T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanserinde; Uzun Kodlamayan RNA ZEB-1 AS-1 ve miR-200b Ekspresyonlarının Klinik ve Histopatolojik Parametreler ile İlişkisi

Dr. Mehmet Enes DEĞİRMENCİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Öner ŞANLI

İSTANBUL 2023

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanserinde; Uzun Kodlamayan RNA ZEB-1 AS-1 ve miR-200b Ekspresyonlarının Klinik ve Histopatolojik Parametreler ile İlişkisi

Dr. Mehmet Enes DEĞİRMENCİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Öner ŞANLI

İSTANBUL 2023

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimimi bitirip hayallerimi gerçekleştirmek için yeni bir yolculuğa çıkıyorum ve bu süreçte beni bu yolculuğa en güzel şekilde hazırlayan; hiçbir zaman bana desteğini esirgemeyen saygıdeğer anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Faruk Özcan'a, tez danışmanım olan ve büyük bir çaba ile yapılan bu tezde, tecrübe ve bilgilerini benimle paylaşan; öğrencisi olmaktan onur duyduğum Prof. Dr. Öner Şanlı'ya şükranlarımı sunarım.

Kliniğe adım attığım ilk anda tanıdığım, varlığı her zaman bana güven veren ve kalbimde yeri hep ayrı kalacak olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Taner Koçak'a, kendi tarzıyla akademinin farklı bir yüzünün de olduğunu gösteren ve çalışma fırsatı bulduğum için çok şanslı hissettiren Prof. Dr. Tayfun Oktar'a, tezimin hazırlanmasında verdiği destek gerekse de akademik hayatımda bana kattığı bilgiler için Doç. Dr. Selçuk Erdem'e ve tezimin bu aşamaya gelmesinde büyük pay sahibi olan Prof. Dr. Canan Küçükgergin'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu klinikte olmanın onurunu ve gururunu hissettiren, asistanlık eğitimime katkıda bulunan tüm saygıdeğer hocalarıma teşekkür ederim.

Zor zamanları birlikte atlattığım, artık ailemden biri olarak gördüğüm, aramızda saygı ve sevginin bir an eksilmediği asistan arkadaşlarım, sizlerin desteği olmasa bu çalışma tamamlanamazdı ve her zaman büyük özveriyle çalışan ve hakları ödenmeyecek olan hastane emekçileri; sizler de olmasaydınız bu yol bu kadar güzel yürünmezdi. Gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatımın en başından itibaren bu aşamaya gelmemde büyük pay sahibi olan ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan biricik annem Ayşen Değirmenci'ye, canım kardeşim Erdem Değirmenci'ye, ileri görüşü ve cesaretiyle örnek aldığım; babam Mehmet Değirmenci'ye de şükranlarımı sunarım.

Son olarak; içimdeki bitmeyen öğrenme hevesi ile çıktığım yolculukta tanıştığım, ufkumu açan ve bana ilham kaynağı olan tüm insanlara teşekkür ederim.

Dr. Mehmet Enes DEĞİRMENCİ

Ağustos 2023-İstanbul

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... **İİ**

ÖNSÖZ ..... **İİİ**

İÇİNDEKİLER ..... **İV**

KISALTMALAR ..... **Vİ**

TABLO, GRAFİK VE ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **Vİİ**

ABSTRACT ..... **İX**

ÖZET **1**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **2**

2. GENEL BİLGİLER **5**

2.1. MESANE MORFOLOJİSİ 5

2.1.1. Mesane Anatomisi *5*

2.1.2. Mesane Histolojisi *6*

2.2. MESANE KANSERİ ETİYOLOJİ 7

2.2.1. Tütün *7*

2.2.2. Mesleki Etkenler *7*

2.2.3. Genetik *7*

2.2.4. Beslenme alışkanlıkları *8*

2.2.5. Çevresel Maruziyet *8*

2.2.6. Diğer Faktörler *8*

2.3. MESANE KANSERİ SINIFLANDIRILMASI 9

2.3.1. Tümör, Nod, Metastaz Sınıflaması (TNM) *9*

2.3.2. Histolojik Derecelendirme *10*

2.3.2.1. 1973 WHO derecelendirme sistemi: 10

2.3.2.2. 2004-2016 WHO/ISUP derecelendirme sistemi: 10

2.3.3. Karsinoma insitu ve sınıflandırılması *10*

2.3.4. Ürotelyal Karsinomun Alt Tipleri *10*

2.4. EPİGENETİK 11

2.5. KODLAMAYAN RNA'LAR (NCRNA'LAR) 12

2.5.1. Kodlamayan RNA'ların sınıflandırılması *12*

2.5.1.1. MikroRNA'lar (MiRNA) 13

2.5.1.1.1. Mir200b 13
2.5.1.2. Long non-coding RNA (LncRNA) 14
2.5.1.2.1. ZEB1 Antisense RNA 1 (ZEB1-AS1) LncRNA 14
2.5.1.3. mir-200 b'nin ZEB-1 ile ilişkisi 16

3. GEREÇ VE YÖNTEM 17

3.1. Çalışma Grupları 17
3.2. Çalışma Materyali 17
3.3. Kullanılan Cihazlar 17
3.4. Kullanılan Malzemeler 18
3.5. Kullanılan Yöntemler 18
3.5.1. ZEB-1 AS-1 ve miR-200b Gen Ekspresyonlarının Tayini 18
3.5.1.1. Dokuda RNA İzolasyonu: 18
3.5.1.2. mir200b cDNA Sentezi 19
3.5.1.3. mir200b cDNA sentez reaksiyonu 19
3.5.1.4. Real Time PCR Reaksiyonu (mir200b) 20
3.5.1.5. ZEB-1 AS-1 cDNA Sentezi 20
3.5.1.6. Real Time PCR Reaksiyonu (ZEB-1 AS-1) 21
3.6. İstatistiksel Analizler 22

4. BULGULAR 23

4.1. Hasta Grubunun Demografik ve Klinik Özellikleri 23
4.2. Dokularda Bakılan ZEB-1 AS-1 ve miR200b Ekspresyon Sonuçları 24
4.3. Tümörlü Doku Histopatolojik Özellikleri ile ZEB-1 AS-1 ve miR200b Ekspresyonları İlişkisi 26
4.4. Klinik Paremetreler ile ZEB-1 AS-1 ve miR200b Ekspresyonları İlişkisi 33
4.5. Tümörlü Dokuda Bakılan ZEB-1 AS-1 ve miR200b Ekspresyon Düzeylerinin ROC Analizi Sonuçları 34

5. TARTIŞMA 37

6. SONUÇ 42

KAYNAKÇA 43

KISALTMALAR

MK: Mesane kanseri

TUR-MT: Transüretral Mesane Kanseri Rezeksiyonu

LncRNA: Long non Coding RNA

MiRNA: Micro RNA

NcRNA: Non coding RNA

ZEB: Zinc Finger Homeodomain Enhancer-Binding Protein

UTR: Untranslated Region

qRT-PCR: Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

WHO: World Health Organization

ISUP: International Society of Urological Pathology

CIS: carsinoma in situ

ÜK: Ürotelyal karsinom

ÜÜS: Üst Üriner Sistem

EMT: Epithelial–mesenchymal transition

VKİ: Vücut Kitle İndexi

PCR: Polymerase chain reaction

AÜSS: Alt Üriner Sistem Semptomları

KİOMK: Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanseri

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

AUC: Area under the curve

TABLO, GRAFİK VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablo 1: Mesane tümörü içeren ve içermeyen dokuların demografik ve klinik özellikleri

Tablo 2: Mesane tümörlü ve tümörsüz dokuları arasındaki ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyonları

Tablo 3: Patolojik evrelerine göre ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki

Tablo 4: ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin tümör grade'leri ile ilişkisi

Tablo 5: ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin patolojik evresi Ta olan grupta grade'lere göre ilişkisi

Tablo 6: ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin CIS varlığı ile ilişkisi

Tablo 7: ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin eşlik eden varyant patoloji ile ilişkisi

Tablo 8: ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin sigara içen ve içmeyenlerle ilişkisi

Tablo 9: ZEB-1 AS-1 ROC Analizi sonucu Cut Off ve AUC değeri

Tablo 10: mir200b ROC Analizi sonucu Cut Off ve AUC değeri

Grafik 1: Dokulara göre ZEB-1 AS-1 ekspresyon düzeyleri

Grafik 2: Dokulara göre mir200b ekspresyon düzeyleri

Grafik 3: Histopatolojik grade'lere göre tümörlü dokudaki ZEB-1 AS-1 ekspresyon düzeyleri

Grafik 4: Histopatolojik grade'lere göre tümörlü dokudaki mir200b ekspresyon düzeyleri

Grafik 5: Histopatolojik evre ve grade'lere göre tümörlü dokudaki ZEB-1 AS-1 ekspresyon düzeyleri

Grafik 6: Histopatolojik evre ve gradelere göre tümörlü dokudaki mir200b ekspresyon düzeyleri

Grafik 7: CIS ile ZEB-1 AS-1 ekspresyon düzeyleri ilişkisi

Grafik 8: CIS ile mir200b ekspresyon düzeyleri ilişkisi

Grafik 9: Varyant patoloji ile ZEB-1 AS-1 ekspresyon düzeyleri ilişkisi

Grafik 10: Varyant patoloji ile mir200b ekspresyon düzeyleri ilişkisi

Grafik 11: ZEB-1 AS-1 ve mir200b gen ekspresyonları arası korelasyon grafiği

Grafik 12: ZEB-1 AS-1 ROC Analizi sonucu Cut Off ve AUC değeri

Grafik 13: mir200b ROC Analizi sonucu Cut Off ve AUC değeri

Şekil 1: Mesane anatomisi

Şekil 2: ZEB1-AS1'in çeşitli tümörlerdeki etki mekanizmaları

ABSTRACT

Introduction and Aim: Despite the increasing significance of biomarkers for the early diagnosis and prognosis determination of bladder cancer (BC), there is currently no routinely used biomarker for the diagnosis and monitoring of this disease. Understanding the effects of candidate genomic structures on tumor pathogenesis is crucial for the development of a biomarker in the process. In the context of the relationship between Long Non-Coding RNA ZEB-1 AS-1 (ZEB-1 AS-1) and MicroRNA200b (mir200b) and BC in in vitro models, they emerge as potential biomarkers. Although the relationship between both genomic structures and BC has been demonstrated in an in vitro environment, this relationship has not been sufficiently investigated at the tissue level (in vivo). This study aims to investigate the relationship between the potential biomarker candidate ZEB-1 AS-1, the intermediary role of mir200b, and the clinical and pathological variables of BC at the tissue level.

Methods: This study included 50 patients diagnosed with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) who presented to the Department of Urology, Urologic Oncology Division, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul University, between May 2022 and April 2023. Tumor and non-tumor tissue samples obtained during transurethral bladder tumor resection (TUR-BT) were evaluated. The expression levels of ZEB-1 AS-1 and mir200b were measured simultaneously using the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) method. Subsequently, the diagnostic and tumor biomarker value of these Non-Coding RNAs (ncRNAs) were evaluated along with their relationship with disease-related clinical and pathological variables.

Results: The expression levels of both ZEB-1 AS-1 and mir200b in tissue samples obtained from patients with non-muscle-invasive bladder cancer were statistically significantly higher in tumor tissue compared to non-tumor tissue ($p=0.018$; $p=0.034$, respectively). Additionally, it was found that the expression levels of ZEB-1 AS-1 and mir200b were significantly increased in patients with high-grade tumors compared to those with low-grade tumors. Regarding ZEB-1 AS-1 and mir200b expression levels, there was no statistically significant difference in terms of other pathological parameters, including tumor stage (Ta vs. T1), presence of carcinoma in situ (CIS), and variant histology. ROC analysis revealed sensitivities and specificities of 48% and 90%, and 40% and 82% for ZEB-1 AS-1 and mir200b tissue expression values, respectively, in detecting bladder tumors.

Conclusion: Both assessed markers are expressed at the tissue level and are associated with

certain histopathological parameters of bladder tumors. The data obtained from this study will contribute to the development of urinary biomarkers involving both genomic structures.

Keywords: bladder cancer, miRNA, lncRNA, ncRNA, mir200b, LncRNA ZEB-1 AS-1, tumor biomarkers.

ÖZET

Giriş ve Amaç: Mesane kanseri (MK)'nin erken tanısında ve prognozun belirlenmesi amacıyla biyobelirteçlerin varlığı önem kazanmasına karşın; bu hastalığın tanısı ve takibi için rutinde kullanılan bir biyobelirteç bulunmamaktadır. Bir biyobelirtecin geliştirilme sürecinde aday genomik yapıların tümör patogenezi üzerindeki etkilerinin bilinmesi önemlidir. Invitro modellerde LncRNA ZEB-1 AS-1 (ZEB-1 AS-1)[1] ve MicroRNA200b (mir200b)'nin MK ile ilişkisi göz önüne alındığında, aday bir biyobelirteç olarak öne çıkmaktadırlar. Her iki genomik yapı ile MK arasındaki ilişki invitro ortamda gösterilmiş olmasına karşın bu ilişki doku düzeyinde (invivo) yeterince araştırılmamıştır. Bu çalışmamızda potansiyel bir biyobelirteç adayı olan ZEB-1 AS-1 ve ZEB-1 AS-1 ile MK arasındaki ilişkinin bir aracı olarak görülen mir200b'nin doku düzeyleri ile MK'nin klinik ve patolojik değişkenleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Metod: Bu çalışmaya İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Ürolojik Onkoloji Bilim Dalı'na başvuran Mayıs 2022 ve Nisan 2023 yılları arasında kasa invaze olmayan mesane kanseri (KİOMK) tanısı alan 50 hasta dahil edildi. Bu hastalara yapılan transuretral mesane tümörü rezeksiyonu (TUR-MT) işlemi sırasında alınan tümörlü ve tümörsüz doku örnekleri değerlendirmeye alındı. Eş zamanlı Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Ardından bu Non coding (ncRNA)'ların hem tanısal hem de tümör biyobelirteçleri olarak değeriyle birlikte hastalıkla ilgili klinik ve patolojik değişkenlerle aralarındaki ilişki araştırıldı.

Bulgular: Kasa invaze olmayan mesane kanseri olan hastalarından alınan doku örneklerindeki hem ZEB-1 AS-1 hem de mir200b ekspresyon düzeylerinde tümörlü dokuda tümörsüz dokuya göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla p=0,018; p=0,034). Bunun yanında, ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin yüksek grade'li tümör saptanan hastalarda düşük grade'li tümörü bulunanlara göre istatiksel olarak anlamlı olarak artmış olduğu tespit edildi. ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeyleri açısından diğer patolojik parametreler değerlendirildiğinde; tümör evresi (Ta *vs.* T1), karsinoma in situ (CIS) bulunması ve

[1] Tüm metin boyunca LncRNA ZEB-1 AS-1; ZEB- AS-1 olarak, benzer şekilde MicroRNA200 b ise mir200 b olarak geçmektedir.

varyant histoloji varlığı açısından istatiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. ROC analizinde ZEB-1 AS-1 ve mir200b doku ekspresyon değerlerinin mesane tümörünü göstermedeki duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %48 ve %90; %40 ve %82 olarak saptandı.

Sonuç: Bu çalışmada değerlendirilen her iki belirteç de doku düzeyinde eksprese edilmekte ve mesane tümörünün bazı histopatolojik parametreleri ile ilişki göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler her iki genomik yapıyı içeren üriner biyobelirteç geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar kelimeler: mesane kanseri, miRNA, LncRNA, ncRNA, mir200b, LncRNA ZEB-1 AS-1, tümör biyobelirteçleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri (MK) her iki cinsiyet birlikte değerlendirildiğinde dünyada en sık görülen 10. kanserdir (1). Daha sık görüldüğü erkeklerde ise 7. sıradadır. Dünya genelinde yaşa göre bakıldığında sıklık oranı (100.000 kişi/yıl) erkeklerde 9.5 ve kadınlarda 2.4'tür (1). Mesane kanserinin etiyolojisinde; tütün ürünleri, mesleki karsinojenlere maruziyet, kronik sistit varlığı, siklofosfamid kullanımı, pelvik bölgeye radyoterapi, cinsiyet, ırk ve bazı genetik faktörler yer almaktadır (2).

Son yıllardaki genom analizi araştırmalarında, insan genomunun %98'inin protein kodlamayan (non-coding [nc]) bölgelerden oluştuğu; ancak bu bölgelerin önemli bir kısmının transkripsiyona uğradığı tespit edilmiştir. Nükleik asitlerin fonksiyonlarının ilk tanımlandığı dönemlerde evrimsel kalıntı gözüyle bakılan nc bölgelerinin ve bu bölgelerden transkripte edilen RNA'ların (ncRNA), hücrelerin gelişim ve farklılaşma süreçlerinde rol aldığı ve diğer hücresel süreçleri kontrol etmede önemli görev aldığı gösterilmiştir (3-5).

NcRNA'lar nükleotit sayılarına göre üç grupta sınıflandırılmıştır. Bunlar sırasıyla 21-25 nükleotit uzunluğunda olan mikro RNA'lar, translasyon aşamasının kontrolünde rol alan 100-200 nükleotitten oluşan küçük RNA'lar (small RNA'lar) ve gen supresyonunda rol alan 10.000 nükleotitten daha fazla uzunlukta olan kodlamayan uzun RNA'lar olarak sayılabilir (4).

Biyolojik ve fizyolojik rollerinin aydınlatılmaya başlanmasıyla ncRNA'ların hastalıklarla ilişkisi de araştırmalara konu olmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalar ncRNA'ların nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve onkolojik hastalıklar da dahil pek çok hastalık etiyopatogenezinde rol aldığını göstermektedir (6).

MikroRNA'lar (miRNA) transkripsiyonel-postranskripsiyonel gen düzenlenmesinde önemli role sahip bir ncRNA grubudur. İlk olarak 1993 yılında Lee ve ark. (7) tarafından keşfedilmelerinden sonra gerek fizyopatolojik süreçlerdeki rolleri; gerekse bu fonksiyonlarını ortaya koymalarına aracılık eden moleküler mekanizmalar geniş olarak araştırılmıştır. miRNA'lar öncüller halinde sentezlendikten sonra Drosha ve Dicer olarak adlandırılan iki endoribonükleaz tarafından olgunlaştırılmaktadır. Olgun miRNA'lar "RNA-induced silencing complex" (RISC) olarak adlandırılan bir komplekse katılmakta ve hedef mRNA'da komplementer özellikteki nükleik asit dizileriyle mRNA ekspresyonunun azaltılmasına aracılık etmektedirler (8). miRNA'lar post-transkripsiyonel süreçte düzenleyici olmakla beraber hücrenin gelişimsel sürecinde, apoptoz, hücre proliferasyonu ve onkogenez gibi çok sayıda biyolojik süreçlerde rol

oynayabilmektedirler (9).

miRNA ekspresyon profilleri onkolojik hasta gruplarında değerlendirildiğinde, sadece tümörsüz ve tümörlü dokularda değil; metastatik dokularda da farklı olarak eksprese edildikleri gösterilmiştir. miRNA'ların ekspresyonlarının dokulara spesifik olması, patolojik durumlarda değişim gösterebilmeleri ve bu değişikliklerin biyolojik sıvılara da yansıyabilmeleri, onları potansiyel "biyobelirteç adayları" konumuna getirmiştir (12,13).

Mikro RNA'lar arasından mir200 ailesi en iyi araştırılan fonksiyonel miRNA'lar arasında olup, "tümör baskılayıcı" olarak görev yaptıkları kabul edilmektedir. mir200 ailesinin ekspresyon düzenleyici etkileri Zinc finger E-box binding homeobox 1 ve 2 (ZEB1-2) tarafından inhibe edilmekte ve bu etkisini 3'- Untranslated Region (UTR)'lerine doğrudan bağlanarak yapmaktadır. Böylece tümör metastazlarının baskılanması, kanser kök hücrelerinin kendini yenilemesi ve farklılaşmasının inhibisyonu ve kemorezistansın tersine çevrilmesi meydana gelmektedir (10, 11).

Diğer taraftan, insan genomunda 10.000'den fazla LncRNA kodlayan gen olduğu ve genel olarak bakıldığında hücrelerde yaklaşık 60.000 sayıda LncRNA'nın transkripte edildiği tahmin edilmektedir (12). LncRNA'lar çekirdekte veya sitozolde bulunur ve birçok LncRNA dokuya özgü bir şekilde ifade edilir. LncRNA'lar; DNA epigenetik işleyişinde modifikasyona yol açma, transkripsiyon ve post-transkripsiyon gen düzenleme süreçleri, RNA kodlanması ve translasyonu gibi düzenleyici işlevlere sahiptir (12).

Kandaki ncRNA paternleri ise spesifik bir tümörün varlığını dolaylı olarak yansıtır ve bu nedenle tanısal ve prognostik açıdan büyük önem taşır. Kanda bakılması kolayca elde edilebilirlik açısından başarılı görünmekle birlikte MK hastalarından alınan bu materyallerde ncRNA'ların saptanmasına ilişkin raporlar çok nadiren yayınlanmıştır ve hastanın diğer hastalıklarının da kanda bakılan ncRNA profilinde değişikliklere yol açtığı görülmüş olup dokuda bakılmasının daha önemli olduğu düşünülmüştür (13).

Son dönemdeki önemli gelişmelerden birisi de bu çalışmada da kullanılan ve dokuda genomik yapıların kantitatif olarak değerlendirilmesini sağlayan eş zamanlı Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) teknolojisidir. Bu teknoloji literatürde MK bulunan hastalarda farklı miRNA ve LncRNA ekspresyonunun değerlendirilmesi için kullanılmıştır (14). Örneğin çalışmamıza metodolojik olarak benzeyen Guo ve ark.'larının çalışmasında; ZEB1- AS1'in mesane kanserinde upregüle edildiği, yüksek tümör derecesi ve yüksek TNM evresi ile korelasyon gösterdiği ve hastaların kötü prognozu için prediktif olduğu rapor edilmiştir (15).

Böylece qRT-PCR yöntemi kullanılarak kolayca ölçülebilen bu genomik yapıların kasa invaze olmayan mesane kanserinde (KİOMK); tanı, risk hesaplaması ve tedavi için miRNA'lar ve LncRNA'lara yönelik yeni noninvazif stratejilere katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

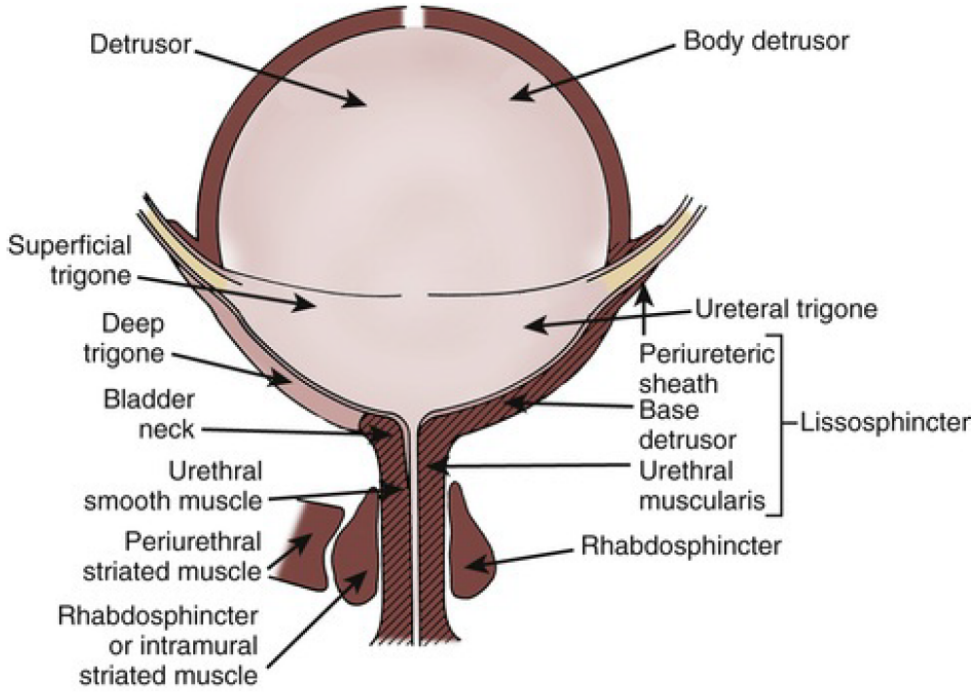
Bu bilgilerin ışığında, bu çalışmada dokuda değerlendirilen ZEB-1 AS-1, ve miR-200b ekspresyonlarının KİOMK'nde klinik ve histopatolojik parametreler ile ilişkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Morfolojisi

2.1.1. Mesane Anatomisi

Mesane, pelviste pubik kemiklerin hemen arkasında yer alan üstü peritonla örtülü çoğunlukla ekstraperitoneal bir organdır (16). Üst kısım (kubbe), tipik olarak epitel ile kaplı, ancak oblitere edilmiş fibröz bir embriyolojik yapı olan urakus ile süreklilik içindedir. Urakus karın ön orta hattı boyunca devam eder ve umblikusta son bulur (16). Mesane; üreteral orifislerin üzerinde seyreden bir gövde, mesane boynu ve trigondan oluşmaktadır; bu iki alan nöromorfoloji ve nörofarmakoloji açısından farklı fakat kendi içinde homojendir (17). Mesane tabanı, trigonun altında uzanan yüzeysel uzunlamasına bir tabaka ile laminer bir yapıya sahiptir. Mesane boynu prostat tabanına sıkıca yapışıktır ve mesanenin ürotelyumu prostatik üretra ile devamlılık halindedir. Bebeklerde mesane intraabdominaldir ve ergenlik döneminde gerçek pelvise doğru hareket eder (16).



Şekil 1: Anatomy of the bladder and its outlet (18).

2.1.2. Mesane Histolojisi

Mesane duvarının mikroskobik yapısı, içten dışa doğru aşağıdaki katmanlara ayrılır (19).

- Epitelyum
- Lamina propria
- Muscularis propria
- Seroza/Adventisya

Epitelyum: Özel bir tabakalı epitel olan ürotelyumdur. Ürotelyum, yalnızca üreter, idrar kesesi ve proksimal üretra gibi idrar yapılarında bulunur (20).

Ürotelyum üç farklı histolojik katmandan oluşur:

- Apikal tabaka-en içteki tabaka, mesane lümeni ile altındaki tabaka arasında bir bariyerdir. Sıklıkla iki çekirdekli olan şemsiye şeklindeki hücrelerden oluşan tek bir tabakadır. Ürotelyumun bu apikal şemsiye hücreleri sıkı bir bariyer oluşturur. Hücreler arasındaki sıkı bağlantılar paraselüler akışı azaltırken, şemsiye hücrelerin yüzeyindeki glikoprotein üroplakin tabakası yüzeysel alanı kaplayan yüzeysel bir plak oluşturur.
- Ara tabaka-iki ila üç çokgen hücre katmanından oluşur.
- Bazal tabaka-iki ila üç küçük kübik hücre katmanından oluşur.

Ürotelyum, mesane gevşediğinde beş ila yedi yapısal katmana döner. Bununla birlikte, mesane duvarı, mesane idrarla dolduğunda artan hacmi karşılamak için gerilir. Ürotelyum, şişmiş mesanede yapısal bir hasar olmaksızın iki veya üç tabaka halinde yeniden düzenlenir. Ürotelyumun bu geçiş yeteneği nedeniyle geçiş epiteli (transisyonel epitel) olarak da bilinir.

Lamina Propria: Ürotelyum ile alttaki muskularis propriayı (detrüsör kası) ayıran subürotelyal tabakadır. Bir bazal membran tabakası, üstteki ürotelyumu lamina propriadan ayırır. Bu katman, kılcal damarlar, lenfatikler, immün hücreler, sinir uçları, fibroblastlar, miyofibroblastlar, adipositler, Cajal'ın interstisyel hücreleri, kas hücreleri ve muskularis mukozadan oluşur (21).

Cajal'ın interstisyel hücreleri, lamina propria içindedir; düz kas hücreleri ve sinir uçlarıyla bir sinsityum oluştururlar. Cajal'ın interstisyel hücreleri, farklı dokularda çok işlevlidir. Bağırsak, üretra ve prostatta kalp pili hücreleri olarak işlev gördükleri bilinmektedir. Bununla birlikte, mesanede, mesanenin düz kas hücrelerine sinir sinyali transdüserleri gibi davranırlar (22).

Muscularis propria: Detrüsör kası olarak da bilinir**.** Üç alt tabakadan oluşur; içte uzunlamasına, ortada sirküler ve dışta uzunlamasınadır. Bu alt tabakalar mesane boynu seviyesinde iyi tanımlanmış olup mesanenin geri kalanında rastgele sıralanmıştır.

Seroza: Mesane kubbesini örten ve karın duvarının peritoneal tabakası ile devam eden ince bir bağ dokusu tabakasıdır. Ayrıca çeşitli boyutlarda kan damarları içerir.

Adventisya: Seroza olmayan mesane bölgelerinde mesanenin dış tabakası olarak işlev gören gevşek bir bağ dokusu tabakasıdır (23).

2.2. Mesane Kanseri Etiyoloji

2.2.1. Tütün

Tütün kullanımı, vakaların yaklaşık %50'sini oluşturan, MK için önemli bir risk etkenidir (24). Renal atılıma uğrayan tütün dumanından açığa çıkan aromatik aminler ve aromatik hidrokarbonlar, MK gelişimi ile ilişkilidir. MK riski, sigaraya maruziyet süresi ve paket yıl fazlalığıyla artmaktadır (24). Düşük katranlı sigaraların daha düşük bir MK oluşum riski ile ilişkili olmadığı düşünülmektedir (24).

Elektronik sigaralarla ilişkili risk yeterince değerlendirilmemiştir; ancak, elektronik sigara ile idrarda karsinojenler tespit edilmiştir (25). Tütün dumanına ikinci taraf olarak maruz kalma da artmış MK riski ile ilişkilidir (24).

2.2.2. Mesleki Etkenler

Endüstriyel tesislerde kullanılan boya, metal ve petrol ürünlerini işleyen kişilerin bu ürünlerden açığa çıkan aromatik aminler, aromatik ve klorlu hidrokarbonlar gibi maddelere maruziyet ise tüm vakaların yaklaşık olarak %10'unu oluşturmakta olup MK için en önemli ikinci risk faktörüdür (24).

Son yıllarda gelişmiş endüstriyel faaliyetlerdeki bu riskler, iş güvenliğine uyum sağlanarak azaltma eğilimindedir. Bu nedenle de günümüzde kimya endüstrisinde çalışan işçiler genel popülasyona bakıldığında daha yüksek bir MK insidansına sahip değiller (24). Son zamanlarda, dizel egzozuna mesleki olarak maruziyetin artışının ise önemli bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (26).

2.2.3. Genetik

Mesane kanserinde aile öyküsünün öneminin yüksek bir oranda olmadığı düşünülmektedir (27). Bugüne kadar, klinik olarak ilgili hiçbir genetik değişiklik, MK ile

ilişkilendirilememiştir. Ancak birinci ve ikinci derece akrabalarda bilinen MK risk artışının sebebi ise genetik yatkınlığın diğer risk faktörlerine karşı daha yüksek bir duyarlılığa yol açtığı ve bu şekilde açıklanabileceği düşünülmektedir (28). Şu anda, MK için genetik taramayı destekleyen yeterli kanıt yoktur.

2.2.4. Beslenme alışkanlıkları

Diyet alışkanlıklarının MK gelişimi üzerinde sınırlı bir etkisi var gibi görünmektedir. Flavonoidlerin koruyucu etkisiolduğu düşünülmekle birlikte; orta düzeyde protein tüketimi ile fazla miktarda sebze ve çeşitleri, ansatüre yağ (zeytinyağı) tüketimi ile ilişkili kabul edilen edilen Akdeniz diyeti, MK riskinde bir miktar azalma ile ilişkilendirilmiştir (29-32). Artan meyve tüketiminin etkisinin kadınlarda MK riskinin azalmasında anlamlı olduğu tespit edilmiştir (33).

2.2.5. Çevresel Maruziyet

Su faktörünün etkisi net olmasa da içme sularının klorlanması ve sonrasında oluşan trihalometan seviyeleri potansiyel olarak kanserojendir. Ek olarak, içme suyunda arseniğe maruz kalmanın MK riskini arttırdığı öne sürülmüştür (24). Arsenik alımı ve sigaranın kombine etkisi vardır (34).

Saç boyası kullanımı ile MK riski arasındaki ilişki belirsizliğini korumaktadır; NAT2 asetilasyonu ile ilişkili olduğu düşünülen saç boyası kullanan kişilerde artmış bir risk olduğu öne sürülmüştür (24). Ancak geniş bir prospektif kohort çalışması, saç boyası kullanımın kansere yol açtığı, riski arttırdığı veya ölüm oranlarında artışa sebep oluğu ile net bir ilişki henüz belirlenememiştir (35).

2.2.6. Diğer Faktörler

Metabolik faktörlerin (kan şekeri, kolesterol ve trigliseritler) ve kan basıncı, nabız, vücut kitle indeksi gibi klinik durumların etkisi net olarak belirlenememiştir (36). Yapılan çalışmalar dolaşımdaki yüksek D vitamini düzeylerinin MK oranında azalmaya yol açabileceğini düşündürmektedir (37). Parazitik bir trematodun neden olduğu bir enfeksiyon olan şistozomiyazis, MK'ne yol açabilir (24). Pelvik iyonize edici radyasyona maruz kalma da artmış MK riski ile ilişkilidir (38).

2.3. Mesane Kanseri Sınıflandırılması

2.3.1. Tümör, Nod, Metastaz Sınıflaması (TNM)

Mesane kanserinde 2017 TNM klasifikasyonu yaygın kabul gören sınıflandırma sistemidir.

T- Primer Tümör

Tx- Primer Tümör Değerlendirilememiş

T0- Primer Tümöre ait kanıt yok

Ta- İnvaziv olmayan Papiller Karsinom

Tis- Karsinoma in situ

T1- Subepitelyal bağ doku invazyonu

T2- Kas invazyonu

T2a- Yüzeyel Kas Dokusu İnvazyonu

T2b- Derin Kas Dokusu İnvazyonu

T3- Perivezikal Doku İnvazyonu

T3a- Mikroskobik

T3b- Makroskobik (Ekstravezikal kitle mevcut)

T4- Ekstravezikal komşu organ tutulumu

T4a- Prostat stroması, seminal vezikül, uterus veya vajina invazyonu

T4b- Pelvik duvar veya karın duvarı invazyonu

N- Bölgesel Lenf Düğümleri

Nx-Lenf Düğümü Değerlendirilemez

N0- Bölgesel Lenf Düğümü Metastazı Yok

N1- Gerçek Pelviste Tek Lenf Nodu Metastazı (hipogastrik, obturator, eksternal iliak veya presakral)

N2- Gerçek Pelviste Multipl Lenf Nodu Metastazı ((hipogastrik, obturator, eksternal iliak veya presakral)

N3- Ana İliak Lenf Nodu Metastazı

M- Uzak Metastaz

M0-Uzak metastaz yok

M1-Uzak metastaz var

M1a- Bölgesel lenf düğümleri dışında lenf düğümlerine metastaz

M1b- Diğer uzak metastazlar

2.3.2. Histolojik Derecelendirme

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Ürolojik Patoloji Cemiyeti (ISUP) tarafından yeni derecelendirme sistemi hazırlanarak 2004 yılında yayınlanmış ve 2016 yılında güncellenmiştir.

Önceki derecelendirme sistemine göre daha detaylı histolojik tanımlar kullanılmıştır.

2.3.2.1. 1973 WHO derecelendirme sistemi:

Üretelyal papilloma

Grade 1: İyi differansiye

Grade 2: Orta differansiye

Grade 3: Kötü differansiye

2.3.2.2. 2004-2016 WHO/ISUP derecelendirme sistemi:

Ürotelyal papilloma

Düşük malign potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm

Düşük gradeli karsinom (Low Grade)

Yüksek gradeli karsinom (High Grade)

2.3.3. Karsinoma insitu ve sınıflandırılması

Karsinoma insitu (CIS), intraepitelyal, yüksek gradeli, invazif olmayan bir ürotelyal karsinom (ÜK)'dur. Biyopsi yapılmadığı takdirde sistoskopi sırasında gözden kaçabilir veya inflamatuar bir lezyon olarak yanlış yorumlanabilir. CIS sıklıkla multifokaldir ve mesanede aynı zamanda üst üriner sistem (ÜÜS), prostatik kanallar ve üretrada da ortaya çıkabilir (39).

2.3.4. Ürotelyal Karsinomun Alt Tipleri

Kullanılan ürotelyal karsinom alt tipleri şunlardır (40).

1. Ürotelyal karsinom (tüm vakaların %90'ından fazlası)
2. Kısmi skuamöz ve/veya glandüler farklılaşma gösteren ürotelyal karsinomlar
3. Mikropapiller ürotelyal karsinom
4. Yuvalanmış/mikrokistik varyant
5. Büyük iç içe varyant
6. Mikrotübüler ürotelyal karsinom
7. Plazmasitoid, taşlı yüzük
8. Lenfoepitelyoma benzeri
9. Dev hücre, yaygın, farklılaşmamış

10. Sarkomatoid ürotelyal karsinom
11. Diğer nadir farklılaşmalara sahip bazı ürotelyal karsinomlar
12. Kısmi Nöroendokrin tümörlü ürotelyal karsinomlar
13. Saf nöroendokrin karsinom (küçük ve büyük hücreli nöroendokrin karsinomlar)

2.4. Epigenetik

Kelime olarak genetik üstü/ötesi anlamına gelen epigenetik, gen ifadesinde bir değişiklik olmadan gen ifadesinde meydana gelen değişiklikleri açıklar. Epigenetik kavramı ilk olarak 1939 yılında C.H. Waddington'un drosophila'nın normal ve mutant suşlarında kanat gelişimini araştırdığında ortaya çıkmıştır (41). Esteller ise bu kavramı "fenotipi var eden genler ve ürünleri arasındaki etkileşimler" olarak tanımlamıştır (42).

Epigenetik; başta miRNA olmak üzere kodlamayan RNA molekülleri ile *DNA metilasyonu*, *histon modifikasyonu* ve tüm bunların birbirini etkileyen kompleks ilişkilerinden meydana gelmektedir (43). Giriş bölümünde kısaca verilen ncRNA'lar DNA metilasyonunda da etkin rol oynamaktadır.

Normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinin genlerinde önemli DNA hipometilasyonunun bulunduğunun ortaya konulması, hipermetilasyonu bulunan tümör baskılayıcı genleri tanımlayan çalışmaların yapılması fikrini doğurmuştur. DNA metilasyonunun karmaşık bir kromatin ağında meydana geldiği ve histon yapısındaki değişikliklerden etkilendiği gösterilmiştir (44). DNA metilasyonu, gen aktivitesinin ve nükleer mimarinin kontrolünde kritik bir rol oynar ve dinükleotit CpG'ler olarak adlandırılan guaninlerden önce gelen sitozinlerde meydana gelir (45). Dinükleotit CpG'ler, birçok genin düzenleyici bölgesinin 5¢ ucunu kapsayan, CpG adaları olarak bilinen CpG bakımından zengin bölgelerde bulunur. DNA metilasyonunun tümör oluşumunda değişken bir rolü vardır. Ancak genel olarak bilinen genomik DNA'nın hipometilasyon derecesinin, bazı tümörler de iyi huylu hücre proliferasyonlarından invaziv kanserlere doğru ilerledikçe arttığıdır.

Hipometilasyonun tümör gelişimine katkısını açıklamak için önerilen üç mekanizma, kromozomal instabilite oluşumu, yer değiştirebilen elementlerin reaktivasyonu ve imprinting[2] kaybıdır (46). DNA hipermetilasyonu ayrıca tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu değiştirerek tümör oluşumuna neden olabilir.

[2] İmprinting: İfade edilebilir durumdaki genin baskılanması

Histonların modifikasyonu, daha az karakterize edilmiş başka bir epigenetik modifikasyon mekanizmasıdır. Histonlar, kromatinin ana protein bileşenidir. Nükleozom ise 146 baz çift DNA'yı saran ve dört çekirdek histondan (H2A, H2B, H3 ve H4) oluşmaktadır. Histonların asetilasyonu ve metilasyonu, gen transkripsiyonu, DNA onarımı, DNA replikasyonu ve kromozomal organizasyon üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabilir.

Epigenetik süreç sırasında DNA metilasyonunda da etkin rol oynadığı bilinen miRNA'lar bunun yanında hedef mRNA'nın 3¢ çevrilmemiş bölgelerinde sekansa özgü baz eşleşmesi yoluyla gen ekspresyonunu düzenler. Böylece mRNA'nın bozulmasına veya translasyonun inhibisyonuna neden olur (47). Bu mekanizma ise hücre çoğalması, apoptoz ve farklılaşmanın düzenlendiği başka bir epigenetik mekanizmadır.

2.5. Kodlamayan RNA’lar (ncRNA’lar)

Kodlamayan RNA (ncRNA) terimi, proteine çevrilmeyen RNA için kullanılır. Genetik bilgilerin çoğunun proteinler tarafından işlendiği genel olarak kabul edilse bile son araştırmalar, memelilerin ve diğer karmaşık organizmaların genomlarının çoğunun aslında ncRNA'lara kopyalandığını ve bunların birçoğunun alternatif olarak eklendiğini ve daha küçük ürünler halinde işlendiğini göstermektedir.

Bu ncRNA'lar, miRNA'ları ve henüz keşfedilmemiş küçük düzenleyici RNA'ların olası diğer sınıflarını ve on binlerce daha uzun transkripti içerir ve çoğunun işlevi bilinmemektedir. Nc RNA'lar (intronlardan türetilenler dahil), kromatin mimarisi, epigenetik bellek, transkripsiyon, RNA ekleme, düzenleme, çeviri dahil olmak üzere fizyoloji ve gelişimdeki farklı gen ekspresyonu süreçlerini denetleyen gizli bir iç sinyaller katmanını içermektedir. Bu sebeple epigenetik süreç karmaşık özelliklerimizin çoğunu belirleyebilir, hastalıkların meydana gelmesinde ve önlenmesinde önemli bir görev alabilir ve türler içinde keşfedilmemiş bir genetik çeşitlilik dünyası oluşturabilir (48).

2.5.1. Kodlamayan RNA’ların sınıflandırılması

NcRNA’lar nükleotit sayılarına göre üç grupta sınıflandırılmıştır. 21-25 nükleotit uzunluğunda olan mikro RNA’lar, translasyon aşamasının kontrolünde rol alan 100-200 nükleotitten oluşan küçük RNA’lar (small RNA’lar) ve gen supresyonunda rol alan 10.000 nükleotitten daha fazla olan uzunlukta olan kodlamayan uzun RNA’lar olarak

gruplandırılmışlardır (3, 48)

2.5.1.1. MikroRNA’lar (MiRNA)

MiRNA'lar, kanserle beraber çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunan transkripsiyon sonrası gen ifadesini düzenleyip ve kontrol eden kısa ve kodlayıcı olmayan RNA'lardır (49). Yaklaşık 2000 insan miRNA geni açıklanırken, çeşitli miRNA fonksiyonları hala bilinmemektedir. Bu nedenle, günümüzde miRNA yönelimli gen regülasyonu ilgi çekici bir araştırma ve bioinformatik analiz alanıdır.

Kabaca miRNA'lar, iki önemli mekanizmadan birini kullanarak hedef mRNA'nın translasyonunu önleyen, küçük, evrimsel olarak korunmuş, tek sarmallı, kodlayıcı olmayan bir RNA molekülleri ailesidir (49). MiRNA biyogenezi, olgun tek sarmallı miRNA'nın oluşumuyla sonuçlanan çok adımlı bir süreçtir (50). Pri-miRNA'nın RNA polimeraz II ile kopyalandığı çekirdekte başlar. MiRNA'lar monosistronik (tek tek kodlanmış) veya polisistronik (kümeler halinde kodlanmış) olabilir. Bir sonraki adımda, Drosha kompleksinin (mikroişlemci) katılımıyla pre-miRNA üretilir ve sitoplazmaya taşınır ve burada Dicer kompleksi tarafından miRNA dupleksine işlenir. miRNA dupleksinin (olgun miRNA) yalnızca bir ipliği, miRNA kaynaklı susturma kompleksini (RISC) oluşturur (51, 52). MiRNA'lar, tohum bölgeleri ile mRNA'ların 3' UTR'sindeki tamamlayıcı dizilere bağlanır (53). Tohum bölgesi, mRNA bağlanmasından sorumlu olan miRNA'nın 5' ucundaki 2-7 nükleotitlik bir dizidir (54). Bu, mRNA'nın bozulmasına veya protein translasyonunun inhibisyonuna yol açar (55).

miRNA alanındaki gelişmeler giderek artmaktadır. Farklı tümörlerde miRNA'ların değiştirilmiş ekspresyon profilleri, bu moleküllerin kanser gelişimi ve diğer malignitelerde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (56, 57).

2.5.1.1.1. Mir200b

MiR-200 sınıfı ise miR-200-a, miR200-b, miR200-c, miR141 ve miR429 olmak üzere 5 üyeden oluşur. Genomda iki farklı lokusta yer alan, miR-200 ailesinin üyeleri bir nükleotid kadar farklılık gösteren dizileri taşır. Ekspresyonları kanser dokusunda düzensizdir ve kanser hastalarının vücut sıvılarında seviyeleri değişir (58).

Genel olarak miRNA'lar, hedef genlere ve anahtar onkojenik sinyal yollarının düzenlenmesindeki rollerine bağlı olarak oncomiR'ler veya tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak

işlev görebilir. Çoğu kanser türünde miR-200 ailesi, tümör baskılayıcı miRNA görevi görür ve kanserin tüm özelliklerini düzenler (58). Bunun yanında, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) ile güçlü derecede ilişki halinde olan bir miRNA kümesidir ve EMT'nin en temel düzenleyicilerinden biridir. Bu nedenle metastaz ve kemosensitivitede kritik bir role sahip olduğu düşünülmektedir (59). Son dönemde, miR-200b'nin çeşitli kanser türlerinde; göğüs, kolon, over ve pankreas kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (59).

2.5.1.2. Long non-coding RNA (LncRNA)

LncRNA'lar >200 nükleotid uzunlukları ile tanımlanan kompleks ve çeşitli işlevlere sahip kodlayıcı olmayan RNA'lardır (60). LncRNA'ların hücrelerde epigenetik olarak transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel süreçlerde gen ifadesine katıldığı ve regüle ettiği ve düzenleyici sürece katıldığı gösterilmiştir; bunun yanında farklı ekspresyonunun veya anormal fonksiyonunun da tümör etiyopatogenezi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (61).

LncRNA'ların spesifik sinyal iletim yollarıyla; mRNA'yı ve miRNA'yı, bunlara karşı gelen hedef genleri düzenlediği, tümör oluşumunda ve progresyonunda, hücre farklılaşmasında ve hücre döngüsünde ve diğer düzenleyici olaylarda rol oynadığı kanıtlanmıştır (61).

LncRNA'ların; tümörlerin tanısında, prognozu ve metastazı öngörmede yeni bir biyobelirteç, tedavide ise yeni bir hedef olabileceği düşünülmektedir (62). Son çalışmalar ise LncRNA'nın mesane kanserinde DNA, RNA ve proteinlerle etkileşerek sinyal yolakları ve hücre farklılaşmasında rol alarak mesane kanserinin etiyopatogenezinde rol aldığını göstermektedir (63).

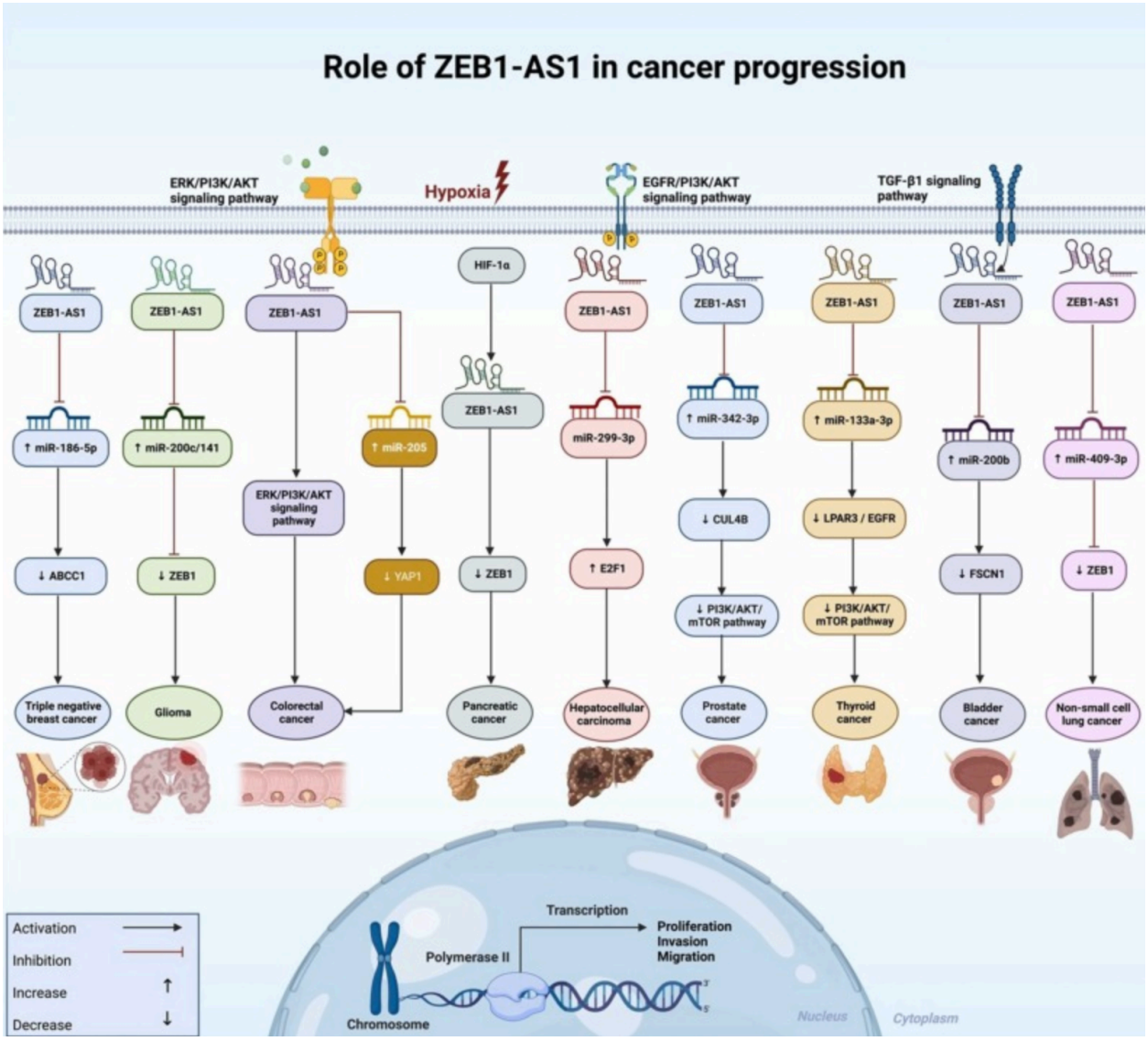
2.5.1.2.1. ZEB1 Antisense RNA 1 (ZEB1-AS1) LncRNA

Bu genomik yapı uzun kodlamayan RNA (LncRNA) olarak karakterize edilen bir RNA'dır. İlk olarak 2015 yılında Li ve ark.'ları tarafından hepatosellüler karsinom (HSK)'da hücresel proliferasyonu arttıran LncRNA olarak keşfedilmiştir. LNCipedia veritabanında ZEB-1- AS1 (HSALNG0077083) olarak da bilinir.

ZEB1-AS1, iki ekzon ve iki ekzon arasında bir intron dahil olmak üzere yaklaşık 2535 nükleotit uzunluğundadır ve 10p11.22 kromozomu üzerinde yer almaktadır (64).

EMT'nin ana düzenleyicisi olan ZEB-1 üzerinde güçlü derecede kontrol edici etkiye sahiptir. Bu sebeple EMT ve metastaz indüksiyonu yoluyla çeşitli bozuklukların ve özellikle de kanserlerin patogenezini etkileyebildiği düşünülmektedir. Kolorektal kanser, meme kanseri,

glioma, HSK ve mide kanseri gibi malignitelerde rol oynadığı bilinmektedir. Malign hastalıklara ek olarak diyabet, ateroskleroz, pulmoner fibrozis ve iskemik inme benzeri durumlarda da fonksiyonel role sahiptir (65).



Şekil 2: ZEB1-AS1'in çeşitli tümörlerin gelişimindeki etki mekanizmaları (65)

2.5.1.3. mir-200 b'nin ZEB-1 ile ilişkisi

ZEB 1 ve miR-200 aile üyeleri arasındaki etkileşim tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte ve EMT ile ilişkili sinyal yollarını etkilediği düşünülmektedir (66). Bunun yanında, LncRNA'ların mikroRNA'lar için "sünger" görevi yaparak mRNA'lar üzerindeki etkilerini azalttığı ve dolayısıyla çeşitli biyolojik süreçleri düzenlediği öne sürülmüştür (67). Sonuçta, ZEB-1, EMT'nin bir destekleyicisi ve mir200b'nin bir hedefidir ve mir200b'yi düzenleyebileceği gösterilmiştir (67).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grupları

Bu çalışmada, KİOMK tanısı konulan hastaların demografik ve histopatolojik paremetreleri ile doku düzeyinde bakılan ZEB-1 AS-1 ve mir200b gen ekspresyonları arasındaki ilişki incelendi.

Çalışma grubuna, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Ürolojik Onkoloji Bilim Dalı'na Mayıs 2022 ve Nisan 2023 tarihlerinde başvurarak TUR-MT ameliyatı olan 50 kişi dahil edildi. Hastalara çalışmayla ilgili yazılı ve sözlü olarak bilgilendirilme yapıldıktan sonra, yazılı onamları alınarak doku örnekleri alındı. Çalışma için İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne başvuru yapıldı ve proje onayıyla birlikte BAP desteği sağlandı. Proje ID: 38974

3.2. Çalışma Materyali

Çalışma materyalinin temelini, TUR-MT yapılan hastaların tümör dokusu oluşturmaktadır. Bunun yanında aynı hastalardan tümörlü alana en az 3 cm uzaklıktan kontrol doku örnekleri de alınmıştır. Hücre canlılıklarının korunması ve dokuların tazeliğini yitirmemesi için RNA-Later adlı sıvının içerisine alınan dokular RNA izolasyon işlemi başlayana kadar – 20 °C'de saklandı. Doku örnekleri miRNeasy Tissue/Cells Advanced kit (catalog no:217604) ile RNA'ları elde edildi ve elde edilen RNA örnekleri -80 °C'de saklandı. Hastalar patoloji sonuçlarına göre düşük ve yüksek grade, T0 ve T1 evresi, karsinoma in situ (CIS) varlığı ve varyant patoloji içerip içermediğine göre ayrıldı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, cinsiyet, VKİ, aile öyküsünde kanser varlığı, sigara kullanımı, TNM evresine ilişkin bilgileri belirlendi. Bunun yanında bir gruplama da sigara hikayesi açısından yapıldı. Hiç içmemiş veya kliniğe müracaat etmesinden 1 yıl veya daha fazla zaman önce sigara kullanmayı bırakmış olan kişiler "sigara içmeyenler" grubuna dahil edildi. Yılda 10 paket ve daha fazla sigara içenler kişiler (10 paket≥ yıl) ise "sigara içenler" grubu olarak kabul edildi.

3.3. Kullanılan Cihazlar

1. Vorteks (MS 2 Minishaker, İKA).
2. Santrifüj cihazı (Heraeus, Germany)
3. PZR cihazı (Techne TC412 Termal Cycler, Barloworlal Scientific, UK).

4. Pipet takımı (Biohit, Proline)
5. Otoklav (Hirayama, HV – 50L)
6. Gene Rotor (Qiagene)
7. ELISA plak okuyucu (Biotech, UK)

3.4. Kullanılan Malzemeler

1. miRNeasy Tissue/Cells Advanced kit Qiagen, Katalog no 217604
2. miRCURY LNA RT Kit Qiagen, Katalog no 339340
3. miRCURY LNA miRNA PCR Assay Qiagen, Katalog no 339306
4. miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit Qiagen, Katalog no 339346
5. RT² PreAMP cDNA Synthesis Kit Qiagen, Katalog no 330451
6. RT2 LncRNA qPCR Assay Qiagen, Katalog no 330701
7. RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix Qiagen, Katalog no 330620
8. Strip Tubes and Caps, 0.1 ml Qiagen, Katalog no 981103

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. ZEB-1 AS-1 ve miR-200b Gen Ekspresyonlarının Tayini

ZEB-1 AS-1 ve miR-200b ekspresyonlarının ölçümünün belirlenmesi için aşağıdaki prosedür uygulandı.

a- RNA dokudan izole edildi.

b- PZR cihazı ile izole edilen RNA kite uygun olarak cDNA'ya çevrildi.

c- Elde edilen cDNA örneklerinden Gene Rotor cihazında ekspresyonları yapıldı.

3.5.1.1. Dokuda RNA İzolasyonu:

RNA izolasyonu için hali hazırda olan ticari kit kullanıldı. miRNeasy Tissue/Cells Advanced kit cat no: 217604 (Qıagen, Canada) kullanılarak RNA izolasyonu kit içeriğine göre gerçekleşti.

Başlamadan önce, RNA izolasyon kiti içerisindeki RWT ve RPE tamponları yönergelere uygun olarak %96-100 etanol (absolut etil alkol) eklenip diğer kimyasallar kullanıma hazır şekilde bulunmaktadır. Hasta numunelerinden 20 µl doku örneği tartıldı ve steril eppendorfa alındı. 260

µl Buffer RLT eklendikten sonra TissueRuptor cihazıyla homojenize edildi. Homojenata 80 µl Buffer AL eklendi ve vortekslendi. 3 dakika (dk) oda ısısında inkübe edildikten sonra homojenize numune gDNA Eliminator kolonu bulunan eppendorfa alınarak 10.000g'de 1 dakika santrifüjlenerek Genomik DNA filtre edildi. Elde edilen ekstrakt steril yeni eppendorfa alındı. 20 µl Buffer RPP eklendi. 20 saniye(sn) boyunca vortekslendikten sonra 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

Sonrasında 12.000 g ile 3 dk santrifüjlenerek elde edilen supernatant (~300 µl) 2 ml lik steril eppendorfa alındı. Supernatantın hacmine eşit miktarda isopropanol eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı. Elde edilen numune RNeasy Mini Column'a aktarıldı ve 30 sn 10.000g de santrifüj edildi. Ardından sıvı uzaklaştırıldı. RNeasy Mini Column üzerine 700 µl Buffer RWT eklendi. 30 sn 10.000g de santrifüj edilip sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolona 500 µl Buffer RPE eklendi. 30 sn 10.000g de santrifüjlendi ve sıvı uzaklaştırıldı. Bir sonraki adımda 500 µl %80 etanol RNeasy Mini Spin Column üzerine eklendi. 2 dk 10.000 g de santrifüj sonrası RNeasy Mini Column 2 ml eppendorfa yerleştirildi. Membranı kurutmak için 17.000 g'de 60 sn santrifüj edildi. RNeasy Mini Spin Column u yeni 1.5 ml eppendorfa yerleştirildi. 30 µl RNase-free water kolonun merkezine eklendi ve 60 sn oda sıcaklığında inkübe edildi.

İşlem sonunda RNA'yı ayrıştırmak için 1 dakika 17.000 g de santrifüj edilerek total RNA ekstrakte edildi. RNA elde edildikten sonra tüm numunelerin RNA konsantrasyonları ve saflıkları Eon Biotek cihazı ile ölçüldü. 1 µl RNA örneği alınıp cihaza konularak konsantrasyon miktarı ve 260/280 ve 260/230 nanometrede değerlendirilerek saflık oranları belirlendi. Ölçüm yapıldıktan sonra RNA'lar -80 dereceye konularak saklandı.

3.5.1.2. mir200b cDNA Sentezi

RNA elde edildikten sonra bir sonraki işlem olan cDNA sentezi işlemi için yine ticari olarak satılan miRCURY LNA miRNA SYBR Green PCR (Qiagen, katalog No: 339340) kullanıldı. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

3.5.1.3. mir200b cDNA sentez reaksiyonu

Toplam hacim 10 µl olacak şekilde işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

1) RNAse free su 5 µl
2) 5x miRCURY SYBR Green RT Reaksiyon buffer 2 µl

3) 10x miRCURY RT enzim mix 1 µl
4) RNA ürün 2 µl

Yukarıda listenen tüm örnekler tüpe konulduktan sonra Bio-Rad termal cycler cihazına cDNA reaksiyonu 37 derecede 60 dakika, 95 derecede 5 dakika olacak şekilde miRNA için olan cDNA sentez reaksiyonu tamamlandı ve örnekler -20 derecede saklandı.

3.5.1.4. Real Time PCR Reaksiyonu (mir200b)

cDNA elde edidikten sonra bir sonraki aşama olan Real Time PCR işlemi için hazır olan ticari kitler kullanıldı. Qiagenee firmasının (**Cat No: 339345**) kiti kullanılarak Real time PCR gerçekleştirildi.

Tüm işlemler soğuk blok üzerinde toplam hacim 10 µl olacak şekilde reaksiyon örnek başına aşağıdaki prosedüre uygun olarak gerçekleştirildi.

1) RNAse free su 1µl
2) 2x miRCURY SYBR Green Master mix 5 µl
3) PCR primer mix 1 µl
4) cDNA ürün (x30 sulu) 3µl

Daha sonra strip tüpleri Qiagen Rotor Gene cihazına konulduktan sonra sırasıyla; 95 derecede 2 dakika ardından 95 derecede 10 saniye (40 siklus) ve 56 derecede 60 saniye (40 siklus) yapılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Housekeeping olarak U6 kullanıldı. Real Time PCR işleminden sonra ölçülen Ct değerleri 2-ddCt yöntemi kullanılarak belirlendi.

3.5.1.5. ZEB-1 AS-1 cDNA Sentezi

RNA eldesinden sonra bir sonraki aşama olan Lnc EB-1 AS-1 DNA sentezi işlemi için yine ticari olarak satılan RT² PreAMP cDNA Sentez Kit (Qiagen, katalog No: 330451) kullanıldı. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

Revers Transkripsiyon mix aşağıdaki içerikler kullanılarak hazırlandı:

1) 5x Buffer BC3: 2 µl
2) Kontrol P2: 0.5 µl
3) RE3: 1 µl
4) Nükleaz free su: 1.5 µl

Hazırlanan 5 µl Revers Transkripsiyon mix üzerine 5 µl elde edilen RNA örneğinden eklendi. 37 derecede 60 dakika 95 derecede 5 dakika PCR cihazında reaksiyona konuldu. PCR

cihazından çıkarıldıktan sonra buz üzerine konuldu ve cDNA elde edildi.

3.5.1.6. Real Time PCR Reaksiyonu (ZEB-1 AS-1)

cDNA elde edildikten sonra bir sonraki aşama olan Real Time PCR işlemi için hazır olan ticari kitler kullanıldı. Qiagenee firmasının RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix (Cat No: 330620) kiti kullanılarak Real time PCR gerçekleştirildi.

Bütün işlemler soğuk blok üzerinde toplam hacim 25 µl olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi.

1) Nukleaz free su: 10.5 µl
2) RT² SYBR Green Master mix: 12.5 µl
3) cDNA: 1 µl
4) RT²LncRNA qPCR Assay: 1 µl

Daha sonra strip tüpleri Qiagen Rotor Gene cihazına konulduktan sonra sırasıyla; 95 derecede 10 dakika ardından 95 derecede 15 saniye (40 siklus) ve 60 derecede 60 saniye (40 siklus) yapılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Real Time PCR işleminden sonra elde edilen Ct değerleri 2-ddCt metodu kullanılarak değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analizler

Verilerin analizinde SPSS 26.versiyon programı kullanılmıştır (SPSS, Chicago, IL). İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Farklı biyobelirteçlerin değerlerinin, Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanı sıra grup dağılımları Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak değerlendirilmiş ve homojen dağılım göstermeyen parametreler için ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Mesane kanserinin teşhisinde ayırt etmek amacıyla, maksimum duyarlılık ve seçicilik hesaplanması için ROC eğrisi, değişkenler arası korelasyon için ise Spearman korelasyon analizi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Grubunun Demografik ve Klinik Özellikleri

Tablo 1: Mesane tümörü içeren ve içermeyen dokuların demografik ve klinik özellikleri

		Ort±Ss
Yaş		67,4±13,1
VKİ		27,31±3,85
Sigara paket yılı		33±23,3
		N (%)
Cinsiyet	Erkek	48 (%96)
	Kadın	2 (%4)
Sigara Öyküsü	İçmiyor	6 (%12)
	İçiyor	44 (%88)
Başvuru Şikâyeti	Mikrohematüri	3 (%6)
	Makrohematüri	33 (%66)
	AÜSS	7 (%14)
	Şikâyet yok	7 (%14)
Tümör evresi	Ta	30 (%60)
	T1	20 (%40)
Tümör Grade'i	Düşük Grade	21 (%42)
	Yüksek Grade	29 (%58)
CIS Varlığı	Yok	37 (%74)
	Var	13 (%26)
Varyant Patoloji	Yok	47 (%94)
	Var	3 (%6)

Hastaların 48'i erkek (%96) ve 2'si kadın (%4) idi. Hasta grubunun tanı anındaki yaş aralığı 33-91, yaş ortalaması 67,4 ± 13,1 ortanca değeri ise 69'du. Hastaların vücut kitle indeksi ortalama 27,3± 3,85 hesaplandı. Sigara içen hastaların paket yılları ise 33,3± 23,3 olarak hesaplandı.

Hastalar en sık makrohematüri (n=33, %66) şikayeti ile başvurmuştu. Diğer başvuru

semptomları mikrohematüri (n=3, %6), AÜSS (n=7, %14) iken; şikâyeti olmayan hastaların sayısı ise (n=7, %14) olarak bulunmuştur.

ÜK tanısı alan hastaların patolojik özelliklerine bakıldığında; Tümör evresi Ta olanlar (n=30, %60), T1 olanlar (n=20, %40) idi. Hastalardan 21'i (%42) düşük gradeli iken 29'u (%58) yüksek gradeliydi. Tümörlere eşlik eden CIS varlığı hastaların 13'ünde (%26); eşlik eden varyant patolojiler ise 3(%6) hastada saptandı.

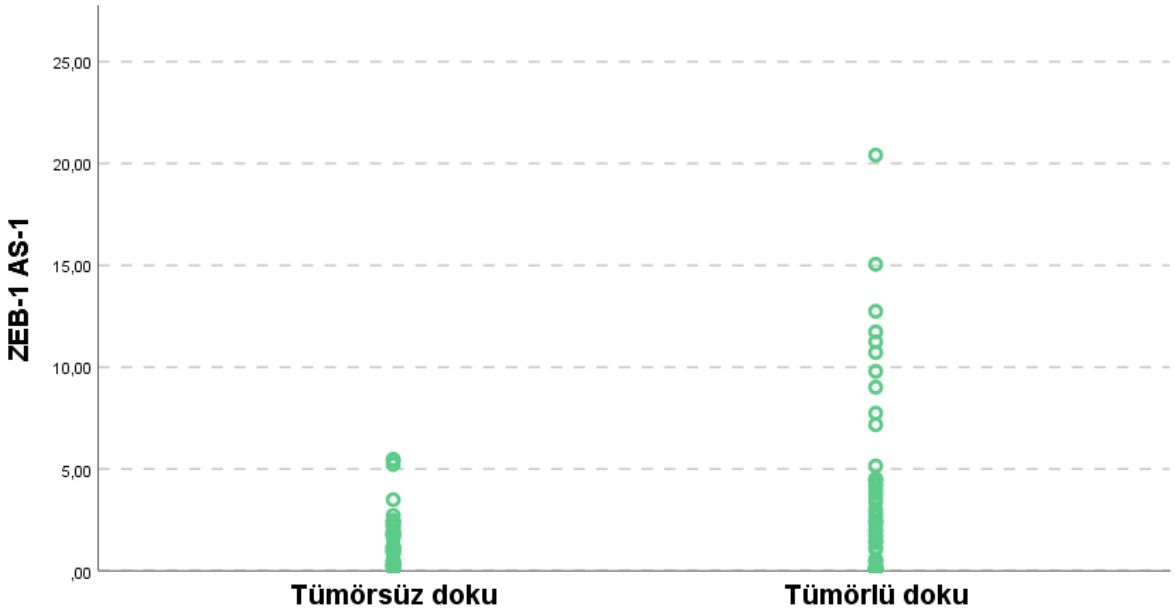
4.2. Dokularda Bakılan ZEB-1 AS-1 ve mir200b Ekspresyon Sonuçları

Tablo 2: Mesane tümörlü ve tümörsüz dokuları arasındaki ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyonları

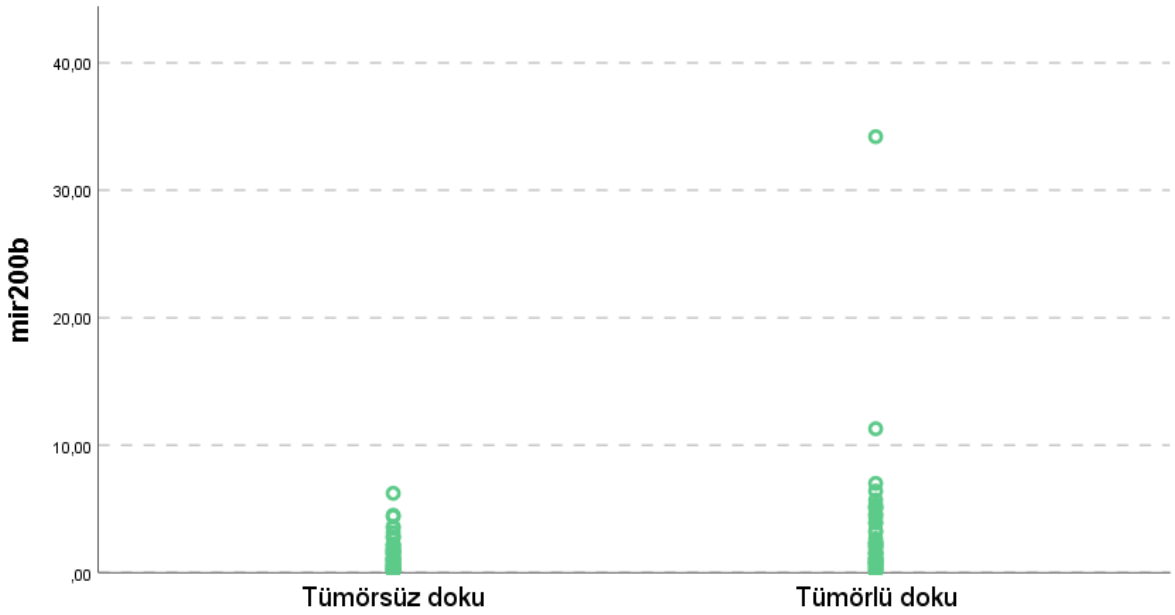
		N	Ortalama ±Ss	Median	Min	Max	p
ZEB-1 AS-1	**Tümörlü Doku**	50	3,84± 4,47	2,38	0,05	20,41	0,018
	Tümörsüz Doku	50	1,51± 1,29	1,16	0,08	5,47	
mir200b	**Tümörlü Doku**	50	3,09± 5,06	1,69	0,02	34,2	0,034
	Tümörsüz Doku	50	1,51± 1,3	1,15	0,07	6,22	

Yaptığımız çalışma sonucu mesane kanseri olan hastaların tümörlü dokularındaki ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyonlarının tümörsüz dokulara göre anlamlı derecede arttığı saptandı. ZEB-1 AS-1 ekspresyonu ortanca değeri tümörlü dokuda 2,38 (0,05-20,41) iken, tümörsüz dokuda 1,16 (0,08-5,47) idi. (Tablo 2, p değerleri sırasıyla 0,018 ve 0,034). Benzer şekilde mir200b ekspresyonunun tümörlü dokuda daha fazla saptanmıştır. (1,69 ([0,02-34,2]) vs. 1,15 [0,07-6,22] p=0,034)

Grafik 1: Dokulara göre ZEB-1 AS-1 ekspresyon düzeyleri



Grafik 2: Dokulara göre mir200b ekspresyon düzeyleri



4.3. Tümörlü Doku Histopatolojik Özellikleri ile ZEB-1 AS-1 ve mir200b Ekspresyonları İlişkisi

Tablo 3: Patolojik evrelerine göre ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki

			N	Ortalama± Ss	Median	Min	Max	p
ZEB-1 AS-1	**Tm evresi**	**Ta**	30	3,29±3,71	1,71	0,05	11,72	0,235
		T1	20	4,67±5,42	2,82	0,06	20,41	
mir200b	**Tm evresi**	**Ta**	30	3,76±6,23	2,24	0,02	34,2	0,230
		T1	20	2,02±1,99	1,41	0,16	6,99	

ZEB-1 AS-1 düzeyi T1 evresinde ekspresyon düzeyi ortalamaları 4,67± 5,42 iken Ta evresinde 3,29± 3,71 olarak bulunmuştur. Evre ilerlediğinde düzeyin arttığı ama istatiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 3, p=0,235).

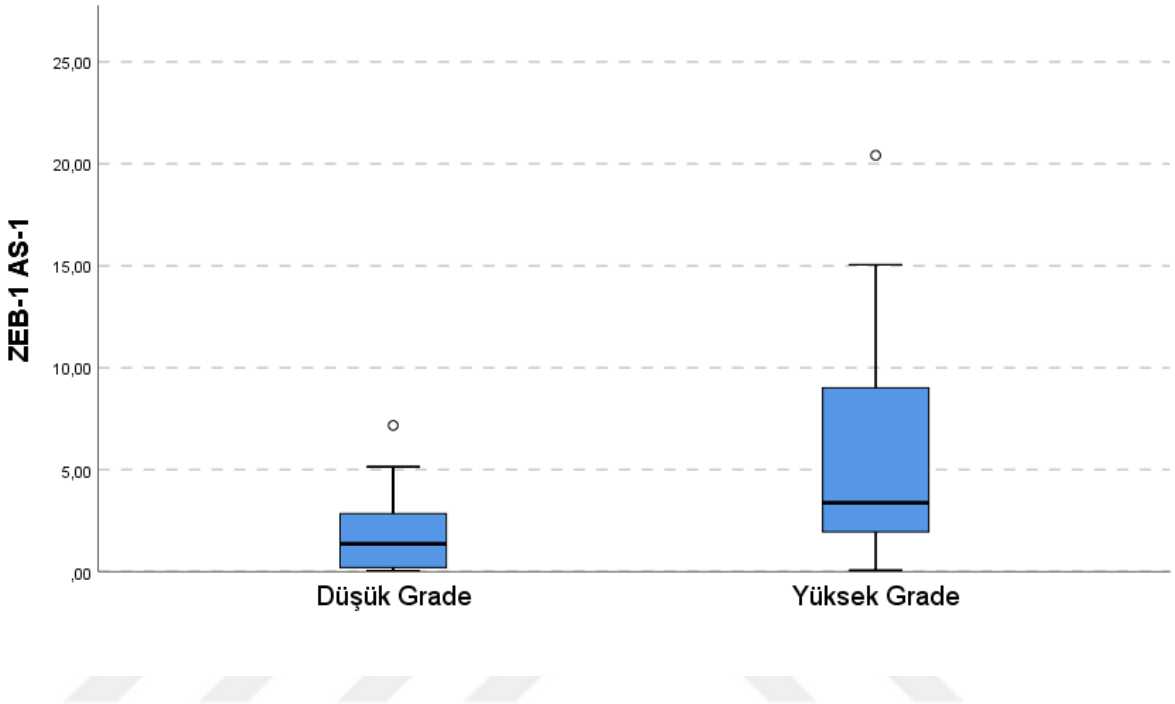
Mir200b ekspresyon düzeyi ise T1 evresinde ortalamanın 2,02±1,99 (1,41-0,16), Ta evresinde ise 3,76±6,23 (0,02-34,2) olduğu saptanmıştır, düzeyin evre ilerledikçe azaldığı ama istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadığı bulunmuştur (p=0,230). Benzer şekilde, patolojik evleri Ta ve T1 olanların ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyonları arasında anlamlı fark saptanmadı. (Sırasıyla p=0,235, p=0,230)

Tablo 4: ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin tümör grade'leri ile ilişkisi

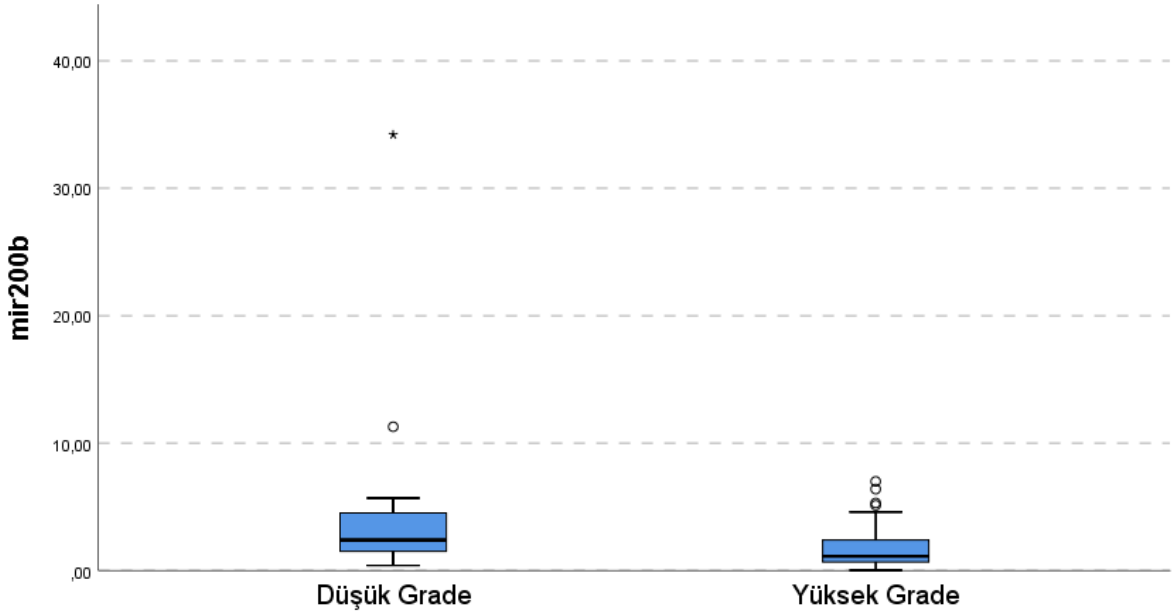
			N	Ortalama± Ss	Median	Min	Max	p
ZEB-1 AS-1	**Tm grade**	**Low Grade**	21	1,86±1,96	1,36	0,05	7,17	0,007
		High Grade	29	5,27±5,21	3,37	0,06	20,41	
mir200b	**Tm grade**	**Low Grade**	21	4,66±7,20	2,39	0,40	34,20	0,015
		High Grade	29	1,91±1,97	1,11	0,02	6,99	

Yüksek ve düşük gradelerine göre kıyaslandığında ZEB-1 AS-1 düzeyleri yüksek grade de artmış olarak saptandı (Tablo 4, Grafik 3, 3,37[0,06-20,41]) *vs.* (1,36 [0,05-7,17] p=0,007). Mir200b ekspresyonları yüksek grade de azalmış ve düşük grade de artmış olarak saptandı. (Tablo 4, Grafik 4, 1,11 [0,02-6,99] *vs.* (2,39 [0,4-34,2] p=0,015)

Grafik 3: Histopatolojik grade'lere göre tümörlü dokudaki ZEB-1 AS-1 ekspresyon düzeyleri



Grafik 4: Histopatolojik gradelere göre tümörlü dokudaki mir200b ekspresyon düzeyleri



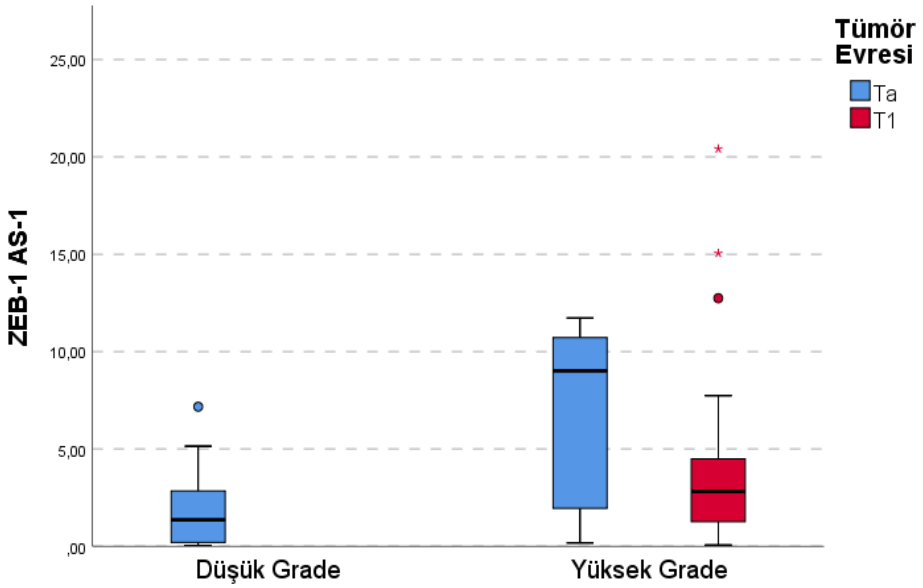
Tablo 5: ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin patolojik evresi Ta olan grupta grade'lere göre ilişkisi

					N	Ortalama± Ss	Median	Min	Max	p
ZEB-1 AS-1	**Tm evresi**	**Ta**	**Tm grade**	**Low Grade**	21	1,86±1,96	1,36	0,05	7,17	0,007
				High Grade	9	6,63±4,73	9,01	0,17	11,72	
miR200b	**Tm evresi**	**Ta**	**Tm grade**	**Low Grade**	21	4,66±7,20	2,39	0,40	34,20	0,032
				High Grade	9	1,68±2,02	1,05	0,02	6,39	

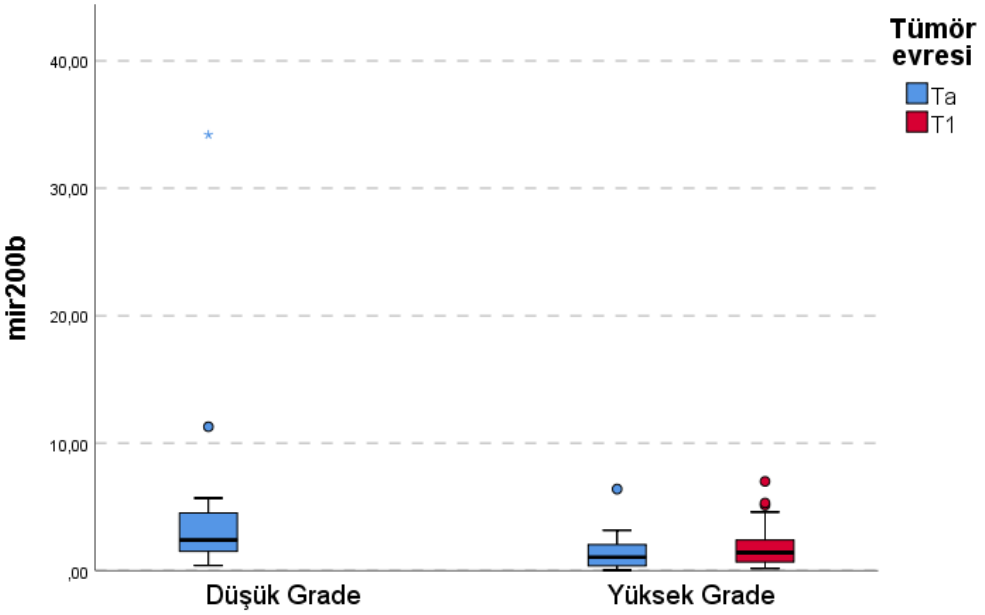
Low grade ve High grade Ta kendi aralarında değerlendirildiğinde patolojik evreleri High Grade Ta olan hastalarda ZEB-1 AS-1 ekspresyonları artmıştır (Tablo 5, Grafik 5, 9,01 [0,17-11,72] vs 1,36[0,05-7,17] p =0,007) .

Mir200b ekspresyonları ise low grade Ta evresinde olan hastalarda artmış; yüksek grade Ta olan hasta grubunda ise azalmıştır (Tablo 5, Grafik 6, 2,39(0,4-34,2) vs 1,05(0,02-6,39) p=0,032).

Grafik 5: Histopatolojik evre ve grade'lere göre tümörlü dokudaki ZEB-1 AS-1 ekspresyon düzeyleri



Grafik 6: Histopatolojik evre ve gradelere göre tümörlü dokudaki mir200b ekspresyon düzeyleri

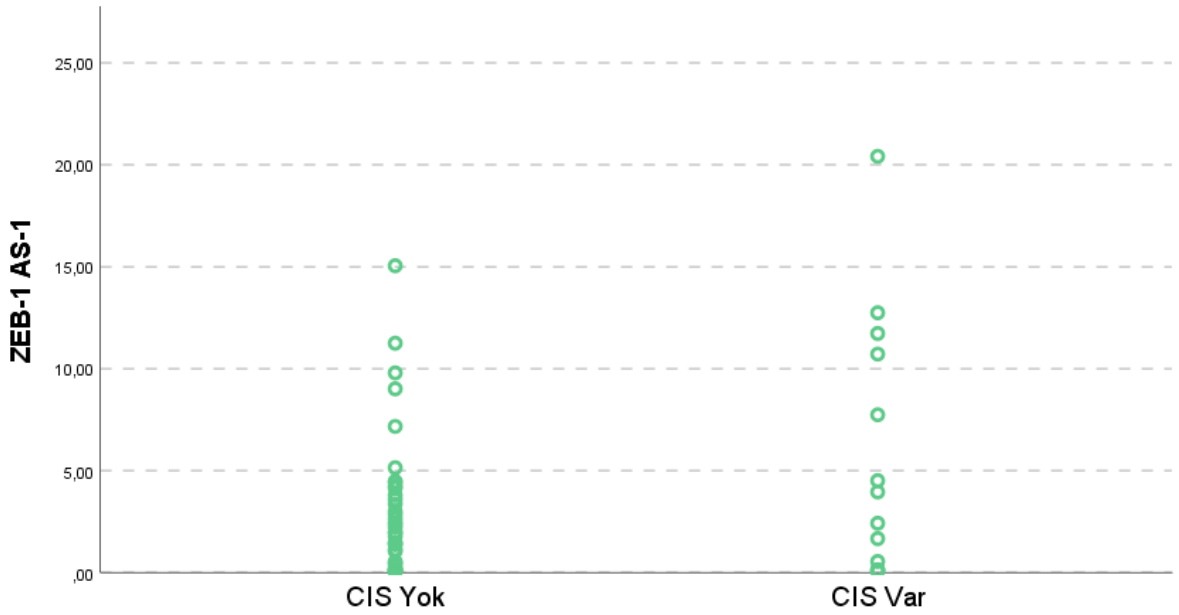


Tablo 6: ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin CIS varlığı ile ilişkisi

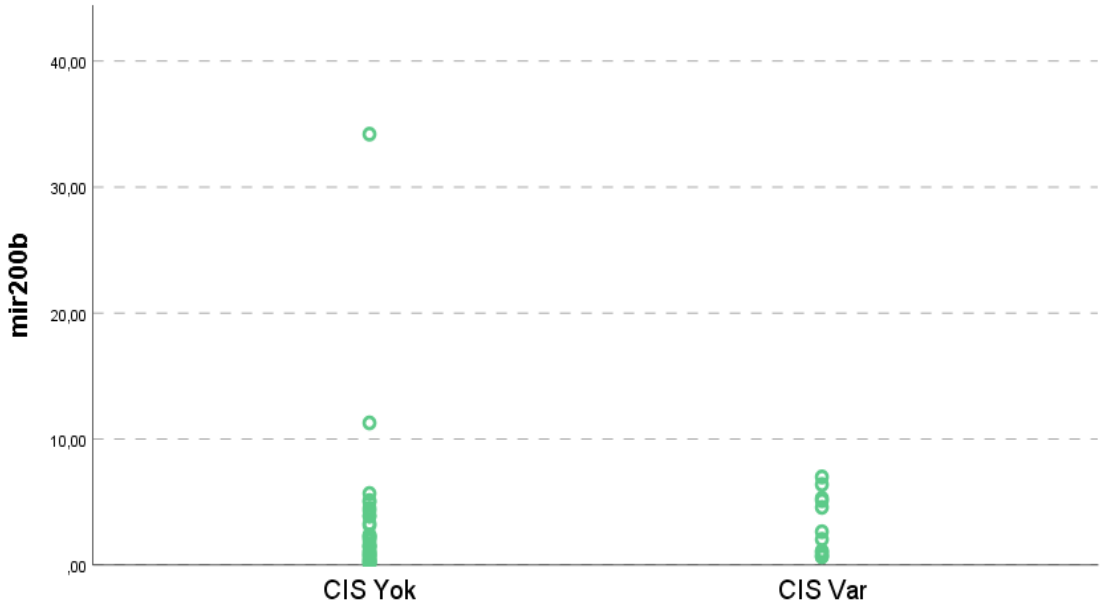
			N	Ortalama± Ss	Median	Min	Max	p
ZEB-1 AS-1	**CIS**	**Yok**	37	3,11±3,43	2,21	0,05	15,05	0,238
		Var	13	5,90±6,35	3,95	0,06	20,41	
mir200b	**CIS**	**Yok**	37	3,08±5,70	1,51	0,02	34,20	0,240
		Var	13	3,12±2,40	2,34	0,67	6,99	

ÜK patolojisine CIS varlığının eşlik ettiği hastalar değerlendirildiğinde ise ZEB-1 AS-1 ekspresyonları artmış bulunmuş; ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 6, Grafik 7, p=0,283). Benzer şekilde, mir200b ekspresyonları için ise CIS varlığında arttığı saptanmış olup bu fark anlamlı değildi (Tablo 6, Grafik 8, p= 0,240).

Grafik 7: CIS ile ZEB-1 AS-1 ekspresyon düzeyleri ilişkisi



Grafik 8: CIS ile mir200b Ekspresyon Düzeyleri İlişkisi

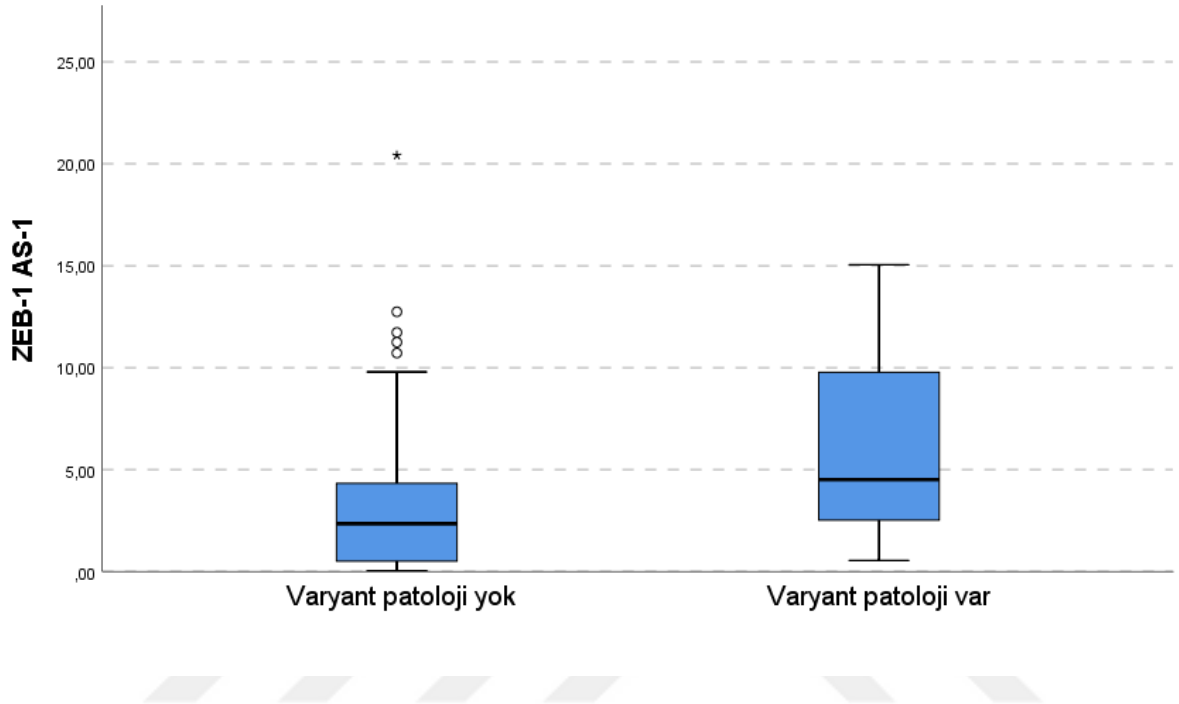


Tablo 7: ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin eşlik eden varyant patoloji ile ilişkisi

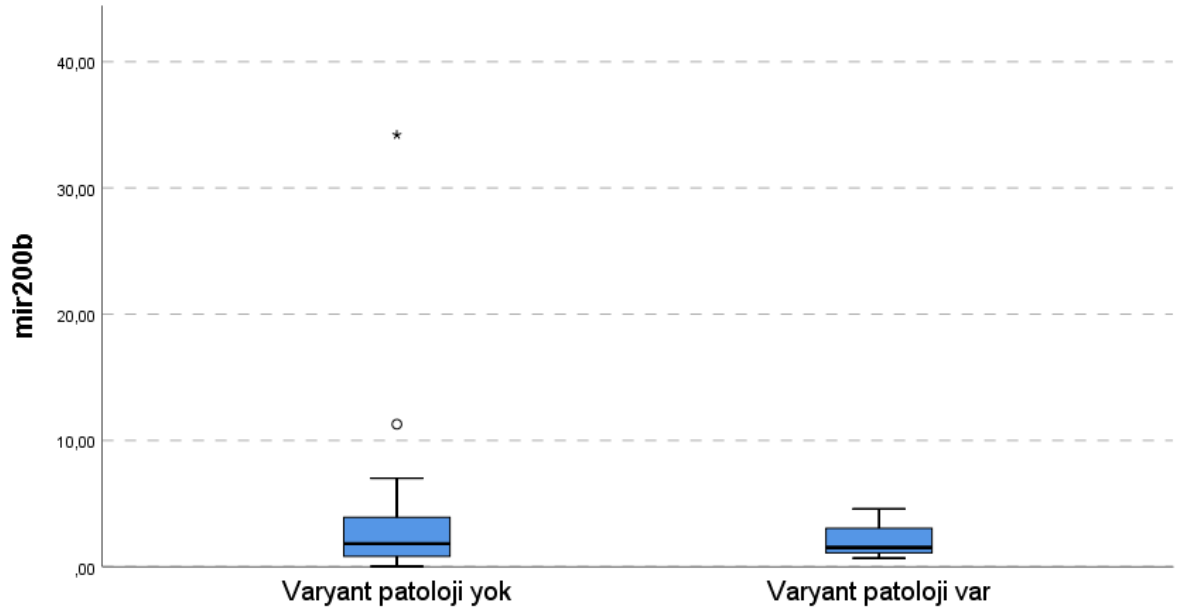
			N	Ortalama± Ss	Median	Min	Max	p
ZEB-1 AS-1	**Varyant Patoloji**	**yok**	47	3,66±4,28	2,35	0,05	20,41	
		var	3	6,70±7,50	4,50	0,54	15,05	0,323
mir200b	**Varyant Patoloji**	**yok**	47	3,14±5,21	1,82	0,02	34,20	
		var	3	2,26±2,05	1,51	0,68	4,58	0,984

Patolojik evrelemeye varyant patolojilerin eşlik ettiği hastalar değerlendirildiğinde, ZEB-1 AS-1 ekspresyonları artmış olarak saptanırken mir200b ekspresyonları azalmıştır ancak bu farklar anlamlı olarak bulunmamıştır (sırasıyla p=0,323; p=0,984, Tablo 7, Grafik 9 ve 10).

Grafik 9: Varyant patoloji ile ZEB-1 AS-1 ekspresyon düzeyleri ilişkisi



Grafik 10: Varyant Patoloji ile mir200b ekspresyon düzeyleri ilişkisi



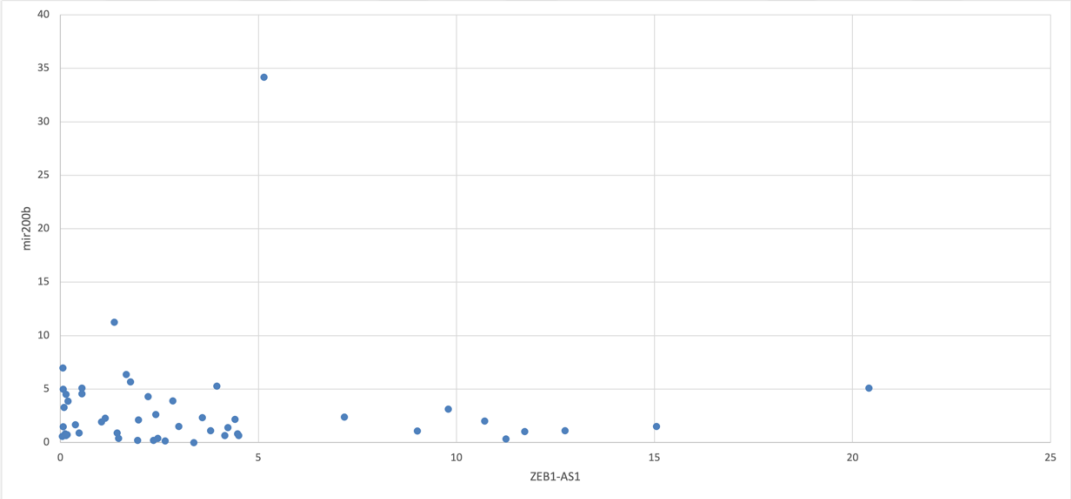
4.4. Klinik Paremetreler ile ZEB-1 AS-1 ve mir200b Ekspresyonları İlişkisi

Tablo 8: ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeylerinin sigara içen ve içmeyenlerle İlişkisi

			N	Ortalama± Ss	Median	Min	Max	p
ZEB-1 AS-1	**Sigara öyküsü**	Yok	6	5,73±7,36	3,61	0,14	20,41	0,372
		Var	44	3,58±3,99	2,16	0,05	15,05	
mir200b	**Sigara öyküsü**	Yok	6	2,53±1,77	1,85	0,67	5,12	0,688
		Var	44	3,17±5,38	1,69	0,02	34,20	

ZEB-1 AS-1 ve Mir200b ekspresyonları sigara içen grupta azalmış olarak saptandı ancak bu fark anlamlı bulunmadı (sırasıyla p=0,372; p=0,688).

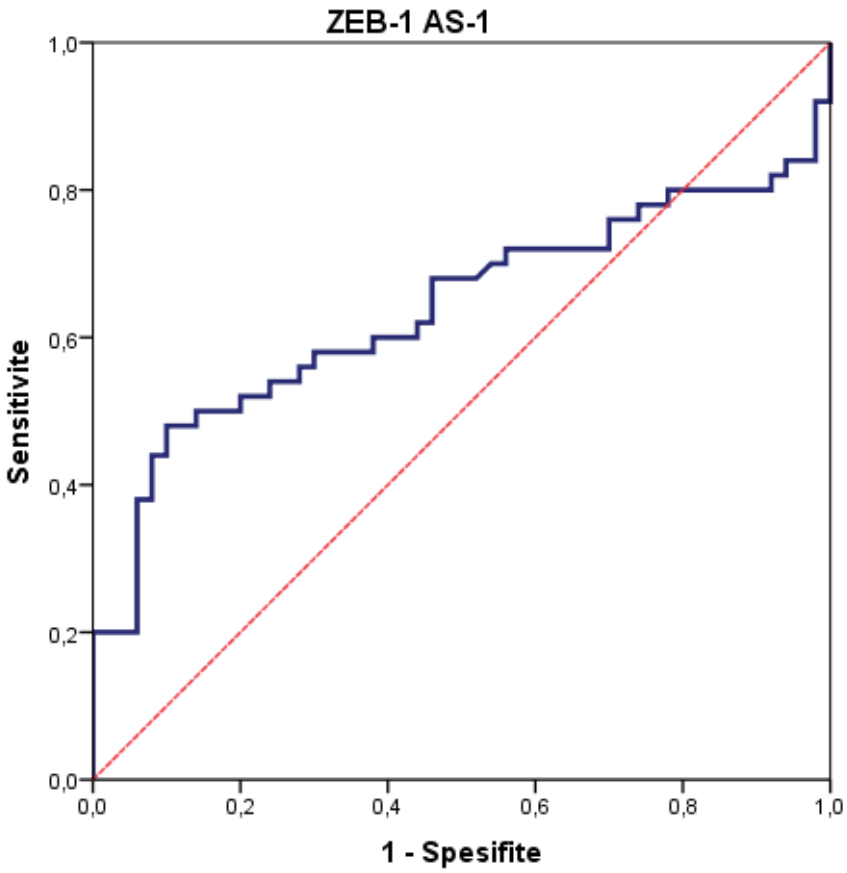
Grafik 11: ZEB-1 AS-1 ve mir200b gen ekspresyonları arası korelasyon grafiği



Tümörlü dokuda ZEB-1 AS-1 ve mir200b gen ekspresyonlarıyla; hasta yaşı, VKİ ve sigara paket yılı arasında anlamlı korelasyon saptanmadı. Ek olarak ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyonları da kendi aralarında anlamlı olarak korele saptanmadı.

4.5. Tümörlü Dokuda Bakılan ZEB-1 AS-1 ve mir200b Ekspresyon Düzeylerinin ROC Analizi Sonuçları

Grafik 12: ZEB-1 AS-1 ROC Analizi sonucu Cut Off ve AUC değeri

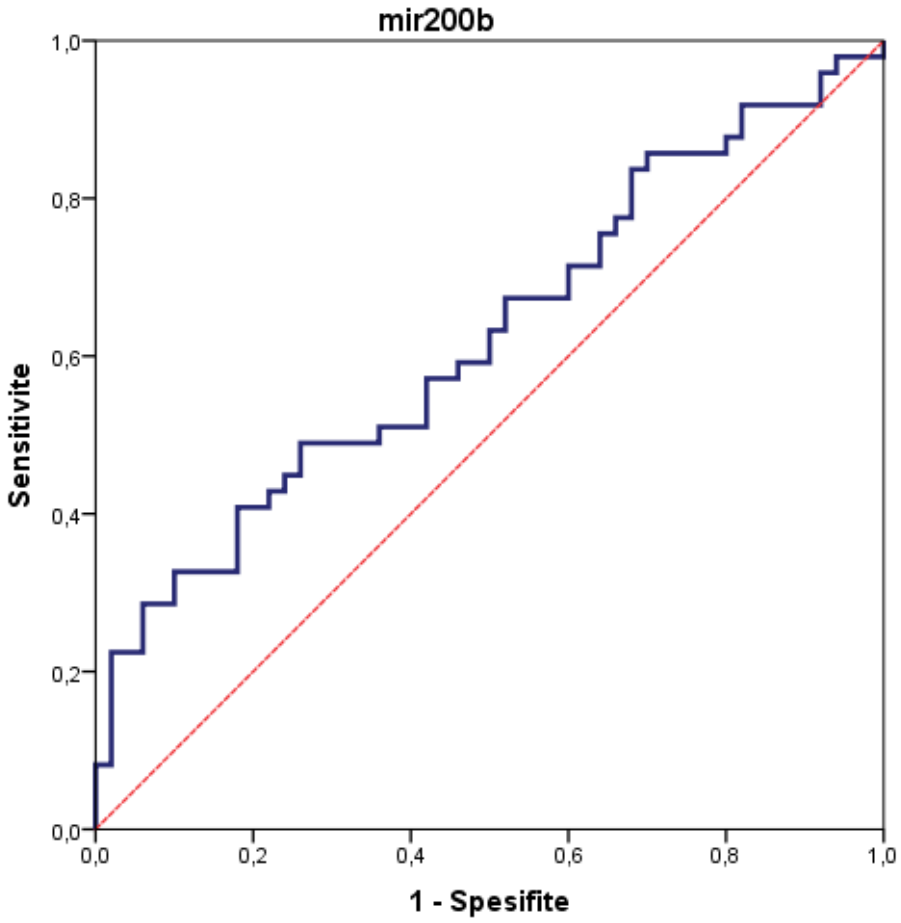


Tablo 9: ZEB-1 AS-1 ROC Analizi sonucu Cut Off ve AUC değeri

Parametre	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Kesme Puanı	Eğri Altında Kalan Alan
ZEB-1 AS-1	%48	%90	2,46	0,637

Mesane tümörü içeren hastaların LncRNA ZEB-1 AS-1 gen ekspresyon düzeylerinin duyarlılığı ve özgüllüğü ROC eğrisinden faydalanılarak hesaplandı. Mesane kanseri olan hastaların dokularında IncRNA ZEB-1 AS-1 değerinin kesme noktası 2,46 alındığında duyarlılık %48; özgüllük ise %90 olarak bulundu. (Tablo 9, Grafik 12, Eğri altında kalan alan 0,637)

Grafik 13: mir200b ROC analizi sonucu Cut Off ve AUC değeri



Tablo 10: mir200b ROC Analizi sonucu Cut Off ve AUC değeri

Parametre	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Kesme Puanı	Eğri Altında Kalan Alan
mir200b	%40	%82	2,25	0,624

mir200b değerinin kesme noktası 2,25 alındığında duyarlılık %40; özgüllük ise %82 olarak bulundu. (Tablo 9, Grafik 13, Eğri altında kalan alan 0,624)

5. TARTIŞMA

Mesane kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin sık görülen bir nedenidir ve insidansı ve mortalitesi giderek artmaktadır (68). KİOMK tanısı invaziv bir yöntem olan mesane doku örneklemesi ile konulmaktadır ve tedavi seçenekleri ise TUR-MT, Bacillus Calmette-Guerin (BCG), ısıtılmış veya ısıtılmamış kemoterapi instilasyonu ve seçilmiş bir hasta grubunda gelecek vaad eden immünöterapidir. KİOMK tanısında ve takibinde ise henüz kullanılan bir biyobelirteç bulunmamaktadır. Tümör oluşumu ile ilişkili çok sayıda gen bulunmasına rağmen, moleküler mekanizma hala bilinmemektedir. Bu nedenle hastalığın moleküler mekanizmalarının çözülmesi büyük önem taşımaktadır ve moleküler mekanizmanın ortaya çıkarılması, mesane kanseri için etkili bir tedavi veya prognostik öngörü sağlayabilmektedir.

Daha önceki çalışmalarda ncRNA'ların (miRNA ve LncRNA) mesane kanseri içeren dokular ile normal dokular arasında ekspresyonlarının farklı olduğu gösterilmiştir. Bu genomik yapıların hastalığın önlenmesinde, tanısında ve tedavisinde rolleri olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle miRNA'lar ve LncRNA'lar mesane kanserinde hem tanısal hem de prognostik açıdan potansiyel biyobelirteçler olarak umut vadetmektedirler.

Bu çalışmada sadece kasa invaze olmayan mesane kanseri teşhisi alan hastaların mesanesinden alınan tümör içeren ve tümör içermeyen doku örneklerinin; LncRNA ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyon düzeyleri analiz ederek bu iki genomik yapının tanısal ve prognostik açıdan önemini ve birbirleriyle olan ilişkilerini değerlendirdik. Sonuçta, hastaların tümörlü dokularındaki ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyonlarının tümörsüz dokulara göre anlamlı olarak arttığı saptandı (p=0,018, p=0,034). Böylece her iki genomik yapının MK patofizyolojisinde rolü olduğunu söylemek yanlış olmaz.

Tümör evrelerine göre bakıldığında ise her iki genomik yapının ekspresyon düzeyleri açısından Ta ve T1 evresi arasında anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla [p=0,235, p=0,230]). Bu pilot çalışma sınırlı bir örneklem büyüklüğü ile yapılmış olup, örneklem büyüklüğü genişletildiğinde bu fark istatistiksel olarak anlamlı hale gelebilir. Böylece her iki genomik yapı da tümör agresivitesini gösteren bir histopatolojik belirteç olarak kullanılabilir. Çalışmanın devamında oturmuş metodolojimizle çok merkezli çalışmalar planlanabilir.

Tümör grade'lerine bakıldığında ise yüksek dereceli grubun düşük dereceli gruba göre hem ZEB-1 AS-1 hem de mir200b düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla [p=0,007,

p=0,015]). Bu durumda araştırmış olduğumuz doku parametrelerinin yüksek dereceli tümörlerin fizyopatolojisinde daha önemli olduğunu ve düşük dereceli tümörlere göre daha agresif gidişten sorumlu etkenlerden birisi olabilir. Bunu destekler şekilde patolojik evresi sadece Ta olan grup ele alınıp tümör gradeleri incelemeye alındığında ise yüksek dereceli Ta olan grupta düşük dereceli Ta olan gruba göre ZEB-1 AS-1 ekspresyonu artmış olarak bulundu (p=0,007). Aynı şekilde mir200b düzeyleri incelendiğinde ise yüksek dereceli Ta olan grupta, düşük dereceli Ta olan gruba göre mir200b ekspresyonlarının arttığı istatiksel olarak anlamlı saptandı (p=0,032).

KİOMK grubunda diğer patolojik negatif faktörler incelendiğinde; ÜK'e eşlik eden CIS varlığı ve eşlik eden varyant patolojilerin varlığında ZEB-1 AS-1 düzeylerinin arttığı ancak bu negatif faktörlerin bulunmadığı gruba göre anlamlı bir fark bulunmadığı saptanmıştır. Diğer taraftan mir200b ekspresyonları ise CIS varlığında artmış, eşlik eden varyant patoloji varlığında ise azalmıştır. Bu genomik yapıların tümör grade'ine etkili olması ancak çok daha önemli patolojik negatif faktörler olan CIS ve varyant histolojilere etkili olmaması, bu genomik yapıların mesane kanserinden sorumlu olan primer ve tek patofizyolojik etken olmadığını düşündürmektedir. Bu konuda laboratuvarımızın daha ileri çalışmalarına ihtiyacı bulunmaktadır.

Sigaranın MK gelişiminde önemli etken olduğu bilinmektedir. Sigara içen grupta ise ZEB-1 AS-1 ve mir200b ekspresyonları azalmış olarak saptanmış ancak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla [p=0,372 ve p=0,688]). Benzer şekilde tümörlü doku incelemeye alındığında ZEB-1 AS-1 ve mir200b gen ekspresyonlarıyla; hasta yaşı, VKİ ve sigara paket yılı arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır. Bu haliyle çalışmamızda klinik ve demografik faktörlerin, her iki genomik yapının yer aldığı patofizyolojik yolakta etkili olmayabileceği sonucuna varılmıştır.

NcRNA'lar doku örneklerinde olduğu gibi serumda, plazmada, idrarda, sıvı bazlı sitolojide ve diğer vücut sıvılarında da tespit edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, miRNA'ların sağlıklı kişilerde ve kanserli hastalarda serum ekspresyon düzeylerinin farklı olduğu gösterilmiştir. Mesane kanseri tanısında ve prognozun öngörülmesinde kullanılacak güvenilir biyobelirtecin elde edilmesi için hangi numune tipinin kullanılması gerektiği net değildir. Ancak doku düzeyinde ROC analizi ile saptadığımız ZEB-1 AS-1 için 2,46 mir200b için 2,25 değerleri, bu genomik yapıların mesane kanseri taraması için; örneğin idrarda olduğu gibi vücut sıvılarında değerlendirilmesi gündeme geldiğinde referans olarak kullanılabilir.

LncRNA ve miRNA idrar ve kanda da tespit edilebilmektedir; ancak şunu da belirtmek gerekir ki; idrardaki belirteç konsantrasyonu diürez ile değişebilmekte ve sonuçlarda tutarsızlığa

yol açabilmektedir. Bunun yanında bu genomik yapıların kanda bakılması; kolaylığı nedeniyle tercih edilebilmekte, ancak hastaların mesane kanseri dışında sahip oldukları ek hastalıkların da ncRNA'yı etkileyebildiği ve değişik sonuçlara yol açabildiği düşünülmektedir (13). Bu pilot çalışmada ncRNA'ların dokuda incelemesi yapılmıştır. Ancak çalışmanın bundan sonraki aşamasında mesane kanserli hastalarda ZEB-1 AS-1 ve/veya mir200b'nin idrardaki düzeylerinin çalışılması düşünülebilir.

Mesane kanserinde miRNA'ların önemine dair en kapsamlı çalışmalardan biri Xie ve ark.'ları tarafından yapılan metaanalizdir. Bu çalışmada araştırmacılar 2009-2016 yılları arasında MK miRNA ilişkisini araştıran tüm çalışmaları farklı veri tabanlarından derleyip filtrelemiş ve heterojen evrelerdeki 2.753 MK'li hastadan oluşan örneklemde prognostik önemi olduğu raporlanan 37 miRNA'yı analiz etmişlerdir. Bu metaanalizde en sık incelenen miRNA'ların miRNA-21, miRNA-143, miRNA-155, miRNA-200, miRNA-214 ve miRNA-222 olduğu görülmüştür. Araştırmacılar bunlar arasında; miRNA-21 ve miRNA-222 ekspresyonunun kısalmış genel sürvi ile korelasyon gösterdiğini, artmış miRNA-143 ve miRNA-155 ekspresyonunun ise kısalmış progresyonsuz sürvi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında azalmış miRNA-214 ekspresyonunun ise kısalmış nükssüz sürvi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Sonuçta bu miRNA panelinin MK bulunan hastaların takibinde kullanılacak yararlı biyobelirteçler ve terapötik hedefler olarak değerlendirilebileceğini ifade etmişlerdir (69). Diğer bir metaanalizde, Cheng ve ark.'ları toplam katılımcı popülasyonu 1.213 olan 23 çalışmayı gözden geçirmişlerdir. Metaanalize alınan çalışmalarda miRNA'ların idrardaki ekspresyonu ölçülmüş ve çoklu miRNA tahlillerinin sensitivite, spesifite değerleri sırasıyla 0,86 ve 0,82 saptanmıştır. Sonuç olarak yazarlar idrar miRNA değerlendirmesinin, MK tanısı için belirteç görevi görebileceğini ve bu yöntemin MK tanısında idrar sitoloji testinden daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (70).

Diğer taraftan, uzun kodlamayan RNA'lar son yıllarda çok sayıda çalışmanın odak noktası olmuştur. Örneğin, Xia ve ark.'ları tarafından yapılan LncRNA ve MK prognozu arasındaki ilişkiyi araştıran 666 hastanın dahil olduğu ve 9 makaleyi içeren metaanalizin sonuçları ise yüksek LncRNA ekspresyonunun Asyalı MK hastalarında daha kısa genel sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermiştir. LncRNA'ların MK için potansiyel prognostik belirteçler olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (71).

LncRNA'ların mikroRNA'lar için sünger görevi görerek, mRNA'lar üzerindeki etkilerini azalttığı ve dolayısıyla çeşitli biyolojik süreçleri düzenlediği öne sürülmüştür. Bu çalışmada

LncRNA olarak ZEB-1 AS-1 kullanılmıştır. Benzer şekilde, Lin ve ark.'ları 55 hastadan oluşan bir kohortta qRT-PCR tahlili kullanılarak ZEB1-AS1 ekspresyonunun tümör olmayan eşleştirilmiş dokularla karşılaştırıldığında MK dokularında "up" regülasyona uğradığını ve daha yüksek histolojik derece ve TNM evresi ile korele olduğunu tespit etmişlerdir (72). Bu nedenle artmış ZEB1-AS1'in, MK'nin karsinogenezinde ve progresyonunda yer aldığını, umut verici bir teşhis ve prognostik biyobelirteç ve potansiyel bir terapötik hedef haline gelebileceğini bildirmişlerdir (72).

Çalışmamıza metodolojik olarak benzeyen Gao ve ark.'larının çalışmasında 60 tümörlü mesane dokusu ve aynı hastadan alınan tümörden >3 cm uzaklıkta olan 23 normal dokuyu değerlendirmeye almışlardır. Çalışmanın sonucunda LncRNA ZEB1-AS1'in miR-200b'yi düzenleyebileceğini ortaya koymuşlardır. Hatırlatmak gerekirse; ZEB1, EMT'nin destekleyicisi ve miR-200b'nin bir hedefidir. Ek olarak, ZEB1'in antisensi olan LncRNA ZEB1-AS1'in birçok kanser türünde onkojenik bir LncRNA olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın sonucunda, yazarlar biyoinformatik analizde, ZEB1-AS1'in MK dokularında normal dokulardan daha fazla eksprese edildiğini, yüksek tümör derecesi ve yüksek TNM evresi ile korele olduğunu ve MK hastalarında genel sağkalımla değil, hastalıksız sağkalımla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (67). Bu da bizim elde ettiğimiz sonuçlarla uyum göstermekte olup; çalışmamızı destekler niteliktedir.

Bir başka çalışmada, Mei ve ark.'ları sistematik derlemelerinde mir200 ailesi ile MK prognozu arasındaki ilişkiyi araştıran 8 çalışma ve 1.150 hastayı değerlendirmişlerdir. Yazarlar genel sağkalım (OS), kansere özgü sağkalım (CSS) ve nükssüz sağkalım (RFS) için risk oranları (HR)'nı hesaplamış ve mir200 ekspresyonunun daha iyi OS (HR: 0,50, %95 CI 0,40-0,62), CSS (HR: 0,36, %95 CI: 0,22-0,59) ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçta, mir200 ailesinin yüksek ekspresyonu, klinik uygulamada MK yönetiminde faydalı olabileceği sonucuna varmışlardır (73). Bizim çalışmamızda; daha önce gösterilen bu LncRNA ve miRNA yolağının MK'nin oluşumunda da rol oynadığı bilinerek her iki ncRNA'nın ayrı ayrı doku ekspresyon düzeyleri hesaplandıktan sonra korelasyon analizi yapılmıştır. Ancak Spearman korelasyon analizinde LncRNA ZEB-1 AS-1 ile mir200b ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Bu çalışmanın çeşitli limitasyonları bulunmaktadır. İlk olarak örneklem büyüklüğü yetersiz olup, bu çalışma bir pilot çalışma olarak yapılmıştır. Çalışmaya mevcut şekliyle devam edilmesi

planlanmaktadır. İkinci olarak, hastaların takip bilgisi bulunmamaktadır. Bunun nedeni takip süresinin yetersiz olmasıdır. Ancak şunu da belirtmek gerekir ki; ZEB 1 AS-1 ve mir200b'nin hastalığın nüks ve progresyonla ilişkisi bilinmemektedir ve devam eden çalışmamızın klinik kısmının bu konuda veri sağlamasını umuyoruz. Üçüncü olarak, kontrol grubu olarak alınan aynı hastaların normal doku örnekleri vizüel olarak normal olarak değerlendirilmiş olup bu dokuların ayrıca histopatolojik olarak tümörsüz olduğu gösterilmemiştir. Bu durum da çalışmamızın sonuçları değerlendirilirken göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak yine de bu çalışma orijinal bir çalışma olup, özellikle üriner biyobelirteçler konusunda daha ileri çalışmalarla fayda sağlayabilir.

6. SONUÇ

Kanser tanısı ve prognozu açısından klinik bilgi sağlayacak biyobelirteçlerin saptanması için patofizyoloji zemininde birçok çalışma yapılmaktadır. Günümüzde kanser hastalarında ncRNA (miRNA'lar ve lnc RNA'lar) zemininde geliştirilmiş; tanı, risk değerlendirmesi ve tedavi stratejileri umut vadetmektedir. Bu çalışmada değerlendirilen her iki belirteç de doku düzeyinde eksprese edilmekte ve mesane tümörünün bazı histopatolojik parametreleri ile ilişki göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler her iki genomik yapıyı içeren üriner biyobelirteç geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Ancak bu konuda ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın verileri, MK fizyopatolojisinin ve ilişkili epigenetik yolakların aydınlatılması açısından yol gösterici olabilir.

KAYNAKÇA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.
2. Jung I, Messing E. Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. Cancer Control. 2000;7(4):325-34.
3. Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, Discovery, and Classification of lncRNAs. Adv Exp Med Biol. 2017;1008:1-46.
4. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA. Cell. 2013;153(3):516-9.
5. Wang J, Zhu S, Meng N, He Y, Lu R, Yan GR. ncRNA-Encoded Peptides or Proteins and Cancer. Mol Ther. 2019;27(10):1718-25.
6. Slack FJ, Chinnaiyan AM. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. Cell. 2019;179(5):1033-55.
7. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993;75(5):843-54.
8. Ding J, Li D, Gong M, Wang J, Huang X, Wu T, et al. Expression and clinical significance of the long non-coding RNA PVT1 in human gastric cancer. Onco Targets Ther. 2014;7:1625-30.
9. Su G, He Q, Wang J. Clinical Values of Long Non-coding RNAs in Bladder Cancer: A Systematic Review. Front Physiol. 2018;9:652.
10. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. Cell. 2019;176(6):1248-64.
11. Cao F, Li Z, Ding WM, Yan L, Zhao QY. LncRNA PVT1 regulates atrial fibrosis via miR-128-3p-SP1-TGF-β1-Smad axis in atrial fibrillation. Mol Med. 2019;25(1):7.
12. Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, et al. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. Cell. 2013;152(3):570-83.
13. Tölle A, Ratert N, Jung K. miRNA panels as biomarkers for bladder cancer. Biomark Med. 2014;8(5):733-46.
14. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 2006;6(11):857-66.
15. Guo CM, Liu SQ, Sun MZ. miR-429 as biomarker for diagnosis, treatment and prognosis of cancers and its potential action mechanisms: A systematic literature review. Neoplasma. 2020;67(2):215-28.
16. Liu J-J, Foster B, Amling CL. CAMPBELL-WALSH-WEIN UROLOGY, TWELFTH EDITION Partin AW, editor2021. 11223-4 p.
17. Elbadawi A. Ultrastructure of vesicourethral innervation. II. Postganglionic axoaxonal synapses in intrinsic innervation of the vesicourethral lissosphincter: a new structural and functional concept in micturition. J Urol. 1984;131(4):781-90.
18. Torrens M MJ. The physiology of the urinary bladder. Springer- Verlag. 1987.
19. Caione P, Capozza N, Zavaglia D, Palombaro G, Boldrini R. In vivo bladder regeneration using small intestinal submucosa: experimental study. Pediatr Surg Int. 2006;22(7):593-9.
20. Abelson B, Sun D, Que L, Nebel RA, Baker D, Popiel P, et al. Sex differences in lower urinary tract biology and physiology. Biol Sex Differ. 2018;9(1):45.

21. Andersson KE, McCloskey KD. Lamina propria: the functional center of the bladder? Neurourol Urodyn. 2014;33(1):9-16.
22. Drumm BT, Koh SD, Andersson KE, Ward SM. Calcium signalling in Cajal-like interstitial cells of the lower urinary tract. Nat Rev Urol. 2014;11(10):555-64.
23. Sánchez Freire V, Burkhard FC, Schmitz A, Kessler TM, Monastyrskaya K. Structural differences between the bladder dome and trigone revealed by mRNA expression analysis of cold-cut biopsies. BJU Int. 2011;108(2 Pt 2):E126-35.
24. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. Eur Urol. 2013;63(2):234-41.
25. Bjurlin MA, Matulewicz RS, Roberts TR, Dearing BA, Schatz D, Sherman S, et al. Carcinogen Biomarkers in the Urine of Electronic Cigarette Users and Implications for the Development of Bladder Cancer: A Systematic Review. Eur Urol Oncol. 2021;4(5):766-83.
26. Koutros S, Kogevinas M, Friesen MC, Stewart PA, Baris D, Karagas MR, et al. Diesel exhaust and bladder cancer risk by pathologic stage and grade subtypes. Environ Int. 2020;135:105346.
27. Egbers L, Grotenhuis AJ, Aben KK, Alfred Witjes J, Kiemeney LA, Vermeulen SH. The prognostic value of family history among patients with urinary bladder cancer. Int J Cancer. 2015;136(5):1117-24.
28. Corral R, Lewinger JP, Van Den Berg D, Joshi AD, Yuan JM, Gago-Dominguez M, et al. Comprehensive analyses of DNA repair pathways, smoking and bladder cancer risk in Los Angeles and Shanghai. Int J Cancer. 2014;135(2):335-47.
29. Buckland G, Ros MM, Roswall N, Bueno-de-Mesquita HB, Travier N, Tjonneland A, et al. Adherence to the Mediterranean diet and risk of bladder cancer in the EPIC cohort study. Int J Cancer. 2014;134(10):2504-11.
30. Liu H, Wang XC, Hu GH, Guo ZF, Lai P, Xu L, et al. Fruit and vegetable consumption and risk of bladder cancer: an updated meta-analysis of observational studies. Eur J Cancer Prev. 2015;24(6):508-16.
31. Vieira AR, Vingeliene S, Chan DS, Aune D, Abar L, Navarro Rosenblatt D, et al. Fruits, vegetables, and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. Cancer Med. 2015;4(1):136-46.
32. Witlox WJA, van Osch FHM, Brinkman M, Jochems S, Goossens ME, Weiderpass E, et al. An inverse association between the Mediterranean diet and bladder cancer risk: a pooled analysis of 13 cohort studies. Eur J Nutr. 2020;59(1):287-96.
33. Dianatinasab M, Wesselius A, Salehi-Abargouei A, Yu EYW, Fararouei M, Brinkman M, et al. Dietary fats and their sources in association with the risk of bladder cancer: A pooled analysis of 11 prospective cohort studies. Int J Cancer. 2022;151(1):44-55.
34. Koutros S, Baris D, Waddell R, Beane Freeman LE, Colt JS, Schwenn M, et al. Potential effect modifiers of the arsenic-bladder cancer risk relationship. Int J Cancer. 2018;143(11):2640-6.
35. Zhang Y, Birmann BM, Han J, Giovannucci EL, Speizer FE, Stampfer MJ, et al. Personal use of permanent hair dyes and cancer risk and mortality in US women: prospective cohort study. Bmj. 2020;370:m2942.
36. Teleka S, Häggström C, Nagel G, Bjørge T, Manjer J, Ulmer H, et al. Risk of bladder cancer by disease severity in relation to metabolic factors and smoking: A prospective pooled cohort study of 800,000 men and women. Int J Cancer. 2018;143(12):3071-82.

37. Hektoen HH, Robsahm TE, Stenehjem JS, Axcrona K, Babigumira R, Mondul AM, et al. Vitamin D and Vitamin D-binding protein and risk of bladder cancer: A nested case-control study in the Norwegian Janus Serum Bank Cohort. Cancer Med. 2021;10(12):4107-16.
38. Moschini M, Zaffuto E, Karakiewicz PI, Andrea DD, Foerster B, Abufaraj M, et al. External Beam Radiotherapy Increases the Risk of Bladder Cancer When Compared with Radical Prostatectomy in Patients Affected by Prostate Cancer: A Population-based Analysis. Eur Urol. 2019;75(2):319-28.
39. Andersson M, Berger M, Zieger K, Malmström PU, Bläckberg M. The diagnostic challenge of suspicious or positive malignant urine cytology findings when cystoscopy findings are normal: an outpatient blue-light flexible cystoscopy may solve the problem. Scand J Urol. 2021;55(4):263-7.
40. Compérat EM, Burger M, Gontero P, Mostafid AH, Palou J, Rouprêt M, et al. Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016". Eur Urol Focus. 2019;5(3):457-66.
41. Waddington CH. Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A. 1939;25(7):299-307.
42. Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 2008;358(11):1148-59.
43. Mishra M, Bishnupuri K. Epigenetic Advancements in Cancer2016. 1-246 p.
44. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. Cell. 2007;128(4):669-81.
45. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med. 2003;349(21):2042-54.
46. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature. 1983;301(5895):89-92.
47. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet. 2004;5(7):522-31.
48. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. Hum Mol Genet. 2006;15 Spec No 1:R17-29.
49. Budakoti M, Panwar AS, Molpa D, Singh RK, Büsselberg D, Mishra AP, et al. Micro-RNA: The darkhorse of cancer. Cell Signal. 2021;83:109995.
50. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(5):376-85.
51. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. Rna. 2019;25(1):1-16.
52. Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. Int J Mol Sci. 2019;21(1).
53. Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. Semin Liver Dis. 2015;35(1):3-11.
54. Korpal M, Kang Y. The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. RNA Biol. 2008;5(3):115-9.
55. Pager CT, Wehner KA, Fuchs G, Sarnow P. MicroRNA-mediated gene silencing. Prog Mol Biol Transl Sci. 2009;90:187-210.
56. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2009;10(2):126-39.
57. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. Annu Rev Pathol. 2009;4:199-227.
58. Klicka K, Grzywa TM, Mielniczuk A, Klinke A, Włodarski PK. The role of miR-200 family in the regulation of hallmarks of cancer. Front Oncol. 2022;12:965231.

59. Feng B, Wang R, Chen LB. Review of miR-200b and cancer chemosensitivity. Biomed Pharmacother. 2012;66(6):397-402.
60. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(28):11667-72.
61. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, Andreasen D, Bernard N, Chen C, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. Nat Methods. 2014;11(8):809-15.
62. Donkers H, Bekkers R, Galaal K. Diagnostic value of microRNA panel in endometrial cancer: A systematic review. Oncotarget. 2020;11(21):2010-23.
63. Li HJ, Gong X, Li ZK, Qin W, He CX, Xing L, et al. Role of Long Non-coding RNAs on Bladder Cancer. Front Cell Dev Biol. 2021;9:672679.
64. Su W, Xu M, Chen X, Chen N, Gong J, Nie L, et al. Long noncoding RNA ZEB1-AS1 epigenetically regulates the expressions of ZEB1 and downstream molecules in prostate cancer. Mol Cancer. 2017;16(1):142.
65. Ghafouri-Fard S, Askari A, Behzad Moghadam K, Hussen BM, Taheri M, Samadian M. A review on the role of ZEB1-AS1 in human disorders. Pathol Res Pract. 2023;245:154486.
66. Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. Int J Cancer. 2013;132(4):745-54.
67. Gao R, Zhang N, Yang J, Zhu Y, Zhang Z, Wang J, et al. Long non-coding RNA ZEB1-AS1 regulates miR-200b/FSCN1 signaling and enhances migration and invasion induced by TGF-β1 in bladder cancer cells. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):111.
68. Kocarnik JM, Compton K, Dean FE, Fu W, Gaw BL, Harvey JD, et al. Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. JAMA Oncol. 2022;8(3):420-44.
69. Xie Y, Ma X, Chen L, Li H, Gu L, Gao Y, et al. MicroRNAs with prognostic significance in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2017;7(1):5619.
70. Cheng Y, Deng X, Yang X, Li P, Zhang X, Li P, et al. Urine microRNAs as biomarkers for bladder cancer: a diagnostic meta-analysis. Onco Targets Ther. 2015;8:2089-96.
71. Xia Y, Liu Z, Yu W, Zhou S, Shao L, Song W, et al. The prognostic significance of long noncoding RNAs in bladder cancer: A meta-analysis. PLoS One. 2018;13(6):e0198602.
72. Lin J, Zhan Y, Liu Y, Chen Z, Liang J, Li W, et al. Increased expression of ZEB1-AS1 correlates with higher histopathological grade and promotes tumorigenesis in bladder cancer. Oncotarget. 2017;8(15):24202-12.
73. Mei Y, Zheng J, Xiang P, Liu C, Fan Y. Prognostic value of the miR-200 family in bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2020;99(47):e22891.