

Mesane kanser tedavisinde mikobakterilerin önemi

Importance of mycobacteria in treatment of bladder tumor

Dr. Esra Büber¹, Dr. Selçuk Keskin², Dr. N. Leyla Açıan¹

¹Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

²Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, İstanbul

ÖZET

Mesane kanseri özellikle erkeklerde en sık görülen kanserlerden biridir. *Mycobacterium bovis*'in zayıflatılması ile elde edilen *Bacillus Calmette-Guerin*'in intravezikal uygulaması orta ve yüksek riskli vakalarda standart tedavi yöntemidir. Mikobakterilerin bu etkilerini immün sistemi uyarak yaptıkları düşünülmektedir. Canlı mikobakteri kullanımı ölüme kadar giden önemli yan etkilere yol açtığı için daha etkili ve daha az zararlı tedavi arayışları yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Mikobakterilerin diğer immünoestimülanlarla birlikte uygulanması, genetiği değiştirilmiş suş kullanılması, patojen olmayan *Mycobacterium phlei* gibi yeni suşlarının araştırılması bu arayışlara örnektir. Tedavi için canlı hücre yerine hücre duvarı preparatları uygulanmasının yeterli olduğu gösterilmiştir. Çalışma grubumuz da, *Mycobacterium phlei* hücre duvarının çeşitli alt fraksiyonlarının immünoestimülan etkilerini incelemiş, sığağa dayanıklı, suda çözünen, protein denatüranları ile muameleye dayanıksız, DNA içermeyen yapıların bu etkilerden sorumlu olabileceğini öne sürmüştür. İkinci aşamada 88 mikobakteri suşunun immünoestimülan aktivitesi incelenmiş, patojen olmayan, hızlı üreyen 12 yeni suşun tedavide alternatif olabileceği görülmüştür. Bu suşların hücre duvarlarının çok boyutlu HPLC ile ayrıştırılma ve yapı analizi çalışmaları devam etmektedir. Elde edilen bulgular *Mycobacterium phlei* ile elde edilenlerle benzerlik göstermektedir. Daha ileri peptidomik ve proteomik araştırmaları ile etkin yapıların tamamen saflaştırılıp tanımlanması sonucu mikobakterilerin tümör tedavi edici mekanizması daha iyi anlaşılabilir ve daha az yan etkili ilaçların geliştirilmesi mümkün olabilir. Hayvan modellerinde *in vivo* etkilerin gösterilmesi de ayrıca gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Mesane tümörü, mikobakteri suşları, hücre duvarı ekstresi, immünoestimülan aktivite, antitümöral ilaç geliştirilmesi

İletişim (✉): nla@hacettepe.edu.tr, nlacan@yahoo.com

İstatistiklere göre Türkiye'de mesane kanseri görülme sıklığı erkeklerde üçüncü, kadınlarda on üçüncü sıradadır (1). Diğer ülkelerde de durum fazla farklı değildir. ABD'de mesane kanseri görülme sıklığı erkeklerde prostat ve akciğer ve kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise görülme sıklığı daha az olup, on dördüncü sıradadır (2). Erkeklerde bu hastalığın daha fazla

ABSTRACT

Bladder carcinoma is among the most frequent cancer types especially among men. Intravesical instillation of attenuated strain of *Mycobacterium bovis*, *Bacillus Calmette-Guerin* is the standard treatment of medium and high risk patients. It is thought that the effect is through stimulation of the immune system. Since, the use of live mycobacteria may yield to deathly side effects, intensive research is in progress to obtain more potent and less harmful treatment alternatives. Applications of mycobacteria together with other immunostimulants, use of genetically modified organisms, or use of nonpathogenic strains such as *Mycobacterium phlei* are examples to such researches. Cell wall is sufficient for antitumoral activity. Our research group investigated the immunostimulating activity of several cell wall subfractions of *Mycobacterium phlei* and showed that the heat stable, water soluble structures, instable to protein denaturing agents and do not contain DNA might be responsible for these effects. Next, immunostimulating activity of 88 mycobacteria strains were investigated and found out that 12 nonpathogenic, rapid growing strains might be an alternative to *Mycobacterium phlei*. Separation of the cell wall components of these strains by multidimensional HPLC and identification of the structures is in progress. The findings so far obtained resemble the findings obtained with *Mycobacterium phlei*. More detailed peptidomics and proteomics studies to isolate and characterize these structures may shed light on the mechanism of action of these components and lead to preparation of less harmful antitumoral agents. Further study with animal models is also required to show the *in vivo* effects of these substances.

Key words: Bladder tumor, mycobacteria strains, cell wall extract, immunostimulating activity, antitumoral drug preparation

görülmesinin sebepleri sigara kullanımının daha fazla olmasına ve mesleki maruziyete bağlanabilir. Aynı istatistiklere göre mesane kanserinden ölüm oranı ise, erkeklerde on birinci, kadınlarda on sekizinci sıradadır. Bu durum özellikle erkekler için mesane kanserinin önemli bir kronik hastalık olduğunu ve yeni ilaç geliştirme zorunluluklarını vurgulamaktadır.

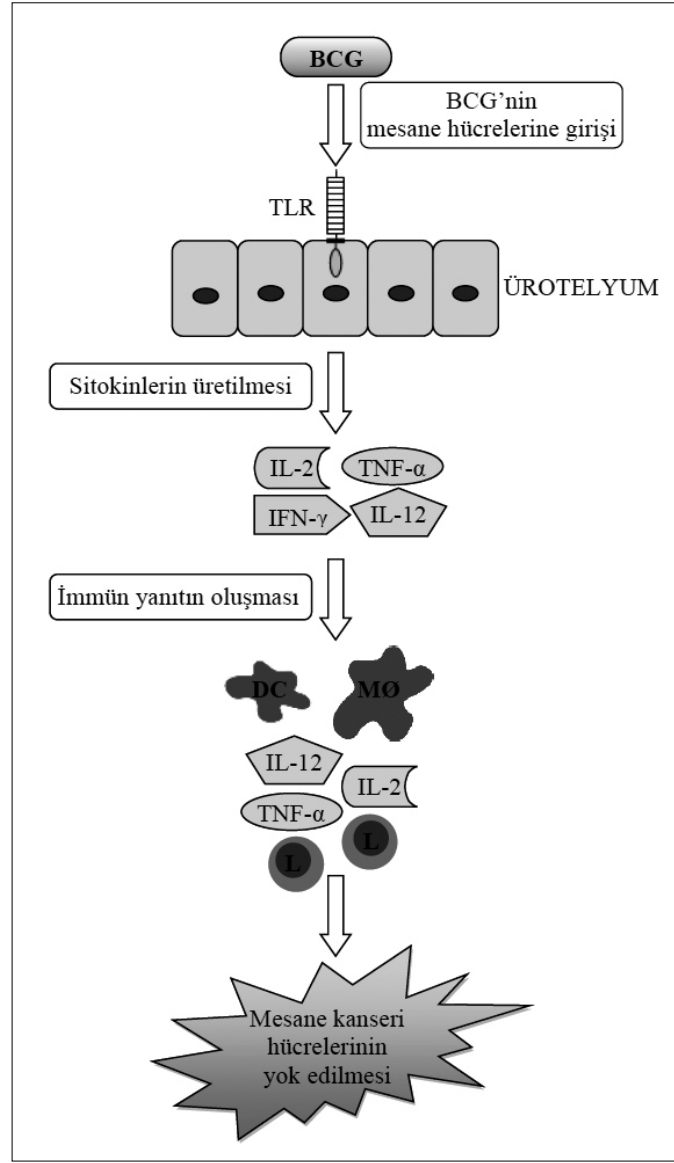
“Canlı BCG ile tedavi orta ve yüksek riskli hastalarda tercih edilen tedavi şekli olmasına rağmen bu tedavinin granülomatöz prostatit, epididimo-orşit, sistemik BCG reaksiyonları, allerjik reaksiyonlar, yüksek ateş, hepatit, sepsis gibi olumsuz yan etkileri vardır.”

Moleküler biyoloji, bakteri genetiği ve immünoloji konularında bilgilerin artması ile birlikte hastalıkların tedavisinde bakterilerden yararlanım konusunda hızlı gelişmeler olmakta, bakterilerin, antienflamatuvar, antitümöral ve antiviral tedavilerde kullanım olanakları üzerinde çalışılmaktadır. Bakterilerden yararlanılarak yapılan tedavilerin geleneksel tedavilere göre, düşük maliyetle yüksek ölçekte üretim imkanı, biyomühendislik metodlarının basitliği, immün sistemi uyarmadaki çeşitlilik gibi çeşitli üstünlükleri vardır. Standart tedavi olarak kabul edilmiş bakteriyel tedavi fazla olmamakla beraber, Mycobacterium bovis'in zayıflatılması ile elde edilen Bacillus Calmette-Guerin (BCG) ile mesane tümörü tedavisi bu tür standart tedavilerden biridir (3).

Bu makalede, mesane tümörü tedavisinde mikobakteri kullanılması ile ilgili mevcut durum ve bu tedavi yönteminin iyileştirilmesi amacıyla yapılan - aralarında bizim araştırmalarımızın da yer aldığı - çalışmalar derlenmiştir.

Mikobakterilerle ilgili kısa bilgi

Mycobacteriaceae ailesinin üyesi olan mikobakteriler, çomak görünümlü, hareketsiz bakterilerdir. Bu güne kadar yüzden fazla mikobakteri suşu tanımlanmıştır. Asit-alkol çözeltilisine dayanıklı olmaları, yüksek derişimde 60-90 karbonlu mikolik asitler içermeleri ve DNA'larında mol bazında % 61-71 oranında guanin+sitozin bulunması bu mikobakterilerin tanımlayıcı özellikleridir. Mikobakteri suşları patojenlik, üreme hızı ve pigment oluşturma özelliklerine göre farklılık gösterirler. Önemli bazı istisnalar dışında genel olarak patojen türler daha yavaş, patojen olmayan türler daha hızlı ürerler (4).



Şekil 1. BCG'nin mesane kanseri hücrelerindeki anti-tümöral etki mekanizması. TLR: Toll-benzeri reseptör, MØ: Makrofaj, DC: Dendritik hücre, L: Sitotoksik T lenfositler (12, 16, 17).

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı alışlagelmiş gram pozitif ve gram negatif bakteri hücre duvarlarına kıyasla oldukça kompleksdir. Bu yapıda plazma zarı üstünde yer alan duvar iki tabakadan oluşur. Zarın üzerinde, arabinogalaktana kovalan olarak bağlı peptidoglikanlar ve bunların bağlı oldukları mikolik asitler yer alır. Hücre duvarında hidrofobik bariyer meydana getiren mikolik asitler, mikobakterilerde tüm hücre kuru ağırlığının %50'sini, hücre lipidlerinin %60'ını oluştururlar. Mikolil arabinogalaktan-peptidoglikan kompleksi üzerindeki tabakada ise serbest lipidler, hücre duvarı proteinleri, fosfatidil inositol mannozidler, lipomannanlar ve lipoarabinomannanlar yer alır (5). Mikobakteri hücre duvarı yapısının hastalık oluşturmada ve immün cevapta rolü bulunmaktadır.

Mikobakterilerin mesane tümörü tedavisinde kullanılması

BCG'nin mesane tümörü tedavisinde kullanılması ile ilgili yayınlar 1976 yılına kadar

uzanmaktadır. Morales ve arkadaşları yüzeysel mesane kanserini intravezikal ve intradermal yolla tedavi etmeyi denemişler ve 9 hastadan oluşan gruplarında tümör rekürrensinde 12 kat azalma gözlemişlerdir (6). Bu çalışmayı birçok yeni araştırma takip etmiş, çeşitli faz II ve faz III çalışmaları sonucu BCG'nin yüzeysel mesane kanserindeki etkisi doğrulanmıştır. Araştırmalar halen devam etmekte ve konu ile ilgili birçok derleme yayınlanmaktadır. Bu derlemelerden bir kısmı kaynaklar listesinde bulunmaktadır (7-17).

Günümüzde, intravezikal BCG uygulaması orta ve yüksek risk grubundaki hastaların tedavisinde, lokal nüksleri ve progresyonu engellemede standart tedavi haline gelmiştir. Uluslararası Mesane Kanser Grubu kas dışı invazif mesane kanseri hastalarının hepsinde öncelikle tam transüretral mesane tümör rezeksiyonu önermektedir. Düşük riskli hastalarda rezeksiyondan hemen sonra tek bir doz kemoterapötik uygulama, orta riskli hastalarda kemoterapi ile birlikte intravezikal

BCG uygulaması, yüksek riskli hastalarda ise BCG indüksiyonu ve idamesi önerilmektedir. Rekürrens durumunda uygun tedavi hastanın risk durumuna ve geçmişteki tedaviye bağlıdır (18,19).

Mikobakterilerin tümör tedavisindeki etki mekanizması

Mikobakterilerin tümör tedavisindeki etki mekanizması hala tam olarak bilinmese de bu etkiyi, hedef hücrelerdeki "toll-benzeri" reseptörleri (toll-like receptors, TLR) uyarıp, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin 2 (IL-2), interlökin 12 (IL-12), interferon gama (IFN- γ) gibi çeşitli sitokinlerin salgılanmasını sağlayarak gösterdikleri düşünülmektedir (12,14,16,17). Sitokinler enflamasyonla ilgili en önemli araçlardır. Yaygın olan görüşe göre BCG ile başlatılan antitümöral etkiler, çözünür ve hücreyel immün sistem düzenleyicilerinin etkileşimini içeren bir dizi olay sonucunu ortaya çıkmaktadır. Bu etkide doğal ve kazanılmış immünitenin karşılıklı etkileşiminin rolü olduğu da açıklığa kavuşmuştur. Bu mekanizma Şekil 1'de özetlenmiştir.

In vitro çalışmalarda, direkt antiproliferatif, sitotoksik veya proapoptotik etkilerle ilgili bulgular elde edilmişse de *in vivo* çalışmalarla bu bulgular desteklenmemiştir. İmmün sistem yetmezliği olan canlılarda antitümöral etki gözlenmemiştir (16). İmmünomodülasyon mekanizmasının genetik yapı, immünolojik özellikler, uygulanan BCG'nin doz ve programına bağlı olarak her bir hastada farklı olması olasılığı da vardır (9).

BCG tedavisinin olumsuz etkileri ve daha iyi tedavi yöntemi arayışları

Canlı BCG ile tedavi orta ve yüksek riskli hastalarda tercih edilen tedavi şekli olmasına rağmen bu tedavinin granulomatöz prostatit, epididimo-orşit, sistemik BCG reaksiyonları, allerjik reaksiyonlar, yüksek ateş, hepatit, sepsis gibi olumsuz yan etkileri vardır (12, 14,18, 20). Üstelik eğer hasta BCG'ye cevap veriyorsa uzun süreli kullanım nedeniyle komplikasyon riski daha da artar. Bu nedenlerle BCG tedavisinin daha iyi hale getirilmesi çalışmaları ve yeni arayışlar yoğun şekilde sürdürülmektedir.

Bir kısım araştırmacılar BCG'nin diğer immünoestimülanlarla birlikte uygulanması denemeleri yapmaktadırlar. BCG'nin interferon alfa ile birlikte uygulanması ile daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir (21). BCG ile

tetiklenen tümör tedavisinde tip 1 yardımcı T (Th1) hücrelerinin rolü olduğuna dair deliller nedeniyle, BCG ile Th1 immün cevabının artırılması olasılığı da düşünülmüştür. Th1 sitokinlerle kombine şekilde BCG uygulanmasında daha iyi sonuçlar alınmasına rağmen, bu kombine tedavi çok yüksek derişimde sitokin uygulanmasını gerektirir. Diğer yandan BCG genetiğinin Th1 sitokinleri salgılayacak şekilde değiştirilmesi konusu üzerinde de durulmaktadır. Çeşitli Th1 sitokinleri salgılayan genetiği değiştirilmiş BCG suşları elde edilmiş ve tedavideki üstünlüğü gösterilmiştir (22).

Araştırmacılar, tedavi için canlı hücre yerine sadece hücre duvarı preparatları uygulanmasının da yeterli olduğunu göstermişlerdir. Wang grubu BCG hücre duvarından ısıya dayanıklı, aseton ve alkolde çözünürlüğü düşük, suda iyi çözünen, 60-90 kDa molekül ağırlığında antitümöral aktiviteye sahip bir glikan izole etmiştir (23). BCG hücre duvarı tedavide etkili olmasına rağmen, çözünürlük ve dayanıklılık bakımından uygulamada zorluklarla karşılaşmıştır. Bu fizikokimyasal zorluklarla baş edebilmek için taşıyıcı vektör olarak oktaarjininle modifiye edilmiş lipozomlar kullanılmış ve bu şekilde tümör hücre sitoplazmasına taşınan yapı BCG'nin tümör büyümesine engel olduğu gösterilmiştir (24). Bu hücre duvarı preparatlarının, kanser hücrelerinin doğal katil (natural killer; NK) grup 2, D üyesi ligandı sayısını yükselterek, lenfokinle aktive olmuş katil hücrelere karşı duyarlılıklarını arttırdığı gösterilmiştir (25).

Yan etkileri bertaraf etmek veya azaltmak amacıyla BCG yerine patojen olmayan bir mikobakteri suşu kullanılarak tedavi denemeleri de sürdürülmektedir. Bu amaçla en çok *Mycobacterium phlei* kullanılmıştır. Morales grubu BCG tedavisi başarısız olmuş hastalara intravezikal olarak *M. phlei* hücre duvarı-DNA kompleksi preparatları uygulamış, hastaların bu preparatı daha iyi tolere ettiklerini ve anlamlı düzeyde iyileşme gösterdiklerini yayınlamışlardır (26).

Halen *M. phlei* hücre duvarı-DNA kompleksi ile ilgili faz III çalışması, *Mycobacterium* w ile faz I ve faz II çalışmaları sürdürülmektedir (<http://clinicaltrials.gov/>). *Mycobacterium smegmatis*'ten mesane tümörü tedavisinde kullanılabilecek bir preparat hazırlanması ile ilgili bir patent de bulunmaktadır (Patent no. CN1339583 (A) 2002-03-13).

"Araştırma sonuçlarımıza göre M. phlei hücre duvarından elde edilen TNF-a uyarıcı aktiviteye sahip yapılar suda çözünürlüğü yüksek, asetonda çözünürlüğü az, yüksek sıcaklığa dayanıklı, protein denatüre edici sodyum dodesil sülfat muamelesine dayanıksız yapılarıdır."

Çalışma grubumuzun elde ettiği bulgular

Araştırma grubumuzda yer alan Prof. Dr. H. Özen, 1991 yılından beri mesane tümörü tedavisinde BCG'nin rolü ve komplikasyonları ile ilgili çalışmalar yayınlamaktadır (7,8,27-31). 2003 yılında üroloji, mikrobiyoloji ve biyokimya disiplinleri arasında oluşturulan çalışma grubumuz mesane tümörü tedavisinde kullanılabilecek daha az yan etkili mikobakteri preparatları tesbiti amacıyla ortak çalışmalarına başladı.

İlk aşamada patojen olmayan *M. smegmatis* (32) ve *M. phlei* (33,34) kullanılarak mesane tümörü tedavisinde etkili olan mikobakteri hücre duvarı bileşenleri araştırıldı. Çeşitli fizikokimyasal yöntemlerle fraksiyonlandırılan hücre duvarı ekstraktları insan makrofaj hücreleri ile inkübe edildikten sonra salgılanan IL-12 ve TNF- α düzeyleri ELISA yöntemiyle tesbit edildi. Deney sonuçları bazı hücre ekstraktlarının TNF- α ve IL-12 uyarıcı aktiviteye sahip olduklarını gösterdi. Örneklerin kütle spektroskopisi profillerinin incelenmesi 3808, 9207, 11533, 12460 ve 21587 Da molekül ağırlığındaki peptidlerin immünoestimülan aktiviteye sahip olduğunu düşündürdü (34). Araştırma sonuçlarımıza göre *M. phlei* hücre duvarından elde edilen TNF- α uyarıcı aktiviteye sahip yapılar suda çözünürlüğü yüksek, asetonda çözünürlüğü az, yüksek sıcaklığa dayanıklı, protein denatüre edici sodyum dodesil sülfat muamelesine dayanıksız yapılarıdır. Bu bulgular Wang grubunun bulguları (23) ile benzerlik göstermektedir; Morales grubunun bulgularının aksine DNA içermemektedir (26).

İkinci aşamada, 88 farklı mikobakteri suşu TNF- α ve IL-12 uyarıcı aktiviteleri bakımından incelendi ve etkiler BCG etkisi ile karşılaştırıldı. Bu mikobakterilerden dokuzunun

“Mesane kanseri tedavisi için daha etkili ve güvenle kullanılabilir bir mikobakteri suşu aramak amacıyla 88 mikobakteri suşu ile yaptığımız çalışma bildiğimiz kadarıyla bu sahada, bu kadar çok sayıda mikobakteri suşunun bir arada incelendiği ilk çalışmadır.”

IL-12 uyarıcı aktivitesinin BCG ile kıyaslanabilir olduğu bulundu. 23 mikobakterinin ise TNF- α uyarıcı aktivitesi BCG'den daha yüksekti. Patojen ve yavaş üreyen mikobakteriler elendikten sonra *M. phlei* 'ye ek olarak *M. agri*, *M. aichiense*, *M. aurum*, *M. brumae*, *M. chitae*, *M. chubuense*, *M. diernhoferi*, *M. gadium*, *M. murale*, *M. obuense*, *M. tokaiense* ve *M. vaccae* olmak üzere 12 suş mesane tümörü tedavisi potansiyeli olan suşlar olarak seçildi (35). Bu suşlardan yedisinin mesane tümörü üzerinde sitotoksik etkisi olduğu MTT testi ile tesbit edilmiş, dördü için patent başvurusunda bulunulmuştur. Bu mikobakterilerin hücre duvarı ekstreleri çok yönlü HPLC ile ayrıştırılarak

elde edilen fraksiyonların protein, karbohidrat içerikleri ve kütle spektrumları incelenmiştir (36). Ön bulgular, elde edilen aktif fraksiyonların özelliklerinin *M. phlei* ile elde edilen sonuçlara benzediği doğrultusundadır. Bu fraksiyonların immünoestimulan ve sitotoksik özelliklerinin incelenmesi devam etmektedir.

Sonuç

Sonuç olarak mikobakterilerin mesane kanseri hücreleri üzerindeki etki mekanizmasının aydınlatılması yanında daha güçlü ve daha az yan etkili mikobakteri tedavisi yöntemleri arayışı aktif bir araştırma sahasıdır. Bu konuda yapılan çalışmalar BCG uygulamasının daha etkin ve daha zararsız hale getirilmesi; insan için patojen olmayan yeni suşların araştırılması; bu mikobakteri hücrelerinde bulunan etkili yapıların tesbit edilip ayrıştırılması olarak gruplandırılabilir. BCG hücre duvarından elde edilebilecek etkili yapılarla tedavi yöntemi de canlı mikobakteri kullanılmadığı için daha az yan etkiye sahip olabilir. Ancak bu yapıların ilaç olarak elde edilebilmesi için kitle halinde patojen mikobakteri üretilmesi çevre sağlığını olumsuz yönden etkileyebileceği için aynı işlevi görebilecek patojen olmayan suşların öncül olarak kullanılması tercih edilmelidir.

Bizim çalışmalarımız patojen olmayan mikobakteri suşlarından mesane kanseri tedavisinde kullanılabilir yeni bir madde

geliştirilmesi ile ilgili bir başlangıç çalışması oluşturmaktadır. Mesane kanseri tedavisi için daha etkili ve güvenle kullanılabilir bir mikobakteri suşu aramak amacıyla 88 mikobakteri suşu ile yaptığımız çalışma bildiğimiz kadarıyla bu sahada, bu kadar çok sayıda mikobakteri suşunun bir arada incelendiği ilk çalışmadır. Patojen olan ve olmayan ayırımı yapmadan, temin edebildiğimiz kadar çok sayıda mikobakteri hücre duvarının etkisini inceleyerek elde ettiğimiz bulguların mikobakterilerin immünoestimulan etki mekanizmasının aydınlatılmasına ışık tutacağını düşünüyoruz. Daha ileri peptidomik ve proteomik araştırmaları ile etkili fraksiyonların tamamen saflaştırılarak yapılarının aydınlatılması ve aktif yapıların karşılaştırılması ile daha ayrıntılı bilgiler elde edilmesi beklenmektedir. Elde edilecek yapıların hayvan modellerinde denenecek *in vivo* etkilerinin gösterilmesi daha ileri çalışmaların konusunu oluşturur.

Teşekkür

Yazarlar, bu multidisipliner araştırmanın başlatılmasına vesile olan Sayın Prof. Dr. Haluk Özen'e teşekkürü borç bilirler. Bu makalede özetlediğimiz çalışmalarımız Hacettepe Üniversitesi Araştırma Birimi (03G31) ve TÜBİTAK aracılığı ile Sanayi ve Ticaret Bakanlığı (SBAG-SANTEZ-5-105S361) tarafından desteklenmiştir. Araştırmalarımızda kullandığımız mikobakterilerden bir kısmı Salubris A.Ş. tarafından sağlanmıştır.

Kaynaklar

1. Moore MA, Eser S, Iginisov N et al. Cancer epidemiology and control in North-Western and Central Asia - Past, present and future. Asian Pacific J Cancer Prev, Asian Cancer Epidemiology Supplement 2010; 11: 17- 32.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012. CA Cancer J Clin 2012; 62:10 – 29.
3. Yu H. Bacteria-mediated disease therapy. Appl Microbiol Biotechnol 2011; 92: 1107 - 1113.
4. Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 884 - 888.
5. Brennan PJ. Structure, function and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis 2003; 83, 91-7.
6. Morales A, Eiding D, Bruce AW. Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. J Urol 1976; 116:180 - 183.
7. Ozen H. Prognostic factors and therapy for superficial and invasive bladder cancer. Curr Opin Oncol 1991; 3:553-558.
8. Ozen H. Advances in bladder cancer. Curr Opin Oncol 1993; 5: 574-580.
9. van der Meijden A, Sylvester RJ. BCG immunotherapy for superficial bladder cancer: An overview of the past, the present and the future. EAU Update Series 1 2003; 80-86.
10. Mungan NA. Yüzeysel mesane tümörü tedavisinde yeni yaklaşımlar Üroonkoloji Bülteni, 2006; Mart, sayı 1; 3-5
11. Razack AHA. Bacillus Calmette-Guérin and bladder cancer Asian Journal of Surgery 2007; 30: 302-309.
12. Brandau S, Suttman H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. Biomed Pharmacother. 2007; 61: 299-305.
13. Chade DC, Shariat SF, Dalbagni G. Intravesical therapy for urothelial carcinoma of the urinary bladder: a critical review. Int Braz J Urol 2009; 35:640- 650.
14. Kresowik TP, Griffith TS. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. Immunotherapy 2009; 1: 281-288.
15. Barlow LaMJ, Seager CM, Benson MC, McKiernan JM. Novel intravesical therapies for non-muscle-invasive bladder cancer refractory to BCG. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations; 2010, 28: 108-111
16. Ahirwar DK, Manchanda PK, Mittal RD, +Bid HK. BCG response prediction with cytokine gene variants and bladder cancer: where we are? J Cancer Res Clin Oncol 2011; 137:1729-1738
17. Bishay JH, Park ES, Hemstreet GP. Intravesical Immunotherapy: BCG. In Bladder Tumors: Molecular Aspects and Clinical Management, Cancer Drug Discovery and Development. Editörler: Lokeshwar VB, Merseburger AS, Hautmann SH. Totowa, NJ: Humana Press; sayfa. 271-295.
18. Brausi M. Approaches to the management of non-muscle invasive bladder cancer: A Review of current guidelines and best practice recommendations from the International Bladder Cancer Group. European Urology Supplements 2 0 0 8; 7: 615-617.
19. Brausi M, Witjes JA, Lamm D, et al. A Review of current guidelines and best practice recommendations for the management of nonmuscle invasive bladder cancer by the international bladder cancer group. J Urol 2011; 186: 2158-2167.
20. Morales A. Evolution of intravesical immunotherapy for bladder cancer: mycobacterial cell wall preparation as a promising agent Expert Opin Investig Drugs 2008; 17: 1067-1073.
21. Gan YH, Zhang Y, Khoo HE, Esuvaranathan K. Antitumour immunity of bacillus Calmette-Guerin and interferon alpha in murine bladder cancer. Eur J Cancer 1999; 35: 1123-1129.

22. Luo Y, Henning J, O'Donnell MA. Th1 cytokine-secreting recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin and prospective use in immunotherapy of bladder cancer, *Clinical and Developmental Immunology* 2011; doi: 10.1155/2011/728930.
23. Wang R, Klegerman ME, Marsden I et al. An anti-neoplastic glycan isolated from *Mycobacterium bovis* (BCG vaccine). *Biochem J* 1995; 311: 867-872.
24. Miyazaki J, Nishiyama H, Yano I, et al. The therapeutic effects of R8-liposome-BCG-CWS on BBN-induced rat urinary bladder carcinoma. *Anticancer Res* 2011; 31: 2065-2071.
25. Miyazaki J, Kawai K, Kojima T, et al. The liposome-incorporating cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin can directly enhance the susceptibility of cancer cells to lymphokine-activated killer cells through up-regulation of natural-killer group 2, member D ligands. *B J U International* 2011; 108: 1520-1526.
26. Morales A, Phadke K, Steinhoff G. Intravesical mycobacterial cell wall DNA complex in the treatment of carcinoma in situ of the bladder after standard intravesical therapy had failed. *J Urol* 2009; 181: 1040-1045.
27. Tuncer S, Tekin M, Ozen H, et al. Detection of bacillus Calmette-Guerin in the blood by the polymerase chain reaction method of treated bladder cancer patients. *J Urol*; 1997 158:2109-12.
28. Bilen CY, Ozen H, Aki FT, et al. Clinical experience with BCG alone versus BCG plus epirubicin. *Int J Urol*; 2000 7:206-209.
29. Aygün C, Ozen H, Kocagöz T, et al. Induction of mycobacteremia by intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation in an experimental animal model and detection with polymerase chain reaction. *J Urol* 2000; 163:1588-1590.
30. Ozen H, Ekici S, Uygur MC, Akbal C, Sahin A. Repeated transurethral resection and intravesical BCG for extensive superficial bladder tumors. *J Endourol.* 2001; 15: 863-7.
31. Bilen CY, Inci K, Erkan I, Ozen H. The predictive value of purified protein derivative results on complications and prognosis in patients with bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 2003; 169:1702-1705.
32. Keskin MS. M. phlei, M. smegmatis: Patojen olmayan mikobakteri türlerinin antitümöral etkileri, (Tıpta Uzmanlık Tezi), Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Ankara 2004.
33. Orhan B. *Mycobacterium phlei* hücre ekstraktlarının sitokin aktivasyon ve antifungal etkisi, etkiden sorumlu bileşenlerin araştırılması, (Tıpta Uzmanlık Tezi), Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara 2008.
34. Orhan B, Büber E, Keskin S, et al. Therapeutic effects of *Mycobacterium phlei* cell wall extracts. *Turk J Med Sci* 2012; 42: 193 – 199.
35. Yuksel ZS, Buber E, Kocagoz T, et al. *Mycobacterial* strains that stimulate the immune system most efficiently as candidates for the treatment of bladder cancer. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2011; 20: 24 – 28.
36. Ertürk Z. Mesane tümörünü tedavi edici etkiden sorumlu mikobakteri hücre duvarı bileşenlerinin HPLC ile ayrıştırılması (Bilim Uzmanlığı Tezi), Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara 2008.