sahiptir.

4.4.2 Kontrol ve pTa grupları arasında ROC analizi



Şekil 12. Kontrol ve pTa gruplarında betain, karnitin, kolin ve TMAO için ROC eğrileri

Parantez içinde sunulan değerler her bir biyobelirteç için eğri altında kalan alanı (AUC) göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek tanısal performans TMAO için gözlenmiş (AUC = 0,889), bunu sırasıyla karnitin (AUC = 0,875), kolin (AUC = 0,798) ve betain (AUC = 0,646) takip etmiştir.

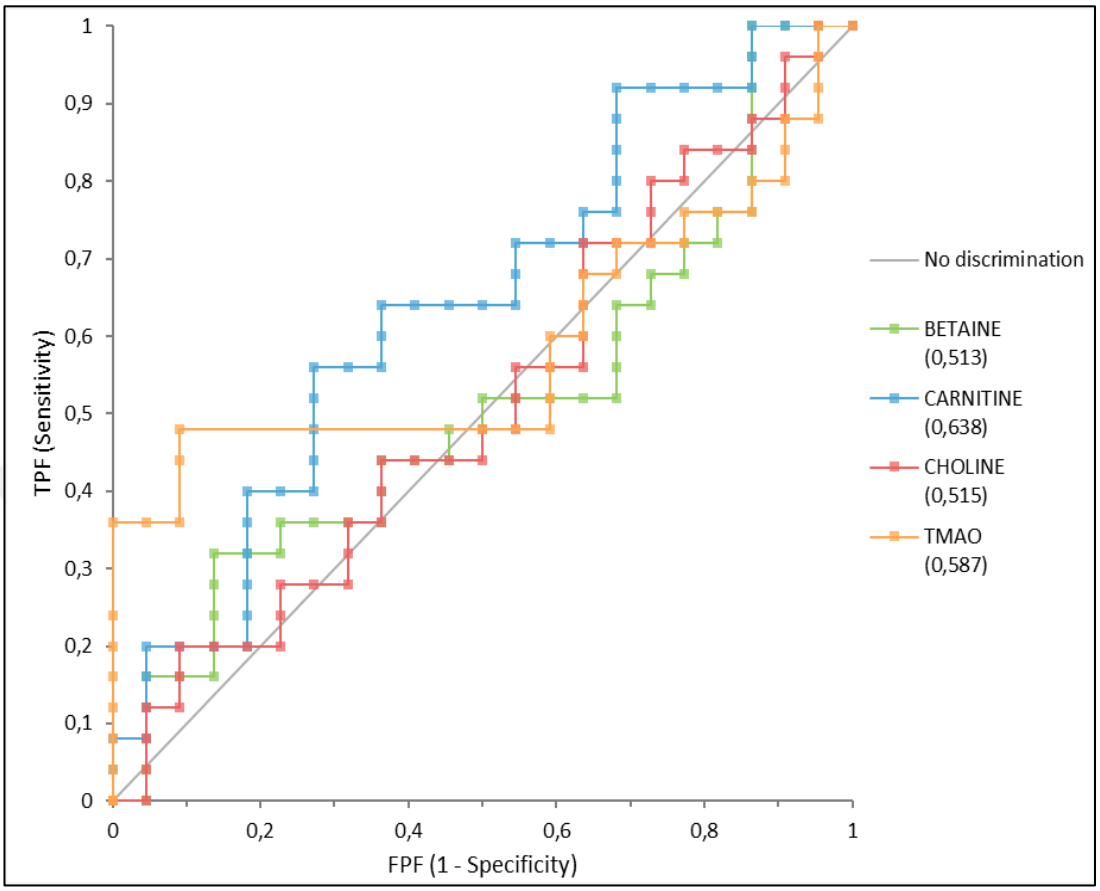
Tablo 6. Kontrol ve pTa gruplarında, maksimum Youden index'e göre belirlenen cut-off değerleri ile ROC analizi ve Fisher's Exact Test sonuçları

K-pTa	AUC (95% CI)	Cut-off Value	Sensitivity	Specificity	Youden's index	p-value (Fisher test)
BETAINE (uM/L)	0,646 (0,489- 0,803)	20,12	0,682	0,673	0,355	0,0094
CARNITINE (uM/L)	0,875 (0,791- 0,959)	73,85	0,818	0,788	0,607	<0,0001
CHOLINE (uM/L)	0,798 (0,675- 0,921)	67,34	0,773	0,788	0,561	<0,0001
TMAO (uM/L)	0,889 (0,813- 0,965)	1,06	1,000	0,596	0,596	<0,0001

Veriler, ROC analizinden elde edilen maksimum Youden index'e göre belirlenen cut-off noktalarına göre binary forma dönüştürülmüş ve gruplar arası karşılaştırmalar Fisher's Exact Test ile değerlendirilmiştir. AUC: Eğri altında kalan alan; CI: Güven aralığı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Kontrol ve pTa gruplarının karşılaştırıldığı ROC analizinde en yüksek tanısal performans TMAO için elde edilmiştir (AUC = 0,889; %95 CI: 0,813–0,965). TMAO için belirlenen cut-off değeri 1,06 µM/L olup, bu eşik değerde %100 duyarlılık ve %59,6 özgüllük sağlanmıştır (Youden index = 0,596; $p < 0,0001$). Karnitin, 73,85 µM/L cut-off değeri ile %81,8 duyarlılık ve %78,8 özgüllük göstermiştir (Youden index = 0,607; $p < 0,0001$) ve AUC değeri 0,875 (%95 CI: 0,791–0,959) ile yüksek ayırt edici güce ulaşmıştır. Kolin, 67,34 µM/L cut-off noktasında %77,3 duyarlılık ve %78,8 özgüllük sağlayarak anlamlı tanısal performans sunmuştur (Youden index = 0,561; AUC = 0,798; %95 CI: 0,675–0,921; $p < 0,0001$). Betain ise AUC değeri 0,646 (%95 CI: 0,489–0,803) ile diğer metabolitlere kıyasla daha düşük bir ayırt ediciliğe sahip olmasına rağmen, 20,12 µM/L cut-off noktasında %68,2 duyarlılık ve %67,3 özgüllük sunmuş (Youden index = 0,355; $p = 0,0094$) ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.4.3 Kontrol ve pT1 grupları arasında ROC analizi



Şekil 13. Kontrol ve pT1 gruplarında betain, karnitin, kolin ve TMAO için ROC eğrileri

Parantez içinde sunulan değerler, her bir biyobelirteç için eğri altında kalan alanı (AUC) göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek tanısal performans TMAO için gözlenmiş (AUC = 0,870), bunu sırasıyla kolin (AUC = 0,789), karnitin (AUC = 0,775) ve betain (AUC = 0,609) takip etmiştir.

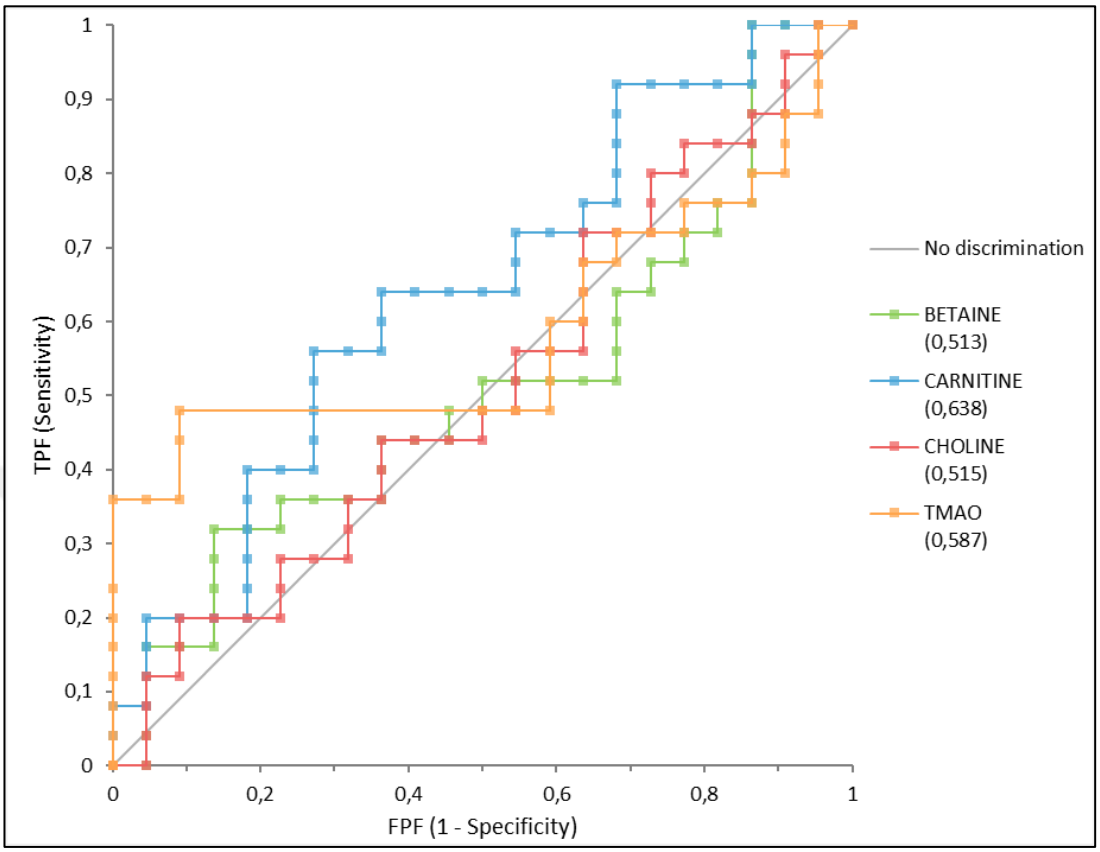
Tablo 7. Kontrol ve pT1 gruplarında, maksimum Youden index'e göre belirlenen cut-off değerleri ile ROC analizi ve Fisher's Exact Test sonuçları

K-pT1	AUC (95% CI)	Cut-off Value	Sensitivity	Specificity	Youden's index	p-value (Fisher test)
BETAINE (uM/L)	0,609 (0,453- 0,765)	27,65	0,440	0,904	0,344	0,0026
CARNITINE (uM/L)	0,775 (0,661- 0,888)	66,07	0,800	0,712	0,512	<0,0001
CHOLINE (uM/L)	0,789 (0,671- 0,908)	64,14	0,800	0,731	0,531	<0,0001
TMAO (uM/L)	0,870 (0,790- 0,950)	1,06	1,000	0,596	0,596	<0,0001

Veriler, ROC analizinden elde edilen maksimum Youden index'e göre belirlenen cut-off noktalarına göre binary forma dönüştürülmüş ve gruplar arası karşılaştırmalar Fisher's Exact Test ile değerlendirilmiştir. AUC: Eğri altında kalan alan; CI: Güven aralığı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Kontrol ve pT1 gruplarının karşılaştırıldığı ROC analizinde, en yüksek tanısal performans TMAO için elde edilmiştir (AUC = 0,870; %95 CI: 0,790–0,950). Bu metabolit için belirlenen cut-off değeri 1,06 µM/L olup, %100 duyarlılık ve %59,6 özgüllük sağlamıştır (Youden index = 0,596; $p < 0,0001$). Kolin, 64,14 µM/L cut-off değeri ile %80 duyarlılık ve %73,1 özgüllük sağlamış (Youden index = 0,531; AUC = 0,789; %95 CI: 0,671–0,908; $p < 0,0001$) ve güçlü tanısal ayırt edicilik göstermiştir. Karnitin, 66,07 µM/L cut-off noktasında %80 duyarlılık ve %71,2 özgüllük ile anlamlı ayırt edici performans sunmuştur (Youden index = 0,512; AUC = 0,775; %95 CI: 0,661–0,888; $p < 0,0001$). Betain, 27,65 µM/L cut-off noktasında %44 duyarlılık ve %90,4 özgüllük sağlamış (Youden index = 0,344; AUC = 0,609; %95 CI: 0,453–0,765; $p = 0,0026$) olmakla birlikte, diğer metabolitlere kıyasla daha sınırlı bir tanısal ayırt ediciliğe sahip bulunmuştur.

4.4.4 pTa ve pT1 grupları arasında ROC analizi



Şekil 14. pTa ve pT1 gruplarında betain, karnitin, kolin ve TMAO için ROC eğrileri

Parantez içinde verilen değerler her bir metabolit için eğri altında kalan alanı (AUC) göstermektedir. Elde edilen ROC analiz sonuçlarına göre, pTa ve pT1 evreleri arasında anlamlı bir tanısal ayrım sunabilen bir metabolit saptanmamıştır. En yüksek AUC değeri karnitin için elde edilmiş (AUC = 0,638), ancak bu da orta düzeyin altında kalmıştır.

Tablo 8. pTa ve pT1 gruplarında, maksimum Youden index'e göre belirlenen cut-off değerleri ile ROC analizi ve Fisher's Exact Test sonuçları

pTa-pT1	AUC (95% CI)	Cut-off Value	Sensitivity	Specificity	Youden's index	p-value (Fisher test)
BETAINE (uM/L)	0,513 (0,342- 0,684)	33,05	0,320	0,864	0,184	0,3314
CARNITINE (uM/L)	0,638 (0,476- 0,800)	79,47	0,560	0,727	0,287	0,1428
CHOLINE (uM/L)	0,515 (0,345- 0,684)	52,87	0,200	0,909	0,109	0,4227
TMAO (uM/L)	0,587 (0,415- 0,760)	2,00	0,480	0,909	0,389	1,0000

Veriler, ROC analizinden elde edilen maksimum Youden index'e göre belirlenen cut-off noktalarına göre binary forma dönüştürülmüş ve gruplar arası karşılaştırmalar Fisher's Exact Test ile değerlendirilmiştir. AUC: Eğri altında kalan alan; CI: Güven aralığı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

pTa ve pT1 grupları arasında yapılan ROC analizlerinde, değerlendirilen dört metabolit açısından istatistiksel olarak anlamlı bir tanısal ayrım elde edilememiştir. Karnitin, %56 duyarlılık ve %72,7 özgüllük ile en yüksek Youden index değerine (0,287) ulaşmış olmakla birlikte, AUC değeri 0,638 (%95 CI: 0,476–0,800; p = 0,1428) ile orta düzeyin altında kalmıştır. TMAO için belirlenen cut-off değeri 2,00 µM/L olup, %48 duyarlılık ve %90,9 özgüllük sağlamış (Youden index = 0,389), ancak AUC değeri 0,587 (%95 CI: 0,415–0,760) ile ve p-değeri 1,0000 olması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Betain ve kolin için elde edilen AUC değerleri sırasıyla 0,513 ve 0,515 olup, tanısal performans açısından yetersiz düzeydedir. Düşük duyarlılık ve yüksek özgüllük değerleri (özellikle kolin için %20 duyarlılık ve %90,9 özgüllük) bu metabolitlerin evre ayrımında klinik olarak anlamlı bir kullanım potansiyeline sahip olmadığını göstermektedir.

4.4.5 ROC analizlerinin genel değerlendirmesi

Tüm ROC analizleri birlikte değerlendirildiğinde, TMAO tümörlü bireyleri kontrol grubundan ayırt etmede en yüksek tanısal performansa sahip metabolit olarak öne çıkmıştır. Hem tümör genel grubunda hem de pTa ve pT1 alt evrelerinde,

kontrole kıyasla TMAO'nun AUC değerleri 0,87 civarında bulunmuş ve yüksek duyarlılıkla anlamlı özgüllük değerleri sağlamıştır**.** Karnitin ve kolin de benzer şekilde yüksek AUC değerleri ve dengeli duyarlılık–özgüllük profilleri ile güçlü biyobelirteç adayları olarak değerlendirilmiştir. Buna karşın, betain daha düşük AUC ve duyarlılık değerleri göstermiş, bu da tanısal gücünün sınırlı olabileceğini düşündürmektedir. Tümör alt evreleri arasındaki karşılaştırmada (pTa vs pT1) ise hiçbir metabolit istatistiksel olarak anlamlı bir ayırt edicilik sunamamış; bu durum, değerlendirdiğimiz metabolitlerin evreler arası farklılıktan ziyade tümör varlığına duyarlı olabileceğini göstermektedir.

4.5 Lojistik Regresyon Analizi

Bu bölümde, serum metabolit düzeylerinin mesane kanseri varlığı ve evreleriyle ilişkisini değerlendirmek amacıyla dört farklı lojistik regresyon modeli oluşturulmuştur: (1) Kontrol vs Tümör Genel, (2) Kontrol vs pTa, (3) Kontrol vs pT1 ve (4) pTa vs pT1. Her bir modelde bağımlı değişken olarak grup bilgisi (0 = kontrol, 1 = hasta) kullanılmış, bağımsız değişkenler ise betaine, carnitine, choline ve TMAO düzeyleridir.

4.5.1 Kontrol - tümör genel arasındaki lojistik regresyon analizi

Bu analiz, sağlıklı bireylerle tümör grubundaki (pTa + pT1 toplamı) hastalar arasında serum metabolit düzeylerine göre ayrım yapabilen prediktörleri belirlemeyi amaçlamaktadır. Uygulanan lojistik regresyon modeli istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Likelihood-ratio testi: $X^2(4) = 88.18$, $p < 0.0001$). Model denklemi aşağıda sunulmuştur:

Model eşitliği: logit (group 1) = –13.04 – 0.014 × Betaine + 0.07141 × Carnitine + 0.02485 × Choline + 4.115 × TMAO

Tablo 9. K-T genel regresyon modeline ait değişkenlerin katsayıları, anlamlılık düzeyleri ve odds ratio değerleri

Variable	Estimate (β)	p-value	Odds Ratio (95% CI)
BETAINE (uM/L)	–0.014	0.712	0.986 (0.915 – 1.062)
CARNITINE (uM/L)	0.07141	0.001	1.074 (1.027 – 1.123)
CHOLINE (uM/L)	0.02485	0.004	1.025 (1.008 – 1.043)
TMAO (uM/L)	4.115	0.000	61.23 (7.201 – 520.7)

Bu modele göre CARNITINE, CHOLINE ve özellikle TMAO düzeyleri, mesane kanseri hastaları ile sağlıklı bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ayrım sağlamaktadır. TMAO'nun oldukça yüksek odds oranı (61.23), bu metabolitin güçlü bir ayırt edici biyobelirteç olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, BETAINE düzeylerinin modelde anlamlı bir katkısı bulunmamıştır (p = 0.712).

4.5.2 Kontrol – Ta evresi arasındaki lojistik regresyon analizi

Bu analizde, sağlıklı bireylerle pTa evresindeki mesane kanseri hastaları arasında dört metabolitin (betaine, carnitine, choline, TMAO) ayırt edici gücü değerlendirildi. Lojistik regresyon modeli istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Likelihood-ratio testi: $X^2(4) = 60,17$, $p < 0,0001$). Model denklemi aşağıda sunulmuştur:

Model eşitliği: logit (group 2) = –16,22 – 0,001606 × BETAINE + 0,07638 × CARNITINE + 0,02282 × CHOLINE + 5,314 × TMAO

Tablo 10. K-Ta regresyon modeline ait değişkenlerin katsayıları, anlamlılık düzeyleri ve odds ratio değerleri

Variable	Estimate (β)	p-value	Odds Ratio (95% CI)
BETAINE (uM/L)	–0.001606	0.974	0.9984 (0.904 – 1.103)
CARNITINE (uM/L)	0.07638	0.018	1.079 (1.013 – 1.150)
CHOLINE (uM/L)	0.02282	0.015	1.023 (1.004 – 1.042)
TMAO (uM/L)	5.314	0.001	203.2 (7.277 – 5676)

Bu modele göre, betaine düzeylerinin anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır ($p = 0.9747$). Ancak carnitine, choline ve özellikle TMAO düzeyleri, kontrol ve pTa evresi arasındaki gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ayrım sağlamaktadır. TMAO'nun yüksek odds ratio değeri, bu metabolitin güçlü bir ayırt edici biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.

4.5.3 Kontrol – T1 grubu arasındaki lojistik regresyon analizi

Bumodel, sağlıklı bireyler ile T1 evresindeki mesane kanseri hastaları arasında serum metabolit düzeylerine göre ayrım yapabilen değişkenleri belirlemeyi hedeflemiştir. Uygulanan lojistik regresyon modeli istatistiksel olarak anlamlıdır (Likelihood-ratio testi: $X^2(4) = 55.89$, $p < 0.0001$). Model denklemi aşağıda sunulmuştur:

Model eşitliği: $\text{logit}(\text{group 3}) = -11.03 - 0.02048 \times \text{BETAINE} + 0.06102 \times \text{CARNITINE} + 0.01905 \times \text{CHOLINE} + 3.231 \times \text{TMAO}$

Tablo 11. K-T1 regresyon modeline ait değişkenlerin katsayıları, anlamlılık düzeyleri ve odds ratio değerleri

Variable	Estimate (β)	p-value	Odds Ratio (95% CI)
BETAINE (uM/L)	-0.02048	0.634	0.9797 (0.9004–1.066)
CARNITINE (uM/L)	0.06102	0.017	1.063 (1.011–1.118)
CHOLINE (uM/L)	0.01905	0.017	1.019 (1.003–1.035)
TMAO (uM/L)	3.231	0.001	25.31 (3.602–177.8)

Bu analizde, CARNITINE, CHOLINE ve TMAO düzeyleri, T1 evresindeki mesane kanseri hastalarını sağlıklı bireylerden ayırt etmede istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. TMAO'nun odds oranı 25.31 olup, hastalıkla güçlü bir ilişkiyi işaret etmektedir. Öte yandan, BETAINE bu modelde de anlamlı bir prediktör olarak ortaya çıkmamıştır (p = 0.6345).

4.5.4 Ta – T1 grubu arasındaki lojistik regresyon analizi

Bu model, mesane kanserinin Ta (non-invaziv) ve T1 (invaziv) evreleri arasındaki ayırt edici biyobelirteçleri belirlemeyi amaçlamaktadır. Lojistik regresyon modeli genel olarak anlamlı bulunmuştur (Likelihood-ratio testi: $X^2(4) = 9.91$, $p = 0.0420$). Modelin tahmin denklemi aşağıda verilmiştir:

Model eşitliği: logit(group 4) = 1.665 + 0.02865 × BETAINE – 0.03520 × CARNITINE – 0.002503 × CHOLINE + 0.5562 × TMAO

Tablo 12. Ta–T1 regresyon modeline ait değişkenlerin katsayıları, anlamlılık düzeyleri ve odds ratio değerleri

Variable	Estimate (β)	p-value	Odds Ratio (95% CI)
BETAINE (uM/L)	0.02865	0.366	1.029 (0.967 – 1.095)
CARNITINE (uM/L)	-0.03520	0.052	0.965 (0.9317 – 1.000)
CHOLINE (uM/L)	-0.002503	0.525	0.998 (0.9898 – 1.005)
TMAO (uM/L)	0.5562	0.142	1.744 (0.8300 – 3.665)

Ta ile T1 evresi arasında yapılan bu karşılaştırmada, hiçbir metabolit düzeyi istatistiksel anlamda anlamlı prediktör olarak öne çıkmamıştır. Ancak CARNITINE düzeyi sınırda anlamlılık göstermiştir ($p = 0.052$) ve negatif β katsayısı, T1 evresine geçişte bu metabolitin düzeyinde azalma eğilimini düşündürmektedir. TMAO odds oranı açısından görece yüksek olmasına rağmen (OR = 1.744), istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.5.5 Tüm lojistik regresyon modellerinin genel değerlendirmesi

Dört ayrı lojistik regresyon modeli kapsamında yapılan analizler, serum düzeyleri ölçülen dört metabolitin (karnitin, kolin, TMAO ve betain) mesane kanserinin varlığı ve evreleriyle ilişkili olarak farklı değerler sergilediğini ortaya koymuştur. Kontrol grubu ile tümörlü bireylerin birlikte değerlendirildiği modelde TMAO, son derece yüksek odds oranıyla (OR = 61.23) en güçlü ayırt edici biyobelirteç olarak öne çıkmış; karnitin ve kolin de anlamlı prediktörler arasında yer almıştır. Ta ve T1 evreleri ile kontrol grubunun karşılaştırıldığı modellerde de benzer şekilde TMAO, karnitin ve kolin, özellikle Ta evresinde yüksek tanısal performans göstermiştir. Ancak Ta ile T1 evresi arasındaki karşılaştırmada hiçbir metabolitin anlamlı ayırt edici gücü bulunmamıştır; yalnızca karnitin düzeyi sınırda anlamlılık göstermiştir ($p = 0.052$). Bu bulgular, söz konusu metabolitlerin özellikle sağlıklı bireylerle tümörlü hastaların ayırt edilmesinde ve erken evre hastalıkların

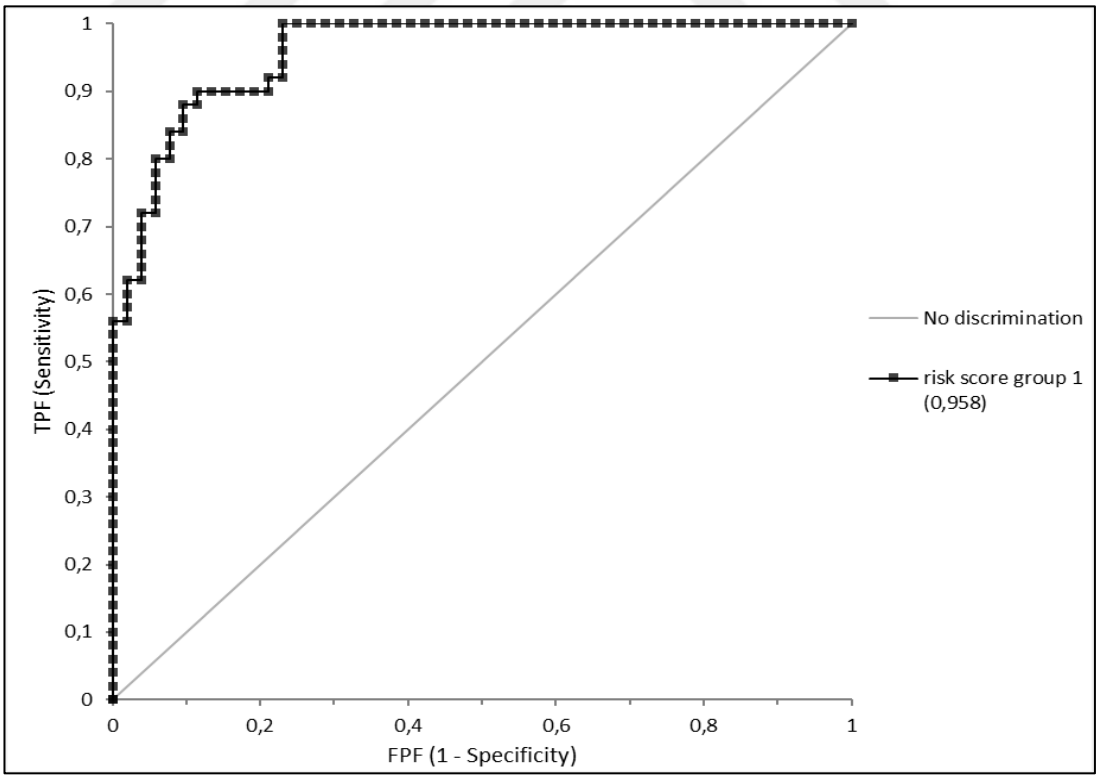
belirlenmesinde güçlü biyobelirteç adayları olduğunu; ancak tümör progresyonunu evreler arasında net biçimde yansıtmakta sınırlı kaldıklarını düşündürmektedir.

4.6 Risk Skoru Tabanlı Tanısal Performans Analizi

4.6.1 Risk skorunun hesaplanması

Çalışmada elde edilen dört ayrı lojistik regresyon modeline ait logit denklemleri kullanılarak her birey için risk skorları hesaplanmıştır. Bu skorlar, betimsel amaçla ROC eğrisi altında tanısal ayırt edicilik gücünü değerlendirmek ve binary sınıflandırmaya olanak tanımak amacıyla kullanılmıştır. Örnek olarak genel modelin denklemi şu şekildedir: $logit\ (group\ 1) = -13.04 - 0.014 \times Betaine + 0.07141 \times Carnitine + 0.02485 \times Choline + 4.115 \times TMAO.$

Aynı yaklaşım K-pTa, K-pT1 ve pTa-pT1 modelleri için de uygulanmıştır.



Şekil 15. Erken evre mesane kanserini (pTa + pT1) sağlıklı kontrollerden ayırt etmeye yönelik bileşik risk skoruna ait alıcı işletim karakteristiği (ROC) eğrisi.

4.6.2 ROC analizi ile risk skorunun değerlendirilmesi

Risk skorlarının tanısal doğruluğunu değerlendirmek için ROC analizi yapılmış ve AUC, cut-off, duyarlılık, özgüllük ve Youden indeksi değerleri hesaplanmıştır. Bulgular aşağıdaki Tablo 13'te sunulmuştur.

Tablo 13. Risk skorlarına dayalı ROC analizi sonuçları

Risk Score	AUC (95% CI)	Cut-off Value	Sensitivity	Specificity	Youden's index	p-value (Fisher test)
K-Tgenel	0,958 (0,926- 0,991)	12,86	0,90	0,89	0,785	<0,0001
K-pTa	0,968 (0,935- 1,001)	14,64	0,95	0,88	0,839	<0,0001
K-pT1	0,946 (0,901- 0,991)	9,03	1	0,73	0,731	<0,0001
pTa-pT1	0,733 (0,589- 0,876)	-1,5	0,6	0,77	0,373	0,0394

4.6.3 Genel yorum

Lojistik regresyon denklemlerinden hesaplanan risk skorları, özellikle K-pTa ve K-T genel modellerinde çok yüksek AUC ve Youden index değerleriyle dikkat çekmektedir. Bu, oluşturulan metabolit panelinin güçlü bir ayırt edici potansiyel sunduğunu göstermektedir. K-pT1 modelinde de yüksek duyarlılık sağlanırken; pTa-pT1 modeli diğerlerine kıyasla daha düşük performans göstermiştir, bu durum alt evre ayrımında risk skorlarının sınırlı olabilirliğini işaret etmektedir. Tüm modellerde Fisher's Exact Test sonuçlarının anlamlı çıkması, risk skorlarının gruplar arasında güçlü bir ayrım gücüne sahip olduğunu desteklemektedir.

5 TARTIŞMA

5.1 TMAO’nun Kanser Gelişimi ve Tümör Mikrosistemine Etkileri

Trimethylamine N-oxide (TMAO), kolin, betain ve karnitin gibi besinsel öncüllerin bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilmesiyle sentezlenen, dolaşımda saptanabilen bir metabolittir. Özellikle bağırsak mikrobiyotasının yapısal ve fonksiyonel özelliklerine bağlı olarak değişkenlik gösteren TMAO düzeylerinin, son yıllarda yalnızca kardiyovasküler hastalıklarla değil, çeşitli kanser türleriyle de ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Kolorektal, prostat, karaciğer ve pankreas kanserlerine yönelik yapılan çok merkezli çalışmalar ve meta-analizler, plazma TMAO seviyelerinin yüksek olmasının bu kanser türlerinin gelişimiyle anlamlı şekilde bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur (36,40,58,58–60).

Bu ilişki, büyük oranda TMAO’nun inflamatuvar yanıtları tetiklemesi, hücresel proliferasyonu desteklemesi ve anjiyogenez gibi tümör mikrosistemini yeniden şekillendiren moleküler yolları aktive etmesiyle açıklanmaktadır (39,41). Özellikle kolorektal kanser hücrelerinde, TMAO'nun vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu artırarak angiogenik kapasiteyi güçlendirdiği ve bu sayede tümör büyümesini desteklediği gösterilmiştir (41). Diğer taraftan, integrin-linked kinase (ILK) gibi tümör hücre hareketliliği ve invazyonuyla ilişkili proteinlerin TMAO varlığında yukarı regüle olması, bu metabolitin metastatik potansiyele de katkı sağlayabileceğini göstermektedir (61). TMAO'nun neden olduğu reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi ise DNA hasarı yoluyla genomik instabiliteyi tetiklemekte, böylece karsinogenez sürecini desteklemektedir.

Kendi çalışmamızda da, TMAO’nun mesane kanseri tanısında anlamlı düzeyde artış gösterdiği ve özellikle kontrol grubuna kıyasla pTa ve pT1 evrelerinde ayırt edici güce sahip olduğu gözlemlenmiştir. ROC analizlerinde TMAO, AUC: 0.870 ile en yüksek tanısal performansı göstermiş; %100 duyarlılık ve %59.6 özgüllük değerleri ile erken evredeki tümörleri tanımada potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir. Bu bulgu, TMAO’nun yalnızca bir risk faktörü değil, aynı

zamanda non-invaziv tanıda kullanılabilecek bir metabolit olduğunu desteklemektedir.

Ayrıca literatürdeki bazı bulgular, TMAO'nun sadece inflamatuvar sitokinlerin (örneğin IL-6, TNF-α) artışını tetiklemekle kalmadığını, aynı zamanda bağışıklık yanıtını yeniden şekillendirerek bağışıklık sisteminden kaçışı kolaylaştırabileceğini ileri sürmektedir (38). Örneğin, Mirji et al. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, TMAO düzeylerinin pankreas kanseri modelinde immün kontrol noktası inhibitörlerine karşı yanıtı etkileyebileceği ve bu yolla tümör-immün sistem etkileşimini modüle edebileceği gösterilmiştir (62).

Bağırsak mikrobiyotasının TMAO üretimi üzerindeki belirleyici rolü göz önünde bulundurulduğunda, mikrobiyotadaki disbiyozis durumu da dolaylı olarak kanser riskine katkı sağlayabilmektedir. Disbiyotik mikroflora profilleri, TMA üretiminde artışa yol açarak TMAO düzeylerini yükseltebilir ve bu da inflamasyon döngüsünü besleyerek tümöral progresyonu kolaylaştırabilir (63,64).

Özetle, hem mevcut çalışmamız hem de literatürdeki kanıtlar, TMAO'nun yalnızca bir metabolik yan ürün değil, aynı zamanda tümör gelişimini tetikleyen ve ilerleten çok yönlü bir biyolojik düzenleyici olduğunu göstermektedir. Özellikle mesane kanseri gibi inflamasyon ve metabolizma ile yakından ilişkili kanserlerde, TMAO'nun serum düzeylerinin değerlendirilmesi, erken tanı ve evreleme açısından umut vadeden bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

5.2 Karnitin, Kolin ve Betaine'in Kanserle İlişkisi ve Tanısal Potansiyeli

5.2.1 Karnitin

Karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri içine taşınmasında kritik görev üstlenen ve enerji metabolizmasının temel bir bileşeni olan bir moleküldür. Kanser hücrelerinde enerji ihtiyacının artması, karnitin metabolizmasını doğrudan etkileyebilir. Çeşitli çalışmalar, karnitin düzeylerinin farklı kanser türlerinde

değişkenlik gösterdiğini bildirmiştir. Bazı çalışmalarda kanserli bireylerde karnitin eksikliği gözlenirken (57,65), özellikle hepatoselüler karsinomda CRIP1 gibi moleküler yolların karnitin metabolizmasını baskılayarak kök hücre benzeri özellikleri artırabileceği saptanmıştır (66).

Kendi çalışmamızda ise karnitin, ROC analizlerinde hem Kontrol-Tümör genel grubunda hem de K-pTa ve K-pT1 karşılaştırmalarında anlamlı tanısal güce sahip olmuş; duyarlılık ve özgüllük açısından yüksek performans sergilemiştir. Lojistik regresyon analizlerinde de istatistiksel olarak anlamlı β katsayılarına ulaşmış ve tümör grubunu ayırt etmede önemli bir prediktör olarak öne çıkmıştır. Bu bulgular, karnitinin mesane tümörlerinde metabolik yeniden programlamaya bağlı olarak anlamlı düzeyde yükseldiğini ve tanısal değer taşıyabileceğini düşündürmektedir.

5.2.2 Kolin

Kolin, fosfatidilkolin sentezi yoluyla hücre zarının yapı taşı olan fosfolipidlerin üretiminde merkezi rol oynar. Kolin kinaz-α (CHKA) enzim aktivitesinin artışı, kolin metabolizmasının hızlanmasına ve bu yolla tümör hücrelerinin proliferatif kapasitesinin artmasına neden olmaktadır (67). Bu durum, özellikle kolin türevlerinin tümör agresifliğiyle ilişkili olduğu meme, karaciğer ve pankreas kanserlerinde gösterilmiştir (37,40,60). Prostat kanseri gibi bazı malignitelerde ise kolin PET görüntülemesi, yeniden evrelemede etkili bulunmuştur (68,69). Çalışmamızda kolin, ROC analizlerinde yüksek AUC değerleri ve dengeli duyarlılık/özgüllük oranları ile dikkat çekmiş; özellikle K-pT1 ve K-pTa karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı prediktörlerden biri olmuştur. Bu bulgular, kolin metabolizmasındaki hızlanmanın mesane kanseri hücrelerinin büyüme gereksinimiyle ilişkili olabileceğini ve bu molekülün tanısal potansiyel taşıdığını göstermektedir.

5.2.3 Betaine

Betaine, homosistein metabolizmasında metil donörü olarak görev yapar ve bu özelliğiyle DNA metilasyonu ve epigenetik regülasyon süreçlerinde rol alır (70,71).

Betaine'in, S-adenosilmetiyonin (SAM) yoluyla DNA ve histon metilasyonunu etkileyerek tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu düzenleyebileceği gösterilmiştir (53). Özellikle gastrointestinal kanserlerde, betaine düzeylerinin değişimi ile epigenetik bozulmalar arasında ilişki bildirilmiştir (54,55).

Ancak, çalışmamızda betaine'in ROC analizlerindeki AUC değerleri diğer metabolitlere göre daha düşük kalmış; duyarlılık ve özgüllük oranları da sınırlı olmuştur. Regresyon analizlerinde de anlamlılık düzeyine ulaşamayan betainin, mesane tümörü biyolojisinde daha dolaylı veya epigenetik temelli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Literatürde de betainin tanı biyobelirteci olarak kullanımına dair veriler oldukça sınırlıdır (45,72).

5.3 Mevcut Tanı Yöntemleriyle Karşılaştırma ve Klinik Potansiyel

Günümüzde mesane kanseri tanısında altın standart yöntemler arasında sistoskopi ve idrar sitolojisi yer almaktadır. Sistoskopi, invaziv bir yöntem olması, maliyetli oluşu ve hasta konforunu azaltması gibi nedenlerle özellikle takip süreçlerinde sınırlılıklar barındırmaktadır. İdrar sitolojisi ise yüksek özgüllüğe sahip olsa da, özellikle düşük dereceli tümörlerde duyarlılığı oldukça düşüktür (yaklaşık %48), bu da erken tanıda önemli bir boşluk oluşturmaktadır (6). Bu bağlamda, non-invaziv, güvenilir ve klinikte kolay uygulanabilir biyobelirteçlere olan ihtiyaç güncelliğini korumaktadır.

Bu tez çalışmasında, serum örneklerinde mikrobiyota kaynaklı dört metabolitin (Carnitine, Choline, TMAO, Betaine) ROC analizleri yapılmış ve tanısal performansları değerlendirilmiştir. Ayrıca bu dört biyobelirteç ile oluşturulan risk skor modeli de ayrı olarak analiz edilmiştir. Aşağıdaki tablo, bu çalışmanın bulgularını mevcut literatürde kullanılan bazı onaylı biyobelirteçlerle karşılaştırmalı olarak sunmaktadır.

Tablo 14. Mevcut mesane kanseri tanı yöntemlerinin klinik özellikleri ve çalışmamızla kıyaslaması

Test / Biyobelirteç	**Sensitivity**	**Specificity**	**Örnek Türü**	**Kaynak**
İdrar Sitolojisi	~0.48	~0.86	İdrar	Babjuk et al., 2022(6)
NMP22 (BladderChek®)	~0.56	~0.88	İdrar	Wang, Z. et al., 2017(73)
UroVysion™	~0.77	~0.98	İdrar	Ke, C. et al., 2022(74)
Cxbladder	~0.77	~0.94	İdrar (mRNA)	Oyaert M et al., 2025(8)
BTA stat® Test	~0.62	~0.52	İdrar	Thorsten H. Et al., 2025(75)
TMAO (µM/L)	1.00	0.60	Serum	Bu tez çalışması
Carnitine (µM/L)	0.84	0.71	Serum	Bu tez çalışması
Choline (µM/L)	0.76	0.78	Serum	Bu tez çalışması
Risk Skoru	0.90	0.89	Serum	Bu tez çalışması

Not: Bu bulgular, mevcut çalışmada control vs tümor genel karşılaştırmasından elde edilen duyarlılık ve özgüllük oranları üzerinden yapılmıştır.

Yukarıdaki karşılaştırmada da görüldüğü üzere, çalışmamızda değerlendirilen karnitin, kolin ve TMAO gibi mikrobiyota kaynaklı metabolitlerin tanısal performansları, literatürde onay almış bazı idrara dayalı testlerle benzer veya daha yüksek düzeydedir. Özellikle Carnitine, hem tümör genel grubunda hem de erken evre pTa grubunda dikkate değer sonuçlar vermiştir. K-pTa karşılaştırmasında Carnitine için AUC 0.884, duyarlılık %85.1, özgüllük %81.8 ve Youden indeksi 0.669 olarak hesaplanmıştır. Bu oranlar, NMP22 ya da BTA stat gibi onaylı testlerin bildirilen %50–80 aralığındaki duyarlılık ve %70–90 aralığındaki özgüllük değerleriyle kıyaslandığında umut verici bir düzeydedir.

Choline ise K-pTa karşılaştırması sonucunda %77.3 duyarlılık ve %78.8 özgüllük ile non-invaziv evrelerin (özellikle pTa) belirlenmesinde potansiyel sunmaktadır. K-pTa karşılaştırmasında, TMAO'nun AUC değeri 0.889 olup %100 duyarlılık sağlamış ancak özgüllük oranı %59.6'da kalmıştır. Yine de inflamasyon, oksidatif stres ve tümör progresyonundaki biyolojik rolü düşünüldüğünde, orta düzeydeki ayırt ediciliğine rağmen anlamlı bir biyobelirteç adayı olarak değerlendirilmiştir. Betaine, bu çalışmada istatistiksel olarak en düşük performansı göstermiştir ve tek başına tanıda güçlü bir aday olmadığını göstermiştir.

Dört metabolitin bir araya getirilmesiyle oluşturulan risk skor modeli ise bireysel biyobelirteçlerden daha yüksek tanısal güce ulaşmıştır. Tümör genel grubunda AUC: 0.958, duyarlılık: %90 ve özgüllük: %89 gibi yüksek performans değerleri elde edilmiştir. Bu durum, çoklu biyobelirteç panelinin özellikle erken tanı ve hasta izleminde önemli katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Özellikle vurgulanması gereken bir diğer nokta, bu verilerin yalnızca 102 bireyden (52 kontrol ve 50 hasta) elde edilmiş olmasıdır. Buna rağmen tanısal performansların güçlü çıkması, bu panelin daha geniş ve çok merkezli hasta gruplarında test edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, serum temelli bu biyobelirteç panelinin:

- Erken evre (non-invaziv) tümörlerin tanısına,
- Takip süreçlerinde invaziv testlere alternatif geliştirilmesine,
- Risk skoru hesaplamalarıyla bireyselleştirilmiş tanı yaklaşımlarına,

klinik olarak katkı sunabileceği düşünülmektedir. Ancak bu potansiyelin doğrulanması için prospektif, çok merkezli ve yüksek örneklemli klinik çalışmalarla destenlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

5.4 Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışma, mesane kanserinin erken evrelerinin tanısında kullanılabilecek yeni metabolit biyobelirteçlerin belirlenmesine yönelik önemli **ön bulgular** sunmakla birlikte, bazı sınırlılıkların da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. İlk olarak, örneklem büyüklüğü görece sınırlıdır; toplamda 50 hasta ve 52 sağlıklı bireyden elde edilen verilerle analiz yapılmıştır. Bu durum, özellikle evreler arası karşılaştırmalarda istatistiksel gücün kısıtlı olmasına yol açmış olabilir ve bazı alt grup analizlerinin (örneğin pTa–pT1 karşılaştırmaları gibi) anlamlı sonuçlar vermesini engellemiş olabileceği düşünülmektedir.

İkinci olarak, çalışmada yalnızca erkek bireyler değerlendirilmiştir. Oysa mesane kanseri, cinsiyetler arasında farklı prevalans, klinik seyir ve moleküler profil gösterebilmektedir. Bu nedenle, elde edilen sonuçların kadın bireyler için doğrudan genellenmesi mümkün görünmemektedir. Gelecek çalışmalarda cinsiyet dengesi gözetilerek daha kapsayıcı veri elde edilmesinin, bulguların genellenebilirliğini artırabileceği düşünülmektedir.

Üçüncü olarak, bu çalışma kesitsel bir tasarıma sahiptir ve metabolit düzeylerinin zaman içindeki değişimini veya hastalık progresyonu ile ilişkisini doğrudan değerlendirmemektedir. Longitudinal takip içeren bir tasarımın, bu biyobelirteçlerin prognoz öngörüsü veya tedavi yanıtındaki değişim gibi

parametrelerdeki potansiyelini daha iyi ortaya koymaya katkı sağlayabileceği değerlendirilmektedir.

Ayrıca, değerlendirmeye alınan metabolitlerin düzeylerini etkileyebilecek beslenme alışkanlıkları, mikrobiyota kompozisyonu, metabolik hastalıklar gibi bireysel faktörler bu çalışmada tam olarak kontrol altına alınamamıştır. Özellikle TMAO gibi mikrobiyota kaynaklı metabolitlerde bu faktörlerin belirleyici olabileceği göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen sonuçların bu olası karıştırıcı değişkenlerden etkilenmiş olabileceği akılda tutulmalıdır. Bu nedenle, ileri çalışmalarda diyet, komorbidite ve mikrobiyota profili gibi değişkenlerin de sistematik biçimde dikkate alınmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Son olarak, bu çalışmada analizler yalnızca serum örnekleri ile sınırlı kalmıştır. Aynı metabolit panelinin idrar bazlı analizlerde de test edilmesinin, özellikle mesane kanseri gibi üriner sistem hastalıklarında potansiyel tanı performansını güçlendirebilecek ek bilgiler sağlayabileceği değerlendirilmektedir.

5.5 Gelecek Çalışmalar için Öneriler

Bu çalışmada elde edilen bulgular, TMAO ve öncül metabolitlerinin (karnitin, kolin ve betain) mesane kanseri tanısında potansiyel biyobelirteç adayları olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, bu ön bulguların daha geniş kapsamlı ve metodolojik açıdan çeşitlendirilmiş çalışmalarda doğrulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Gelecek çalışmalarda aşağıdaki önerilerin dikkate alınmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

5.5.1 Geniş ve çeşitli kohortlarda doğrulama

Farklı yaş gruplarından, cinsiyetlerden ve etnik kökenlerden bireyleri kapsayan çok merkezli çalışmalarla, biyobelirteçlerin tanısal gücünün daha güvenilir şekilde değerlendirilmesi mümkün olabilir. Ayrıca hasta sayısının artırılması, evreler arası

karşılaştırmalarda istatistiksel gücü yükselterek daha tutarlı ve anlamlı sonuçların elde edilmesine katkı sağlayabilir.

5.5.2 İdrar temelli metabolit analizleri

Serum yerine veya serumla birlikte idrar örneklerinin kullanılması, özellikle mesane kanseri gibi üriner sistem hastalıklarında daha uygun ve non-invaziv bir yaklaşım olarak değerlendirilebilir. İdrarda TMAO ve öncüllerinin düzeyleri ile serum düzeylerinin karşılaştırılması, tanısal doğruluk ve klinik uygulanabilirlik açısından ek bilgi sağlayabilir.

5.5.3 Mikrobiyota analizleri ile entegrasyon

TMAO'nun oluşumunda bağırsak mikrobiyotasının rolü göz önüne alındığında, 16S rRNA veya metagenomik analizlerle mikrobiyal kompozisyonun değerlendirilmesi, hastalığa özgü olabilecek mikrobiyal profillerin belirlenmesine katkı sağlayabilir. Bu sayede, TMAO düzeyleri ile spesifik bakteriyel türler arasındaki olası korelasyonların araştırılması, neden-sonuç ilişkilerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir.

5.5.4 Metabolit kombinasyonlarının kullanımı

ROC ve regresyon analizlerinde görüldüğü üzere, bazı metabolitlerin tek başına değil, birlikte değerlendirildiklerinde daha yüksek tanısal doğruluk sağlayabildikleri gözlenmiştir. Bu nedenle, "composite biomarker score" gibi çoklu parametreler içeren biyobelirteç panellerinin geliştirilmesi, klinik karar verme süreçlerinde daha bütüncül ve hassas bir değerlendirme sunabilir. Bu tür kombinasyonların farklı kohortlarda test edilmesi, klinik yararlılıklarının ortaya konmasına katkıda bulunabilir.

5.5.5 Moleküler ve mekanistik çalışmalar

TMAO'nun inflamasyon, hücre proliferasyonu ve anjiyogenez gibi tümör mikroçevresini etkileyebilen mekanizmalar üzerindeki olası etkilerinin, preklinik düzeyde daha ayrıntılı biçimde incelenmesi yararlı olabilir. Hücre kültürü ve hayvan modeli çalışmalarında TMAO ve öncüllerine maruziyet sonrası ortaya çıkan hücresel yanıtlar ve gen ekspresyon değişikliklerinin değerlendirilmesi, bu metabolitlerin mesane kanseri biyolojisindeki rolünün daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

5.5.6 Klinik uygulama için standardizasyon

TMAO ve öncüllerinin klinikte tanı amaçlı kullanılabilmesi için numune alımı, depolama koşulları, analitik yöntemler (örneğin LC-MS/MS) ve referans aralıklar gibi teknik detayların standardizasyonunun sağlanması gerekmektedir. Bu bağlamda, farklı merkezlerde yapılacak harmonizasyon çalışmaları, elde edilen bulguların karşılaştırılabilirliğini artırabilir. Ayrıca, bu metabolitlerin diğer hastalıklarda da yükselebileceği göz önünde bulundurularak, özgüllük analizlerinin yapılması ve klinik bağlamda sonuçların dikkatle yorumlanması uygun olacaktır.

6 SONUÇ

Bu tez çalışmasında, trimetilamin-N-oksit (TMAO) ve onun öncülleri olan karnitin, kolin ve betainin mesane kanseri patogenezi ve tanısal değeri kapsamlı biçimde değerlendirilmiştir. Serum örneklerinden elde edilen veriler doğrultusunda yapılan ROC analizleri, regresyon modelleri ve risk skoru hesaplamaları; özellikle karnitin, kolin ve TMAO'nun mesane kanserinin hem tanısında hem de evrelemesinde önemli biyobelirteç adayları olabileceğini ortaya koymuştur.

Elde edilen bulgulara göre, kontrol- tümör genel grup karşılaştırmasında TMAO en yüksek AUC değerine (0.875) sahip olarak güçlü bir tanısal performans sergilemiş, bu da onu olası erken tanı biyobelirteçlerinden biri hâline getirmiştir. Kolin ve karnitin dae istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ayırt edici özellik göstermiştir. ROC analizlerinin yanı sıra uygulanan çoklu lojistik regresyon modelleriyle her bir metabolitin tümör varlığına olan katkısı modellenmiş ve elde edilen denklemler aracılığıyla risk skorları oluşturulmuştur. Bu risk skorları, Fisher's exact test ve ROC analizleriyle desteklenmiş ve özellikle K-Tümör Genel ve K-pTa karşılaştırmalarında %90-95 civarında duyarlılık ve özgüllük değerlerine ulaşmıştır. Bu durum, kombine biyobelirteç yaklaşımının tekli metabolit analizlerine kıyasla daha güçlü bir tanısal araç sağlayabileceğini göstermektedir.

Literatürle karşılaştırıldığında, bu çalışma bulguları, özellikle TMAO'nun kanserle ilişkili pro-inflamatuar etkilerini ve tümör mikrosistemini modüle eden rolünü destekler niteliktedir. TMAO'nun VEGF ve ILK gibi proliferasyon ve anjiyogenezle ilişkili yolakları aktive ederek tümör büyümesine katkıda bulunduğu çeşitli kanser türlerinde bildirilmiştir. Bu çalışmada TMAO'nun mesane kanseri hastalarında anlamlı düzeyde artmış bulunması, bu biyomolekülün mesane tümör biyolojisinde de benzer mekanizmalarla etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Betain ise bu çalışmada istatistiksel olarak sınırlı düzeyde anlamlılık göstermiş ve diğer metabolitlere kıyasla tanısal potansiyeli zayıf kalmıştır. Ancak betainin metilasyon döngüsündeki rolü göz önüne alındığında, daha büyük örneklem

gruplarında ve epigenetik analizlerle desteklenen çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesi mümkündür.

Çalışmanın en önemli katkılarından biri, yalnızca bireysel metabolit düzeylerinin değil, aynı zamanda kombinasyonlarının tanısal doğruluk üzerindeki etkisini istatistiksel olarak göstermesidir. Klinik uygulamada biyobelirteç panellerinin geliştirilmesi yönünde bu türden skorlamalar, daha hassas ve güvenilir erken tanı yaklaşımlarının önünü açabilir.

Bununla birlikte, çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Örneklem büyüklüğü, özellikle evre bazında alt gruplarda sınırlıdır ve sonuçların genellenebilirliği için daha büyük, prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, serum düzeylerindeki bu farklılıkların kaynağı olan mikrobiyal profiller değerlendirilememiştir. TMAO ve öncüllerinin mikrobiyota kaynaklı üretimi göz önüne alındığında, gelecekte bu metabolit düzeylerinin idrarda eşzamanlı analizi ve 16S rRNA tabanlı mikrobiyota analizleriyle entegre edilmesi, daha bütüncül bir değerlendirme sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma, TMAO, karnitin ve kolin gibi metabolitlerin mesane kanserinin tanı ve evrelemesinde potansiyel biyobelirteçler olabileceğini göstermiştir. Klinik doğrulama ve translasyonel araştırmalarla desteklenmesi durumunda bu metabolitler, invaziv olmayan tanı yaklaşımlarına katkı sunabilir. Ayrıca, mikrobiyota-metabolit-kanser eksenine odaklanacak ileri düzey çalışmalarla bu biyobelirteçlerin hem tanı hem de terapötik hedef olarak kullanımı mümkün hâle gelebilir.

7 KAYNAKLAR

1. Nizioł J, Ossoliński K, Płaza-Altamer A, Kołodziej A, Ossolińska A, Ossoliński T, vd. Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer. Sci Rep. Aralık 2022;12(1).
2. Liu ZQ, Yang XY, Chen JH, Ge SC, Dai SX, Zhu SH, vd. From Dysbiosis to Precision Therapy: Decoding the Gut-Bladder Axis in Bladder Carcinogenesis. Front Oncol [Internet]. 23 Haziran 2025 [a.yer 26 Haziran 2025];15. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/journals /oncology/articles/10.3389/fonc.2025.1630726/full
3. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, vd. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. Nat Med [İnternet]. Mayıs 2013;19(5):576-85. Erişim adresi: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563705/
4. Aghamajidi A, Maleki Vareki S. The Effect of the Gut Microbiota on Systemic and Anti-Tumor Immunity and Response to Systemic Therapy against Cancer. Cancers [İnternet]. 22 Temmuz 2022;14(15):3563. Erişim adresi: http://dx.doi.org/10.3390/cancers14153563
5. Bruce E, Makaranka S, Urquhart G, Elsberger B. Does the Gut Microbiome Environment Influence Response to Systemic Breast Cancer Treatment? Explor Target Anti-Tumor Ther. 2021;
6. Babjuk M, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, Escrig JLD, vd. European Association of Urology Guidelines on Non–muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). C. 81, European Urology. Elsevier B.V.; 2022. s. 75-94.
7. Dyrskjøt L, Hansel DE, Efstathiou JA, Knowles MA, Galsky MD, Teoh J, vd. Bladder cancer. Nat Rev Dis Primer 2023 91 [İnternet]. Ekim 2023;9(1):1-21. Erişim adresi: https://www.nature.com/ articles/s41572-023-00468-9
8. Oyaert M, Van Praet C, Delrue C, Speeckaert MM. Novel Urinary Biomarkers for the Detection of Bladder Cancer. Cancers [Internet]. Ocak 2025 [a.yer 25 Ağustos 2025];17(8):1283. Erişim adresi: https://www.mdpi.com/2072-6694/17/8/1283
9. Cui L, Lu H, Lee YH. Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases. Mass Spectrom Rev [İnternet]. 2018;37(6):772-92. Erişim adresi: https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mas.21562
10. Wang W, Huang G, Lin H, Ren L, Fu L, Mao X. Label-free LC-MS/MS proteomics analyses reveal CLIC1 as a predictive biomarker for bladder cancer staging and prognosis. Front Oncol. Ocak 2023;12.
11. Giorgione R, Gambale E, Rossi V, Mela MM, Doni L, Roviello G, vd. NMR Metabolomics in Bladder Cancer: Identification and Monitoring of Serum Biomarkers During Pt-Based Treatment. J Clin Oncol. 2023;
12. Rodrigues D, Jerónimo C, Henrique R, Belo L, Lourdes Bastos M de, de Pinho PG, vd. Biomarkers in Bladder Cancer: A Metabolomic Approach Using <i>in Vitro</I> and <i>ex Vivo</I> Model Systems. Int J Cancer. 2016;

13. Moco S. Studying Metabolism by NMR-Based Metabolomics. C. 9, Frontiers in Molecular Biosciences. Frontiers Media S.A.; 2022.
14. Antunes H, Tavares-da-Silva E, Marques IA, Carvalho J, Abrantes AM, Alves MG, vd. Metabolomics and Bladder Cancer: Current State and Future Perspectives. Acta Urol Port. 2018;35(1-2):46-51.
15. Kim WT, Yun SJ, Yan C, Jeong P, Kim YH, Lee IS, vd. Metabolic Pathway Signatures Associated With Urinary Metabolite Biomarkers Differentiate Bladder Cancer Patients From Healthy Controls. Yonsei Med J. 2016;
16. Zhou Y, Song R, Zhang Z, Lu X, Zeng Z, Hu C, vd. The development of plasma pseudotargeted GC-MS metabolic profiling and its application in bladder cancer. Anal Bioanal Chem [İnternet]. Eylül 2016;408(24):6741-9. Erişim adresi: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27473428/
17. Cao M, Zhao L, Chen H, Xue W, Lin D. NMR-based metabolomic analysis of human bladder cancer. Anal Sci Int J Jpn Soc Anal Chem [İnternet]. 2012;28(5):451-6. Erişim adresi: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22687923/
18. Wang Q, Su B, Dong L, Jiang T, Tan Y, Lu X, vd. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry-Based Nontargeted Metabolomics Predicts Prognosis of Hepatocellular Carcinoma After Curative Resection. J Proteome Res. 2020;19(8):3533-41.
19. Ghosh M, Ryan RO. ApoE Enhances Nanodisk-Mediated Curcumin Delivery to Glioblastoma Multiforme Cells. Nanomed. 2014;
20. Zhou H, Nong Y, Zhu Y, Liang Y, Zhang J, Chen H, vd. Serum untargeted lipidomics by UHPLC-ESI-HRMS aids the biomarker discovery of colorectal adenoma. BMC Cancer [İnternet]. Aralık 2022;22(1):1-14. Erişim adresi: https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-022-09427-1
21. Chattopadhyay I, Gundamaraju R, Jha NK, Gupta PK, Dey A, Mandal CC, vd. Interplay Between Dysbiosis of Gut Microbiome, Lipid Metabolism, and Tumorigenesis: Can Gut Dysbiosis Stand as a Prognostic Marker in Cancer? Dis Markers. 2022;
22. Gupta I, Pedersen S, Vranic S, Al Moustafa AE. Implications of Gut Microbiota in Epithelial–Mesenchymal Transition and Cancer Progression: A Concise Review. Cancers [İnternet]. 16 Haziran 2022;14(12):2964. Erişim adresi: http://dx.doi.org/10.3390/cancers14122964
23. Peng Y, Nie Y, Yu J, Wong CC. Microbial Metabolites in Colorectal Cancer: Basic and Clinical Implications. Metabolites. 2021;
24. Peng Z, Zhuang J, Shen B. The role of microbiota in tumorigenesis, progression and treatment of bladder cancer. Microbiome Res Rep [İnternet]. 20 Kasım 2023 [a.yer 23 Haziran 2025];3(1):5. Erişim adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10917617/
25. Sun J, Chen F, Wu G. Potential Effects of Gut Microbiota on Host Cancers: Focus on Immunity, DNA Damage, Cellular Pathways, and Anticancer Therapy. Isme J. 2023;

26. Zhou C, Basnet R, Zhen C, Ma S, Guo X, Wang Z, vd. Trimethylamine N-oxide promotes the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cell through the MAPK pathway. Discov Oncol [Internet]. 12 Ağustos 2024 [a.yer 23 Haziran 2025];15(1):346. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s12672-024-01178-8
27. Cho CE, Taesuwan S, Malysheva O, Bender E, Tulchinsky NF, Yan J, vd. Trimethylamine-<i>N</I>-oxide Biomarker Response Is a Function of Dietary Precursor Intake and Gut Microbiota Composition in Healthy Young Men. Faseb J. 2016;
28. Canyelles M, Tondo M, Cedó L, Farràs M, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F. Trimethylamine N-Oxide: A Link Among Diet, Gut Microbiota, Gene Regulation of Liver and Intestine Cholesterol Homeostasis and HDL Function. Int J Mol Sci. 2018;
29. Hsiao YC, Liu CW, Yang Y, Feng J, Zhao H, Lu K. DNA Damage and the Gut Microbiome: From Mechanisms to Disease Outcomes. DNA [İnternet]. 01 Şubat 2023;3(1):13-32. Erişim adresi: http://dx.doi.org/10.3390/dna3010002
30. Rath S, Rud T, Pieper DH, Vital M. Potential TMA-Producing Bacteria Are Ubiquitously Found in Mammalia. Front Microbiol. 2020;
31. Wu R, Kumawat AK, Demirel I. Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Mediates Increased Inflammation and Colonization of Bladder Epithelial Cells During a Uropathogenic E. Coli Infection in Vitro. Pathogens. 2023;
32. Jaye K, Li CG, Bhuyan DJ. The complex interplay of gut microbiota with the five most common cancer types: From carcinogenesis to therapeutics to prognoses. Crit Rev Oncol Hematol [İnternet]. Eylül 2021;165:103429. Erişim adresi: http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021. 103429
33. Gui Q, Li H, Wang A, Zhao X, Tan Z, Chen L, vd. The Association Between Gut Butyrate-producing Bacteria and Non-small-cell Lung Cancer. J Clin Lab Anal. 2020;
34. Mima K, Ogino S, Nakagawa S, Sawayama H, Kinoshita K, Krashima R, vd. The role of intestinal bacteria in the development and progression of gastrointestinal tract neoplasms. Surg Oncol [İnternet]. Aralık 2017;26(4):368-76. Erişim adresi: http://dx.doi.org/10.1016/j.suronc.2017. 07.011
35. Caradonna E, Abate F, Schiano E, Paparella F, Ferrara F, Vanoli E, vd. Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) as a Rising-Star Metabolite: Implications for Human Health. Metabolites [Internet]. Nisan 2025 [a.yer 23 Haziran 2025];15(4):220. Erişim adresi: https://www.mdpi.com/2218-1989/15/4/220
36. Khodabakhshi A, Rooholamini M reza. Is There Any Possible Association Between Trimethylamine N-Oxide (TMAO) and Cancer? A Review Study. J Occup Health Epidemiol. 2021;
37. Wang H, Rong X, Zhao G, Zhou Y, Xiao Y, Ma D, vd. The microbial metabolite trimethylamine N-oxide promotes antitumor immunity in triple-negative breast cancer. Cell Metab [İnternet]. 05 Nisan 2022 [a.yer 26 Haziran 2025];34(4):581-594.e8. Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413122000547

38. Amrein M, Li XS, Walter J, Wang Z, Zimmermann T, Strebel I, vd. Gut Microbiota-Dependent Metabolite Trimethylamine N-Oxide (TMAO) and Cardiovascular Risk in Patients With Suspected Functionally Relevant Coronary Artery Disease (fCAD). Clin Res Cardiol. 2022;
39. Constantino-Jonapa LA, Espinoza-Palacios Y, Escalona-Montaño AR, Hernández-Ruiz P, Amezcua-Guerra LM, Amedei A, vd. Contribution of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) to Chronic Inflammatory and Degenerative Diseases. Biomedicines [Internet]. Şubat 2023 [a.yer 26 Haziran 2025];11(2):431. Erişim adresi: https://www.mdpi.com/2227-9059/11/2/431
40. Byrd DA, Zouiouich S, Karwa S, Li XS, Wang Z, Sampson JN, vd. Associations of Serum Trimethylamine N-oxide and Its Precursors With Colorectal Cancer Risk in the Prostate, Lung, Colorectal, Ovarian Cancer Screening Trial Cohort. Cancer. 2024;
41. Yang S, Dai H, Lu Y, Li R, Gao C, Pan S. Trimethylamine N-Oxide Promotes Cell Proliferation and Angiogenesis in Colorectal Cancer. J Immunol Res. 2022;
42. Chan CW, Law BMH, Waye MMY, Chan JY, So WK, Chow KM. Trimethylamine-N-Oxide as One Hypothetical Link for the Relationship Between Intestinal Microbiota and Cancer - Where We Are and Where Shall We Go? J Cancer. 2019;10(23):5874-82.
43. Florea CM, Roșu R, Minciună I, Cismaru G, Pop D, Vlase AM, vd. The Impact of Trimethylamine N-Oxide on Atrial Fibrillation Presence in Patients With Cardiovascular Disease. J Xenobiotics. 2025;
44. Yang Z, Liu F, Zhu X, Suo F, Jia Z, Yao S. Altered Profiles of Fecal Bile Acids Correlate With Gut Microbiota and Inflammatory Responses in Patients With Ulcerative Colitis. World J Gastroenterol. 2021;
45. Xie H, Zhang K, Wei Y, Ruan G, Zhang H, Li S, vd. The Association of Serum Betaine Concentrations With the Risk of New-Onset Cancers: Results From Two Independent Nested Case-Control Studies. Nutr Metab. 2023;20(1).
46. Xu K, Xia G, Lu JQ, Chen MX, Zhen X, Wang S, vd. Impaired Renal Function and Dysbiosis of Gut Microbiota Contribute to Increased Trimethylamine-N-Oxide in Chronic Kidney Disease Patients. Sci Rep. 2017;
47. Pérez-Plasencia C, Kato Y, Sun W, Zhang Y, Ji Z, Liu X, vd. LC-MS-Based Plasma Metabolomics and Lipidomics Analyses for Differential Diagnosis of Bladder Cancer and Renal Cell Carcinoma. Front Oncol Wwwfrontiersinorg [İnternet]. 2020;1:717. Erişim adresi: www.frontiersin.org
48. Glunde K, Bhujwalla ZM, Ronen SM. Choline Metabolism in Malignant Transformation. Nat Rev Cancer. 2011;11(12):835-48.
49. Arlauckas SP, Popov AV, Delikatny EJ. Choline Kinase Alpha—Putting the ChoK-hold on Tumor Metabolism. Prog Lipid Res. 2016;63:28-40.
50. Bae S, Ulrich CM, Neuhouser ML, Malysheva O, Bailey LB, Xiao L, vd. Plasma Choline Metabolites and Colorectal Cancer Risk in the Women's Health Initiative Observational Study. Cancer Res. 2014;

51. Iorio E, Mezzanzanica D, Alberti P, Spadaro F, Ramoni C, D'Ascenzo S, vd. Alterations of Choline Phospholipid Metabolism in Ovarian Tumor Progression. Cancer Res. 2005;65(20):9369-76.
52. Ramireddy L, Tsen H, Chiang YC, Hung CY, Wu SR, Young SL, vd. Molecular Identification and Selection of Probiotic Strains Able to Reduce the Serum TMAO Level in Mice Challenged With Choline. Foods. 2021;
53. Wang C, Li M, Huang W, Huang S, Wusiman M, Liu Z, vd. Betaine Inhibits the Stem Cell-Like Properties of Hepatocellular Carcinoma by Activating Autophagy via SAM/m6A/YTHDF1-mediated Enhancement on ATG3 Stability. Theranostics. 2025;15(5):1949-65.
54. Guertin KA, Li XS, Graubard BI, Albanes D, Weinstein SJ, Goedert JJ, vd. Serum Trimethylamine N-Oxide, Carnitine, Choline, and Betaine in Relation to Colorectal Cancer Risk in the Alpha Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2017;26(6):945-52.
55. Guo Y, Xu L, Zhang D, Liao YP, Wang H, Lan Z, vd. Betaine Effects on Morphology, Proliferation, and P53-Induced Apoptosis of HeLa Cervical Carcinoma Cells in Vitro. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(8):3195-201.
56. Cruciani RA, Zhang JJ, Manola J, Cella D, Ansari B, Fisch M. L-Carnitine Supplementation for the Management of Fatigue in Patients With Cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. J Clin Oncol. 2012;30(31):3864-9.
57. Lai J, Haertling T, Weinstein J, Rademaker A, Goldman S. A Cross-Sectional Study of Carnitine Deficiency and Fatigue in Pediatric Cancer Patients. Child Nerv Syst. 2016;32(3):475-83.
58. Shi L, Guo M, Shi C, Gao G, Xu X, Zhang C, vd. Distinguishing Benign and Malignant Thyroid Nodules Using Plasma Trimethylamine N-Oxide, Carnitine, Choline and Betaine. J Cancer Res Clin Oncol. 2024;
59. Li Z, Ke X, Dan Z, Wang Z, Fang F, Li B. New Insights Into the Relationship Between Gut Microbiota and Radiotherapy for Cancer. Nutrients. 2022;
60. Huang JY, Butler LM, Midttun Ø, Wang R, Jin A, Gao Y, vd. Abstract 2273: Serum Choline, Methionine, Betaine, Dimethylglycine, and Trimethylamine-N-Oxide in Relation to Pancreatic Cancer Risk in Two Nested Case-Control Studies in Asian Populations. Cancer Res. 2017;
61. Wu Y, Rong X, Pan M, Wang T, Yang H, Chen X, vd. Integrated Analysis Reveals the Gut Microbial Metabolite TMAO Promotes Inflammatory Hepatocellular Carcinoma by Upregulating POSTN. Front Cell Dev Biol. 2022;
62. Mirji G, Worth A, Bhat SA, Sayed ME, Kannan T, Goldman AR, vd. The Microbiome-Derived Metabolite TMAO Drives Immune Activation and Boosts Responses to Immune Checkpoint Blockade in Pancreatic Cancer. Sci Immunol. 2022;
63. Sánchez-Alcoholado L, Ordóñez R, Otero A, Plaza-Andrade I, Laborda-Illanes A, Medina JA, vd. Gut Microbiota-Mediated Inflammation and Gut Permeability in Patients With Obesity and Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2020;21(18):6782.

64. Lu S, Wang C, Ma J, Wang Y. Metabolic Mediators: Microbial-Derived Metabolites as Key Regulators of Anti-Tumor Immunity, Immunotherapy, and Chemotherapy. Front Immunol. 2024;15.
65. Özmen HK, Erdemci B, Aşkın S, Sezen O. Carnitine and Adiponectin Levels in Breast Cancer After Radiotherapy. Open Med. 2017;12(1):189-94.
66. Wang J, Zhou Y, Zhang D, Zhao W, Lu Y, Liu C, vd. CRIP1 Suppresses BBOX1-mediated Carnitine Metabolism to Promote Stemness in Hepatocellular Carcinoma. Embo J. 2022;41(15).
67. Gokhale S, Xie P. ChoK-Full of Potential: Choline Kinase in B Cell and T Cell Malignancies. Pharmaceutics. 2021;13(6):911.
68. Hiel B v. d., Stokkel MPM, Buikhuisen WA, Janßen H, Velthuysen MF v., Rhodius RJ, vd. 18F-Choline PET/CT as a New Tool for Functional Imaging of Non-Proliferating Secreting Neuroendocrine Tumors. J Endocrinol Metab. 2015;5(4):267-71.
69. Saiki I, Yara M, Yamanaka T, Uchino H, Inazu M. Functional Expression of Choline Transporter-Like Protein 1 in LNCaP Prostate Cancer Cells: A Novel Molecular Target. Biomol Ther. 2019;28(2):195-201.
70. Kar F, Hacıoğlu C, Kaçar S, Şahıntürk V, Kanbak G. Betaine Suppresses Cell Proliferation by Increasing Oxidative Stress–mediated Apoptosis and Inflammation in DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line. Cell Stress Chaperones. 2019;24(5):871-81.
71. Sternbach S, West N, Singhal NK, Clements RJ, Basu S, Tripathi AK, vd. The BHMT-betaine Methylation Pathway Epigenetically Modulates Oligodendrocyte Maturation. Plos One. 2021;16(5):e0250486.
72. Cho E, Holmes MD, Hankinson SE, Willett WC. Choline and Betaine Intake and Risk of Breast Cancer Among Post-Menopausal Women. Br J Cancer. 2010;102(3):489-94.
73. Wang Z, Que H, Suo C, Han Z, Tao J, Huang Z, vd. Evaluation of the NMP22 BladderChek test for detecting bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget [İnternet]. 23 Ekim 2017 [a.yer 22 Eylül 2025];8(59):100648-56. Erişim adresi: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5725051/
74. UroVysionTM Fluorescence In Situ Hybridization in Urological Cancers: A Narrative Review and Future Perspectives [İnternet]. [a.yer 22 Eylül 2025]. Erişim adresi: https://www.mdpi.com/2072-6694/14/21/5423
75. Ecke TH, Meisl CJ, Schlomm T, Rabien A, Labonté F, Rong D, vd. Performance of Urinary Markers in Patients With Suspicious Cystoscopy During Follow-up of Recurrent Non-muscle Invasive Bladder Cancer: BTA Stat, NMP22 BladderChek, UBC Rapid Test, CancerCheck UBC Rapid VISUAL, and Uromonitor in Comparison to Cytology. Urology [İnternet]. 01 Mart 2025 [a.yer 22 Eylül 2025];197:119-25. Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090429524011130

8 EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı

EK 1. Etik Kurul Onayı (devam)

EK 2. Etik Kurul Kararı (Tez Başlığı Onayı)

9 ÖZGEÇMİŞ