



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MESANE KANSERİ TANISINDA KULLANILMAK ÜZERE
ÜRİNER PROTEİN VE EKZOZOMAL MİKRO RNA
BELİRTECİ SAPTANMASI**

GÖKÇE GÜLLÜ AMURAN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DANIŞMAN
Prof. Dr. MUSTAFA AKKİPRİK

2018-İSTANBUL



REPUBLIC OF TURKEY
MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

**IDENTIFICATION OF URINARY PROTEIN AND EXOSOMAL
MICRO RNA MARKERS FOR THE DIAGNOSIS OF BLADDER
CANCER**

GÖKÇE GÜLLÜ AMURAN

Ph.D. THESIS

MEDICAL BIOLOGY AND GENETICS

SUPERVISOR

Prof. Dr. MUSTAFA AKKİPRİK

2018-İSTANBUL

1. TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi : Gökçe GÜLLÜ AMURAN
Tez Başlığı : Mesane Kanseri Tanısında Kullanılmak Üzere Üriner Protein ve Ekzozomal Mikro RNA Belirteci Saptanması
Sınav Yeri : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 28/12/2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu
Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK	Marmara Üniversitesi
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)	
Prof. Dr. Ayşe ÖZER	Marmara Üniversitesi
Prof. Dr. Fehmi Narter	Acıbadem Üniversitesi
Prof. Dr. İlhan ONARAN	İstanbul Üniversitesi
Doç. Dr. İlker TİNAY	Marmara Üniversitesi

İmza


Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 09 Ocak 2019 tarih ve 57 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

2. BEYAN

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

Gökçe GÜLLÜ AMURAN

İmza

3. ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Kolay ulaşılabilir biyolojik materyaller ve hastalık belirteçleri benim için her zaman çok kıymetli oldu. Doktora tezimi adı kulağa çok da hoş gelmeyen “ıdrar” örnekleri ile yürütmem bu yüzdendir. Kanserde erken tanının önemine olan inancım, “hastayı çok rahatsız etmeden” tanı koyulabilmesi arzum üriner biyobelirteçlere olan ilgimi gün be gün arttırdı. Bir insanın eğitim hayatında en tatmin edici hislerden birinin, merak ettiği, ilgi duyduğu konuları araştırabilmesi olduğuna inanırım. İşte tam da bu yüzden saygıdeğer hocam, sevgili danışmanım Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK’e sonsuz teşekkür borçluyum.

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalına adımımı attığım ilk günden itibaren, çözemediğim her bilimsel soruda, bocaladığım her duygusal çıkmazda cevaplarını, bilimsel desteğini, teşviki ve yol göstericiliğini asla esirgemeyen, müthiş bir saygı ve çok büyük bir sevgi beslediğim sayın hocam Prof. Dr. Ayşe ÖZER’e en içten duygularla teşekkür ederim.

Bakış açısına, okuma aşkına, bildiğini öğretme tutkusuna büyük hayranlık beslediğim sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Can ERZİK, her soruma sıklımadan, küçümsemeden daima cevap bulmaya çalıştı, yer yer bir soru için saatlerini ayırdı. Can hocaya bir soru sormak aslında onlarca yeni soru sormama sebep oldu daima, her seferinde merakım kamçlandı, araştırma arzum arttı. Bilgi birikimini bizlere aktarmakta bu denli bonkör davrandığı için minnettarım. Bizimle hayatı paylaştığı için, yer yer abi, yer yer hoca, yer yer meslektaş olduğu için, değer verdiği, önemsendiğimizi hissettirdiği için ayrıca teşekkür ederim.

İdrar örneklerinin toplanması, hasta bilgilerinin incelenmesi sürecindeki özverili desteğinden ötürü sayın hocam Doç. Dr. İlker TİNAY’a, örneklerin patolojik değerlendirmesi sürecindeki katkılarından ötürü Dr. Öğr. Üyesi Deniz FİLİNTE’ye çok teşekkür ederim.

Can arkadaşım İrem’e deneylerim sürecinde, tez yazım sürecinde yardımları ve duygusal desteği için çok teşekkür ederim.

Hayatın sırrının sevmek ve hayal kurmak olduğuna hep inandım. Hayallerimin bilimsel gerçekler ile desteklenmesinde hocalarıma katkısı sonsuz. Bu samimiyeti, bu sevgiyi bana yaşattıkları için bölümdeki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

Hem anne hem öğrenci olmaya çalıştığım bu zorlu süreçte yükümü hafifletmek için elinden geleni yapan aileme sonsuz teşekkür ederim. Ve biricik kızım Masal, bu tezi senin için yazdım, dilerim bizlerden daha çok okuduğun, daha aydınlık bir ömrün olur.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-1310160441 numaralı proje ile desteklenmiştir.

4. İÇİNDEKİLER

1. TEZ ONAYI	i
2. BEYAN.....	i
3. ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	i
4. İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER	xii
EKLER LİSTESİ	xv
5. TÜRKÇE ÖZET	1
6. SUMMARY	2
7. GİRİŞ ve AMAÇ	3
8. GENEL BİLGİLER.....	9
8.1. Mesane Kanseri.....	9
8.1.1. Mesane kanseri patofizyolojisi.....	10
8.1.2. Mesane kanserlerinin sınıflandırılması	10
8.1.2.1. Evre (Stage).....	10
8.1.2.2. Derece (Grade).....	12
8.1.2.3. Mesane kanserinin genetik özelliklere göre sınıflandırılması.....	13
8.1.2.3.1. Papiller ve non-papiller tip	13
8.1.2.3.2. Bazal ve luminal tip	14
8.1.2.4. Ürotelyal karsinomun histolojik varyantları	15
8.1.3. Mesane kanseri tanı ve tedavisi.....	16
8.1.3.1. İdrar sitolojisi	16
8.1.3.2. İdrar yolu görüntülemeleri	17

8.1.3.3. Tedavi yaklaşımları.....	17
8.1.4. Mesane kanseri sebepleri ve risk faktörleri.....	19
8.1.4.1. Yapısal risk faktörleri.....	20
8.1.4.2. Genetik faktörler	20
8.1.4.2.1. Yüksek penetrans gösteren genler ve ailesel kanser sendromları	20
8.1.4.2.2. Herediter nonpolipozis kolorektal kanser sendromu	21
8.1.4.2.3. Herediter retinoblastoma.....	21
8.1.4.2.4. Costello sendromu.....	21
8.1.4.2.5. Apert sendromu.....	22
8.1.4.2.6. CDC91L1 genindeki germline mutasyonlar	22
8.1.4.3. Karsinojen metabolizmasında görevli genlerdeki polimorfizmler.....	22
8.1.4.3.1. Asetilasyon genleri.....	22
8.1.4.3.2. Glutasyon S-transferaz genleri	23
8.1.4.3.3. Sitokrom P-450 grubu genler	23
8.1.4.3.4. Siklooksijenaz 2 geni	23
8.1.4.4. DNA tamir genleri.....	23
8.1.4.5. Diğer genetik yatkınlık faktörleri.....	24
8.1.4.6. Çevresel ve mesleki risk faktörleri.....	24
8.2. Mesane Kanseri İdrar Belirteçleri	25
8.2.1. Mesane kanseri biyobelirteci olarak üriner miRNA'lar.....	27
8.2.1.1. Ekzozom biyogenezi ve ekzozomal miRNA'lar.....	32
8.2.1.2. miR-136-3p	36
8.2.1.3. miR-210-3p	36
8.2.1.4. miR-21-5p	36
8.2.1.5. miR-139-5p	38
8.2.1.6. miR-19b1-5p	38
8.2.1.7. miR-16-5p	39
8.2.1.8. İdrarda miRNA normalizasyonu	40
8.2.2. Mesane kanseri biyobelirteci olarak üriner proteinler	40
8.2.2.1. Apürinik/apirimidinik endonükleaz 1/redoks faktör-1 (Ape1-Ref1).....	41

8.2.2.2. Mesane kanseri ilişkili nükleer matriks proteini 4 (BLCA4).....	41
8.2.2.3. Adaptör protein crk (CRK)	42
8.2.2.4. Nükleer matriks protein 22 (NMP22)	42
8.2.2.5. Vimentin (VIM)	43
9. GEREÇ VE YÖNTEM	44
9.1. Hasta Örneklerinin Eldesi ve Klinik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	44
9.2. Kullanılan Aletler.....	44
9.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri	45
9.4. Kullanılan Kimyasallar	46
9.5. İdrar Örneklerinden Ekzozomal RNA İzolasyonu	46
9.6. Ekzozomal RNA’lardan cDNA Sentezi	47
9.7. cDNA’dan Real-time PZR Amplifikasyonu ile miRNA Kantitasyonu	48
9.8. ELISA Testi ile İdrar Örneklerinde Protein Kantitasyonu.....	51
9.9. İstatistiksel Analiz.....	54
10. BULGULAR	55
10.1. Örnek Gruplarının Özelliklerinin Belirlenmesi	55
10.2. İdrar Örneklerinden Ekzozomal RNA İzolasyon Sonuçları.....	57
10.3. Real-Time PZR Sonuçları	57
10.3.1. miR-136-3p Ekspresyonlarının Analizi	64
10.3.2. miR-210-3p Ekspresyonlarının Analizi	70
10.3.3. miR-21-5p Ekspresyonlarının Analizi	73
10.3.4. miR-139-5p Ekspresyonlarının Analizi	74
10.3.5. miR-19b1-5p Ekspresyonlarının Analizi	78
10.3.6. miR-16-5p Ekspresyonlarının Analizi	83
10.3.7. miRNA Ekspresyonları arası ilişkiler	84
ELISA Sonuçları	84
10.4. Tanısal Model Geliştirilmesi.....	105

11. TARTIŞMA ve SONUÇ	107
12. KAYNAKLAR	120
13. EKLER.....	143
14. ÖZGEÇMİŞ.....	144



TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Mesane kanseri TNM Evreleme sistemi.....	12
Tablo 2: Klinik açıdan düşük, orta ve yüksek riskli tümörler ve özellikleri.....	19
Tablo 3: Mesane kanserinde deregule olan üriner miRNA'lar.	29
Tablo 4: miR-19b1-5p'nin hedef genleri ve doğrulama yöntemleri	38
Tablo 5: cDNA sentez reaksiyon içeriği ve koşulları.....	48
Tablo 6: Eş zamanlı niceleyici PZR reaksiyon içeriği ve koşulları.	49
Tablo 7: Elisa deneylerinde kullanılan standartlar, dilüsyon şekilleri ve konsantrasyonları. ...	53
Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen bireylerin yaş dağılımları.....	55
Tablo 9: Primer tümörlü ve nüks hastalarının risk grubu dağılımları.	56
Tablo 10: miRNA ekspresyon deneylerinde elde edilen ortalama Ct değerleri.....	58
Tablo 11: miRNA ekspresyon deneylerinde elde edilen Δ Ct değerleri	61
Tablo 12: Mesane kanseri hastaları, takip hastaları ve kontrol grubunda miR-136-3p eksprese eden ve etmeyen hasta sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.	64
Tablo 13: Mesane kanseri risk gruplarında miR-136-3p eksprese eden ve etmeyen hasta sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.....	65
Tablo 14: Primer tümör ve nüks hastalarında miR-136-3p eksprese eden ve etmeyen hasta sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.....	66
Tablo 15 : Mesane kanseri risk grupları, kontrol grubu ve takip hastalarında anlamlı fark gözlenen miR-136-3p Δ Ct değerleri ve ekspresyonlar.....	68
Tablo 16: Mesane kanseri alt risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında anlamlı fark gözlenen Δ Ct değerleri ve ekspresyonlar.	69
Tablo 17: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarında miR-210-3p eksprese eden ve etmeyen örnek sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.	70
Tablo 18: Primer tümör, nüks hastaları ve kontrol grubunda miR-210-3p eksprese eden ve etmeyen örnek sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.	71
Tablo 19: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri risk grupları ve takip hastalarının miR-210-3p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.....	72

Tablo 20: Mesane kanseri hastaları, takip hastaları ve kontrol grubunda miR-139-5p eksprese eden ve etmeyen hasta sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.	75
Tablo 21: Primer tümör, nüks, takip hastaları ve kontrol grubunda miR-139-5p eksprese eden örnek sayıları ve yüzdeleri.	76
Tablo 22: miR-139-5p ekspresyon farkı gözlenen grupların ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.	77
Tablo 23: Mesane kanseri alt risk gruplarının miR-139-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.	78
Tablo 24: Mesane kanseri hastaları, takip hastaları ve kontrol grubunda miR-139-5p eksprese eden ve etmeyen hasta sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.	79
Tablo 25: Mesane kanseri risk gruplarında miR-19b1-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.	80
Tablo 26: Mesane kanseri alt risk gruplarında, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında miR-19b1-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.	81
Tablo 27: İnvazif ve non invazif örnek gruplarında miR-19b1-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.	82
Tablo 28: Non invazif mesane kanserleri, invazif mesane kanserleri ve sağlıklı kontrollerde miR-19b1-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.	83
Tablo 29: miRNA ekspresyonları arası korelasyonlara ilişkin istatistiksel değerler.	84
Tablo 30: ELISA deneyleri sonucu elde edilen optik dansiteler kullanılarak hesaplanmış protein konsantrasyonları.	85
Tablo 31: ELISA yöntemi sonucu elde edilen idrar protein konsantrasyonlarının Kreatinine göre normalize edilmesi sonucu elde edilen üriner protein konsantrasyonları.	88
Tablo 32: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarının üriner protein konsantrasyonlarına ilişkin istatistiksel değerler.	92
Tablo 33: Üriner konsantrasyonlarında anlamlı fark gözlenen gruplara ilişkin istatistiksel değerler.	93
Tablo 34: Üriner protein konsantrasyonu incelenen örneklerin risk gruplarına göre dağılımı	98

Tablo 35: Sağlıklı kontroller ve düşük orta risk hasta grubu arasında konsantrasyon farkı gözlenen proteinlere ilişkin istatistiksel değerler.	99
Tablo 36: Sağlıklı kontroller ve yüksek risk hasta grubu arasında konsantrasyon farkı gözlenen proteinlere ilişkin istatistiksel değerler.	102
Tablo 37: Sağlıklı kontroller ve kasa invaze metastatik hasta grubu arasında konsantrasyon farkı gözlenen proteinlere ilişkin istatistiksel değerler.	103
Tablo 38: Primer tümör hastaları ve nüks hastaları arasında konsantrasyon farkı gözlenen proteinlere ilişkin istatistiksel değerler.	104



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: İnsanda idrar yolu.	9
Şekil 2: TNM Evreleme sistemine göre mesane kanserinin sınıflandırılması ve mesane bölümleri (Down ve ark., 2016).	11
Şekil 3: Normal ürotelyal hücreler (A) ve ileri derece mesane kanseri hücreleri (B).	17
Şekil 4: Ekzozom oluşumunun şematize anlatımı.	35
Şekil 5: Eş zamanlı PZR amplifikasyon eğrisi.	49
Şekil 6: Eş zamanlı PZR erime eğrisi.	50
Şekil 7: Sandwich ELISA yönteminin şematize anlatımı.	53
Şekil 8: Çalışmaya dahil edilen grupların dağılım yüzdeleri.	56
Şekil 9: Sağlıklı kontroller ve mesane kanseri risk gruplarında mir-136-3p eksprese eden ve etmeyen örnek sayıları.	65
Şekil 10: Sağlıklı kontroller ve mesane kanseri risk gruplarında miR-136-3p ekspresyonu trend eğrisi.	66
Şekil 11: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarının miR-136-3p Δ Ct değerleri.	67
Şekil 12: Mesane kanseri risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarının miR-136-3p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.	68
Şekil 13: Mesane kanseri alt risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarının miR-136-3p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.	70
Şekil 14: Primer tümörü olan hastalar, nüks hastaları ve sağlıklı kontrollerin miR-210-3p eksprese eden ve etmeyen örnek sayıları.	71
Şekil 15: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip grubunda miR-210-3p ekspresyonu ve Δ Ct değerleri.	72
Şekil 16: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri risk grupları ve takip hastalarının miR-210-3p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.	73
Şekil 17: Primer tümör ve nüks hastalarının Δ Ct miR-210-3p (a) ve miR-210-3p ekspresyon (b) değerleri.	73
Şekil 18: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri risk grupları ve takip hastalarının (a) ve mesane kanseri risk gruplarının (b) Δ Ct miR-21-5p değerleri.	74
Şekil 19: Nüks ve primer tümör hastalarının Δ Ct miR-21-5p değerleri.	74

Şekil 20: Primer tümör, nüks hastaları, takip hastaları ve sağlıklı kontrollerde miR-139-5p eksprese eden ve etmeyen örnek sayıları.	75
Şekil 21: Mesane kanseri risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında miR-139-5p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.	77
Şekil 22: Mesane kanseri alt risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında miR-139-5p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.	78
Şekil 23: Mesane kanseri risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında miR-19b1-5p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.	80
Şekil 24: Mesane kanseri alt risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında miR-19b1-5p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.	81
Şekil 25: İnvazif ve non invazif örnek grubunda miR-19b1-5p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.	82
Şekil 26: İnvazif mesane kanserleri, non invazif mesane kanserleri ve sağlıklı kontrollerin miR-19b1-5p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.	83
Şekil 27: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarında üriner protein konsantrasyonları.	92
Şekil 28: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip örneklerindeki üriner Ape1/Ref1 konsantrasyonları.	94
Şekil 29: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip örneklerindeki üriner BLCA4 konsantrasyonları.	94
Şekil 30: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip örneklerindeki üriner CRK konsantrasyonları.	95
Şekil 31: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip örneklerindeki üriner VIM konsantrasyonları.	95
Şekil 32: Üriner proteinlerin tanısal değerinin araştırılmasında ROC eğrisi, kesim noktaları, duyarlılık ve özgüllük değerleri.	96
Şekil 33: Mesane kanseri hastaları ve takip hastalarının üriner protein konsantrasyonlarına ilişkin ROC eğrileri.	97
Şekil 34: Mesane kanseri risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında protein konsantrasyonları.	98
Şekil 35: Sağlıklı kontroller ve düşük orta risk grubunda protein konsantrasyonları.	99

Şekil 36: Sağlıklı kontroller ve düşük orta riskli mesane kanseri hastaları arasında üriner proteinlerin ROC eğrileri ve istatistiksel değerleri.....	100
Şekil 37: Düşük risk grubu mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontroller arasında tanısal değeri en yüksek olan proteinlere ilişkin istatistiksel değerler.....	101
Şekil 38: Sağlıklı kontroller ve yüksek riskli mesane kanseri hasta grubunda üriner protein konsantrasyonları.....	102
Şekil 39: Sağlıklı kontroller ve kasa invaze metastatik hasta grubunda üriner protein konsantrasyonları.....	103
Şekil 40: Primer tümör ve nüks hastalarında üriner protein konsantrasyonları.....	104
Şekil 41: Üriner miRNA'lar ve BLCA4 paneli ile mesane kanseri tanısının ROC eğrisi (a) ve nokta diyagramı (b).....	105
Şekil 42: Elde edilen panelin düşük risk hasta grubu ve sağlıklı kontrollerin ayrımı için ROC eğrisi ve nokta diyagramı.....	106

KISALTMALAR VE SİMGELER

2DE-MS: 2 boyutlu kütle spektrofotometresi

A1AT: Alfa-1 antitripsin

ANG: Anjiogenin

Ape1/Ref1: Apürinik/apirimidinik endonükleaz 1/redoks faktör-1

APO-A1: Apolipoprotein-A1

BC: Mesane kanseri

BLCA4: Mesane kanseri ilişkili nükleer matriks proteini 4

BT: Bilgisayarlı tomografi

BTA: Mesane tümörü antijeni

CA9: Karbonik anhidraz

CCL18: C-C motif kemokin ligandı-18

Ck20: Sitokeratin 20

c-Met: Tirozin kinaz met

COMT: Katekol-ometiltransferaz

COX2: Siklooksijenaz-2 geni

CRK: Sinyal adaptör proteini crk

CRT: Kalretikulin

CYP1A2: Sitokrom P-450-1A2 geni

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EGF: Epitelyal büyüme faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

ELISA: Enzim bağlantılı immunosorbent testi

EMT: Epitelyal mezankimal geçiş

ESCRT: Taşınma için gerekli endozomal ayırma kompleksi

FDP: Fibrin fibrinojen degradasyon ürünü

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FGFR: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü

GSTM-1: Glutasyon S-transferaz-M1

HIF-1: Hipoksi indüklenebilir faktör -1

HRAS: HRAS protoonkogeni

HYAL1: Hiyaluronoglukozaminidaz 1

IGF1R: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü

IGFBP5: İnsülin benzeri büyüme faktörü-5

IL8: İnterlökin-8

ILV: İntرالuminal veziküller

JUN: Jun protoonkogeni

Ki-67: Proliferasyon belirteci protein Ki-67

lncRNA: Uzun non koding RNA

MIBC: Kasa invazif mesane kanseri

miRNA: mikro RNA

MLH: Mut L homologu

MMP11: Matriks metallopeptidaz 11

MMP-2: Matrix metalloproteinaz-2

MMP-9: Matrix metalloproteinaz-9

MRI: Manyetik rezonans görüntüleme

MSH: Mut S homologu

MVB: Multiveziküler body

NAT: N-asetil transferaz genleri

NAT2: N asetil transferaz 2

NFGR: Sinir büyüme faktörü reseptörü

NMIBC: Kasa invazif olmayan mesane kanseri

NMP22: Nükleer matriks protein 22

Notch3: Translokasyon ilişkili NOTCH proteini

OPN: Osteopontin

PAH: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar

PAI-1: Plasminojen aktivatör inhibitör-1

PDGFR: Trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü

PD-L1: Programlı ölüm ligandı

PIK3CA: Fosfoinositid-3-Kinaz

PMS2: DNA yanlış eşleşme onarım sistemi bileşeni PMS

PTEN/ MMAC1: Fosfataz ve tensin homoloğu

PTX3: Pentraksin-3

PUNLMP: Düşük malign potansiyelin papiller ürotelyal neoplazması

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

Rb1: Retinoblastoma 1

RR: Rölatif risk

SCC: Skuamöz hücreli karsinom

SDC1: Sindekan-1

SNARE: Çözünebilir NFS ekleme protein reseptörü

SNCG: Gamma-sinuklein

TUR: Transüretral rezeksiyon

TURBT: Mesane tümörünün transüretral olarak çıkarılması

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VIM: Vimentin

EKLER LİSTESİ

Özgeçmiş



5. TÜRKÇE ÖZET

Tez Başlığı: Mesane kanseri tanısında kullanılmak üzere üriner protein ve ekzozomal mikro RNA belirteci saptanması

Öğrencinin Adı: Gökçe GÜLLÜ AMURAN

Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Amaç: Üriner ekzozomlarda miRNA ve üriner protein ekspresyonlarının mesane kanserinde biyobelirteç özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Mesane kanseri tanısı almış 59 birey ve 34 sağlıklı gönüllü ve 12 takip hastasının idrar örneklerinde ekzozomal miR-19b1-5p, 21-5p, 136-3p, 139-5p, 210-3p ekspresyonları qRT-PCR; BLCA-4, NMP22, APE1/Ref1, CRK, VIM protein ekspresyonları ELISA yöntemi ile incelendi.

Bulgular: Kas invazyonu gözlenen grupta miR-136-3p eksprese eden örnek yüzdesinin sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu ($p=0,0091$), en düşük ekzozomal miR-136-3p, miR-139-5p ve miR-19b1-5p ekspresyonun kasa invaze metastatik grupta olduğu belirlendi. Üriner BLCA-4, APE1/Ref1, CRK ve VIM konsantrasyonlarının mesane kanseri hastalarında sağlıklı kontrollerden yüksek olduğu, miR-136-3p, 139-5p, 19b1-5p ve BLCA4 ile oluşturulmuş modelin %83,5 duyarlılık, %73,5 özgüllük ile kanser kontrol ayırımı yaptığı, miR-136-3p ve BLCA4 ile oluşturulmuş modelin düşük risk grubunu sağlıklı kontrollerden %93,3 duyarlılık, %97,1 özgüllük ile ayırdığı tespit edildi.

Sonuçlar: Elde edilen panel sağlıklı kontroller ve mesane kanserlerini ($AUC=0,887$) ayırmada da düşük riskli hasta grubunu sağlıklı kontrollerden ($AUC=0,969$) ayırmada da idrar sitolojisine göre üstündür. Ortak belirteçler ile iki ayırımın sağlanması maliyet açısından da avantajlıdır. Yüksek hasta sayısı ile valide edilmesi klinik pratikte kullanımının önünü açabilir.

Anahtar Sözcükler: Mesane kanseri, ekzozom, miRNA, üriner protein, biyobelirteç

6. SUMMARY

Title: Identification of urinary protein and exosomal micro RNA markers for the diagnosis of bladder cancer

Name: Gökçe GÜLLÜ AMURAN

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK

Department: Medical Biology and Genetics

Objective: The aim of this study was to investigate the biomarker properties of urinary exosomal miRNAs and urinary protein concentrations in bladder cancer.

Material and Methods: Urine exosomal miR-19b1-5p, 21-5p, 136-3p, 139-5p, 210-3p expressions of 59 bladder cancer patients, 34 healthy volunteers and 12 follow-up patients were examined by qRT-PCR. BLCA-4, NMP22, APE1 / Ref1, CRK and VIM protein expressions in urine were examined by ELISA method.

Results: The percentage of miR-136-3p expressing specimens in muscle invasive bladder cancer specimens was higher than in healthy controls ($p = 0.0091$). The lowest exosomal miR-136-3p, miR-139-5p and miR-19b1-5p expression were detected in the muscle invasive metastatic group. Urinary BLCA-4, APE1 / Ref1, CRK and VIM concentrations were higher in patients with bladder cancer than healthy controls. Logistic regression model consisting of miR-136-3p, 139-5p, 19b1-5p and BLCA4 was differentiated bladder cancer patients from healthy controls with a sensitivity of 83.5% and specificity of 73.5%. miR-136-3p and BLCA4 model was found to differentiate low risk group bladder cancer patients from healthy controls with a sensitivity and specificity of 93.3% and 97.1% respectively.

Conclusions: The panel obtained was superior to urine cytology in separating bladder cancers from healthy controls ($AUC = 0,887$) and low risk patients from healthy controls ($AUC = 0,969$). It is also advantageous in terms of cost to ensure two distinctions with common markers. Validation with a high number of patients may lead to use in clinical practice.

Keywords: Bladder cancer, miRNA, exosome, urinary protein, biomarker

7. GİRİŞ ve AMAÇ

Mesane kanseri (BC), GLOBOCAN verilerine göre dünyada en sık gözlenen kanserler arasında 10'uncu sırada yer almaktadır (Bray ve ark., 2018). Erkeklerde insidans ve mortalite kadınlardan yaklaşık 4 kat daha fazladır. Erkeklerde en yaygın görülen 6'ncı kanser ve kansere bağlı ölümlerin en sık gözlenen 9'uncu nedenidir. (J. Ferlay ve ark., 2010; Bray ve ark., 2018). Amerika birleşik devletlerinde en sık gözlenen kanserler arasında altıncı sırada yer alır, erkeklerde en sık gözlenen kanserler arasında üçüncü, kadınlarda ise en sık gözlenen kanserler arasında on birinci sırada yer almaktadır. Türkiye'de erkeklerde en sık görülen üçüncü kanserdir (Tinay ve Türkeri, 2012).

Mesane kaynaklı malign tümörlerin çoğu epitel kaynaklıdır ve histolojik olarak "ürotelyal karsinom" olarak tanımlanır. Mesane kanseri kasa invaze olmayan (Non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC) ve kasa invaze mesane kanseri (muscle invasive bladder cancer, MIBC) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Olguların %75'i tanı anında kasa girişimsel olmayıp mukoza (evre Ta, CIS) veya submukoza (evre T1) ile sınırlıdır (NMIBC). Bu tümörler düşük evreli karsinomlar olmakla beraber takip esnasında nüks ve progresyon gösterme ihtimalleri oldukça yüksektir. NMIBC erken teşhis edildiğinde 5 yıllık sağ kalım oranı %90'dan fazladır. Ancak hastalığın NMIBC evresinde tanısı yakın takip ve ek tedaviler gerektirebilir. NMIBC'nin 5 yıllık nüks oranı %50-70, MIBC'ye ilerleme oranı %10-30 arasındadır (Tinay ve Mungan, 2017). Bu nedenle hastalar risk seviyelerine göre 3 aylık, 6 aylık ve yıllık olarak sistoskopi takibine alınır (NICE, 2017). MIBC ise yeni tanı almış mesane kanserlerinin %20-%30'unu oluştursa da mesane kanserinden ölümlerin büyük çoğunluğunun nedenidir. Mesane karsinomlarında tedavi düşük evrelerde transüretral rezeksiyon (TUR) ve adjuvan intravezikal immünoterapi veya kemoterapidir (Burger ve ark., 2013). Kas invazyonu olması durumunda radikal sistektomi ve sistemik kemoterapiye kadar uzanan radikal tedavi seçenekleri gündeme gelmekte ve hastaların sağ kalım oranları ve yaşam kaliteleri de düşmektedir. Mesane karsinomları sebebiyle gerçekleşen ölümlerin %32-47'si ilk tanı anında düşük evrede olup hızla ilerleme gösteren olgulardır (Amin ve ark., 2015).

Günümüzde mesane kanserinin tanısında ve takibinde kullanılan standart yöntem kanserin evresine göre 3 ayda bir girişimsel bir yöntem olan sistoskopi ile mesanenin endoskopik olarak gözlemlenmesi ve gerekirse sitoloji ve biyopsi alınarak, alınan biyopsi materyalinin histopatolojik incelenmesidir. Mesane kanserli hastaların takibinde altın standart 3 ayda bir, takip eden iki yıl içinde 6 ayda bir, sonraki 10 yıl boyunca yılda bir ve ilerleyen yıllarda gerekli görülmesi durumunda doktor önerisi ve hasta tercihi de dikkate alınarak ömür boyu yılda bir sistoskopi yapılmasıdır (NICE, 2017). Ancak hassasiyeti %90 olsa da sistoskopi girişimsel bir yöntem olup, küçük tümörler gözden kaçabilmektedir. Girişimsel olmayan bir yöntem olarak idrar sitoloji analizi mesane kanseri tanı ve takibinde kullanılabilse de düşük hassasiyet nedeniyle tercih edilmemektedir. Bu nedenle mesane kanseri tanı ve prognozunda kullanılabilecek girişimsel olmayan biyobelirteçler oldukça önem taşımaktadır.

Mesane kanserinde prognostik, yüksek risk hastaların tanımlanması, tedavi yönteminin seçilmesi için biyobelirteç olarak çeşitli moleküller tanımlanmıştır (Alvarez ve Lokeshwar, 2007). Ancak, tanımlanan birçok biyobelirtecin klinik geçerliliği hakkında net bir bilgi yoktur. İdrar proteom analizleri ile aday biyobelirteçler saptanmıştır. Mesane tümör antijeni (Bladder Tumor Antigen, BTA), nükleer matriks preoteini 22 (Nuclear Matrix Protein 22, NMP22), matiks metalloproteinaz- 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2), MMP-9, kalretikulin (CRT), gamma-sinüklein (SNCG), katekol- ometiltransferaz (COMT), fibrin fibrinojen yıkım ürünü (fibrin fibrinogen degradation product, FDP), interlökin-8 (IL8), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), fibronektin, sitokeratin 20 (ck20), 8, 18, insülin benzeri büyüme faktörü-5 (IGFBP5), clusterin gibi proteinlerin incelenmesinin mesane kanseri tanısı için biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir (Darwiche ve ark., 2015).

Sağlıklı bireyler ve mesane kanserli hastaların idrar örnekleri 2 boyutlu kütle spektrofotometresi (2DE MS) analizi ile incelendiğinde iki grubun idrar örnekleri arasında çeşitli protein ekspresyon farklılıkları olduğu gözlenmiştir. Bu proteinlerden apolipoprotein-A1 (Apo-A1) mesane kanserli hastaların sağlıklı bireylerden ayrılmasında %91,6 duyarlılık ve %85,7 özgüllüğe sahiptir (Li ve ark., 2011). Apo-A1'in mesane kanseri tanısında kullanılabilecek bir biyobelirteç olduğu

farklı çalışmalarda da doğrulanmıştır ancak tek başına yeterli değildir (Chen ve ark., 2010).

İdrar proteom analizleri ürotelyal kanserlerin tanı ve takibinde oldukça önem taşımaktadır. 64 mesane kanseri hastasının olduğu 127 kişiye ait idrar örneği kullanılarak yapılan çalışmada 14 biyobelirtecın idrar yoğunlukları enzim bağlantılı immunosorbent (ELISA) yöntemi ile incelenmiştir. IL-8, MMP-9, MMP-10, syndecan-1 (SDC1), c-C motif kemokin ligandı-18 (CCL18), plasminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), CD44, VEGF, anjiogenin (ANG), karbonik anhidraz (CA9), alfa-1 antitripsin (A1AT), osteopontin (OPN), pentraksin-3 (PTX3), APOE'den oluşan 8 biyobelirteçli model en kesin BC tanısı (duyarlılık %92, özgüllük %97) sağlarken 3 belirteçli model (IL-8, VEGF, APOE) de yüksek hassasiyete sahiptir (duyarlılık %90, özgüllük %97) (Matullo ve ark., 2016). Ticari BTA-Trak ELISA kit %79 duyarlılığa, %83 özgüllüğe sahiptir idrar sitolojisi ise aynı popülasyondaki BC olgularının sadece %33'ünü tespit edebilmiştir.

105 hasta ve 156 sağlıklı kontrol örneğinin kullanıldığı bir çalışmada idrar pelletinde survivin, proliferasyon belirteci protein Ki-67 (Ki-67), CK20 ekspresyonları niceleyici PZR yöntemi ile incelenmiş ve CK20'nin idrar sitolojisi ile birlikte mesane kanseri tanısında kullanılmaya aday bir girişimsel olmayan belirteç olabileceği saptanmıştır (Schmidt ve ark., 2016).

Epitelyal mezankimal geçiş (EMT) tümör invazyonu ve metastazında kritik rol oynamaktadır. Bu süreçte epitelyal belirteçlerin ekspresyonu azalmakta, mezankimal belirteçler ise artmakta ve morfoloji epitelyalden mezankimal benzeri yapıya dönmektedir. EMT tedaviye yanıt, direnç ve metastaz süreçlerinde önemli rol oynamakta, mesane kanserinde ise hastalığın ilerlemesi (progresyonu) ile ilişkilendirilmektedir (Matsumoto ve ark., 2015). Sinyal adaptör proteini CRK (CRK)'nin büyüme faktörleri üzerinden EMT'yi uyardığı düşünülmektedir. CRK-I ve II mRNA'sı eşzamanlı PZR ile incelenmiş ve insan mesane kanseri örneklerinde ve hücre hatlarında diğer birçok kanser tipinde olduğu gibi overeksprese olduğu gözlenmiştir. Ancak CRK-I/II nükleer boyanması NMIBC örneklerinde belirginken MIBC örneklerinde değildir. Bu durum nükleer CRK'nın proapoptotik rolünü düşündürür. CRK'nın susturulması MIBC hücrelerinde

invazyon ve motiliteyi azaltmaktadır. CRK, epitelyal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), tirozin kinaz met (c-Met), sinir büyüme faktörü reseptörü (NFGR), trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) gibi reseptör tirozin kinazların sinyal ileti yollarlarında adaptör moleküller IRS-1, Gab1 ve Cb1 ile birlikte çalışarak yer alır (Feller 2001; Feller ve Lewitzky 2006; Furge ve ark., 2000). CRK-I/CRK-II insan mesane kanserlerinde ve hücre hatlarında yüksek seviyede eksprese edilir. CRK sitoplazmik, nükleer, membranöz, sitoskelet ve ekstrasellüler yerleşim gösterebilir. Salyada eksprese olduğu gösterilmiştir ancak idrardaki ekspresyonu incelenmemiştir. Mesane kanserli hastaların idrar örneklerinde ve sağlıklı bireylerde CRK ekspresyonunun incelenmesi tanısal önem taşıyabilir.

Son yıllarda mesane kanseri ile yapılan çalışmalar mikro RNA (miRNA)'ların mesane kanserinin patogeneğinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Mesane kanseri tümör dokusu ile yapılan miRNA profillemeye çalışmalarında miRNA ekspresyonunda değişiklikler olduğu ve bazı miRNA molekülerinin seviyesindeki değişikliklerin tümör evresi, nüks ve sağkalım ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Matullo ve ark., 2016).

miRNA'ların vücut sıvılarında bozulmadan kalabilmesi, iyi birer biyobelirteç olabileceklerini düşündürür (Weber ve ark., 2010). Mesane kanseri için idrar, girişimsel olmayan, acısız ve kolay elde edilebilir bir biyolojik materyaldir. İdrarda incelenebilecek bir biyomarker belirlenmesi ise girişimsel yöntemler ile tanı ve takibi gerçekleştirilen mesane kanserinde yeni bir dönemin başlamasını işaret eder. Mesane kanseri hastalarının idrar örneklerinde miR-96, 183 gibi miRNA'ların ekspresyonlarının tanısal değeri olabileceği saptanmıştır (Yamada ve ark., 2011). Çalışmaların genişletilerek iyi birer belirteç bulunabileceği düşünülmektedir fakat mesane kanserli hastaların büyük kısmında hematüri yani idrarda kan hücrelerinin bulunması durumu gözlenmektedir. Bu durum idrar miRNA profilini değiştireceğinden bu hastalarda hücre dışı, ekzozomal miRNA'ların incelenmesi daha güvenilir biyobelirteçler elde edilmesini sağlayabilir. Ayrıca kanser hücrelerinden köken alan ekzozomlar kanser hücrelerine ait molekülleri diğer hücrelere ileterek hem bir haberleşme ağı kurmakta hem de diğer hücrelerde kanserleşmeyi başlatıp tümör invazyonuna sebep olabilmektedir (Soung ve ark.,

2016). Dolayısıyla mesane kanseri hastalarında idrar ekzozomal miRNA profillerinin incelenmesi kanser hücrelerini yansıtacağından tanı ve takip açısından önemli olabilir. Literatürde mesane kanseri hastalarının idrar örneklerinde ekzozomal miRNA'ların incelendiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır ancak bu çalışmalarda ortak bir biyobelirteç saptanamamış, her biri farklı miRNA ya da miRNA grubu üzerinde durmuştur (Armstrong ve ark., 2015; Sapre ve ark., 2016, Berrondo ve ark., 2016; Long ve ark., 2015).

Yapılan araştırmalarda çeşitli yöntemlerin ekzozom izolasyonundaki etkinliği karşılaştırılmış ve Norgen Biotek Urine Exosome RNA Isolation Kit'in ekzozom izolasyonunda en iyi performansa sahip olduğu gösterilmiştir (Crossland ve ark., 2016).

Mesane kanseri idrar biyobelirteci tayinine yönelik yapılan çalışmalarda aday moleküller bir arada değerlendirilmemiş, kimi çalışma yalnızca belli miRNA'lara, kimi çalışma belli proteinlere odaklanmıştır. Çeşitli protein ve miRNA'ların bir arada incelenip, biyobelirteç özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışma literatürde yoktur. Mesane kanseri hastalarının tümör ve vücut sıvılarındaki miRNA ekspresyonlarının kıyaslandığı bir çalışmada tümörü yansıtan çeşitli ekzozomal miRNA'lar belirlenmiştir (Armstrong ve ark., 2015). Tümör dokusunda overeksprese olan miR- 4454,720, 205-5p, 200c-3p, 21-5p, 200b-3p, 29b-3p'nin ekzozomlarda da gözlemlendiği belirlenmiştir. miR-182, 183, 224'ün tümör dokusunda overeksprese olduğu (Friedman ve ark., 2009), miR-126'nın mesane kanserli hastaların idrar örneklerinde overeksprese olduğu, miR-126-152 oranının kanserli hastaların idrar örneklerinde arttığı, miR-21-5p'in tümör dokusunda overeksprese olduğu farklı çalışmalarda belirlenmiştir (Hanke ve ark., 2010).

MiR-510, 136, 19b-1, 139-5p'nin de dahil olduğu bir grup miRNA'nın sadece mesane kanserli bireylerin idrarında eksprese olduğu, sağlıklı bireylerin idrar örneklerinde görülmediği belirlenmiştir ancak çalışma grubu yalnızca 3 kişiden oluşmaktadır dolayısıyla bu veri doğrulanmalıdır (Weber ve ark., 2010).

Verilen bilgiler ışığında, bu çalışmada Marmara Üniversitesi İstanbul Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji kliniğinde mesane kanseri tanısı almış 59 birey ve 34 sağlıklı gönüllü ve daha önceden mesane kanseri tanısı alıp iyileşmiş

ancak takip edilen 12 takip hastasından 50mL idrar örneği alınarak idrar örneğinde ekzozomal miR-9b1-5p, 21-5p, 136-3p, 139-5p, 210-3p, miR-16-5p ekspresyonları eşzamanlı PZR yöntemi ile incelenmiş, BLCA-4, NMP22, APE1/Ref1, CRK, VIM protein ekspresyonları ise ELISA yöntemi ile incelenmiş ve mesane kanseri için tanısal önemi araştırılmıştır. Literatürde bu protein ve miRNA'ların, yüksek sayıda hasta grubunda, bir arada incelendiği her hangi bir çalışma bulunmamaktadır, dolayısıyla bu çalışma idrardan mesane kanseri tanısında ilgili moleküllerin bir arada incelendiği ilk çalışma ve Türk popülasyonunda mesane kanseri için ekzozomal miRNA'ların ve idrardaki proteinlerin incelendiği ilk çalışma olacaktır.

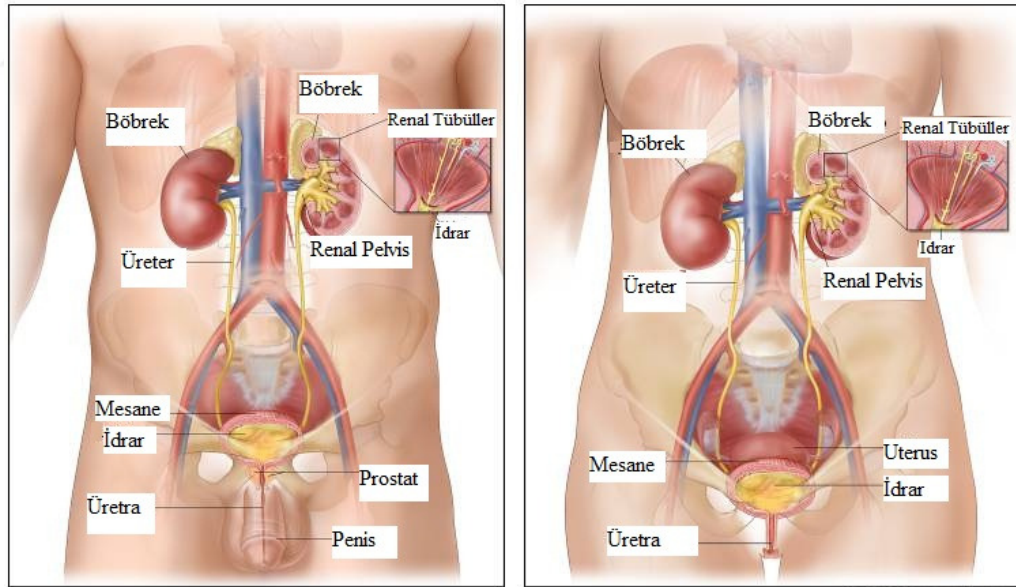


8. GENEL BİLGİLER

8.1.Mesane Kanseri

Memeli üriner sistemi, birincil görevi idrarın toplanması, taşınması, düzenli ve koordine biçimde dışarı atılması olan devamlı, içi oluklu bir organ sistemidir. Böylelikle idrar yolları, böbreklerde oluşan metabolik ürünlerin ve toksik atıkların uzaklaştırılmasını sağlar. İdrar renal tübüllerde meydana gelir, her böbreğin renal pelvisinde toplanır ve üreterler içinden mesaneye geçer. İdrar üretradan atılıncaya kadar mesanede depolanır (Hickling ve ark., 2015).

İdrar yolu, böbrekler, üreterler, mesane ve üretradan oluşur (Şekil 1). Renal pelvisten proksimal üretraya kadar tranzisyonel hücre ürotelyum ile kaplıdır, tranzisyonel karsinoma, diğer adıyla ürotelyal karsinoma bu yolda herhangi bir noktada oluşabilir (PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002).



Şekil 1: İnsanda idrar yolu.

Şekilde erkek üriner sistemi solda, kadın üriner sistemi ise sağda gösterilmiştir. İdrar renal tübüllerde oluşur, her böbreğin renal pelvisinde toplanır, böbreklerden üreterler aracılığı ile mesaneye geçer. Üretra aracılığı ile vücuttan atılıncaya dek mesanede depolanır.

8.1.1. Mesane kanseri patofizyolojisi

Batı dünyasındaki mesane karsinomlarının en yaygın histolojik alt tipi, olguların %90'ını oluşturan ürotelyal veya transizyonel hücreli karsinomdur. Kalan gruplar Skuamöz hücreli karsinom (SCC) (% 5), adenokarsinoma (%2) ve diğer nadir tümörlerdir (sarkom, küçük hücreli ve metastatik birikintiler). Şiştozomiyazın yaygın olduğu ülkelerde, SCC daha yaygındır. Ancak, bu eğilim küreselleşme sebebiyle artan çevresel etkenler nedeniyle ürotelyal karsinom lehine değişmektedir. Mesane kanserleri ürotelyal tabakadan köken alma eğilimindedir ve submukoza, lamina propria, muskularis tabakaları ve serozaya doğru doğrudan invazyon yoluyla migrasyon gözlenir. Mesane kanserleri prostat, üretra, vajina, rahim ve bağırsak gibi komşu pelvik yapılara doğrudan yayılma kabiliyetine sahiptir. Lenfatik yayılım obturator, presakral, iliyak ve para-aortik lenf nodları ile görülür. Hematojen yayılım ise tipik olarak karaciğer, akciğer, kemik ve böbreküstü bezlerine metastaz ile sonuçlanır (Down, Nair, ve Thurairaja, 2016).

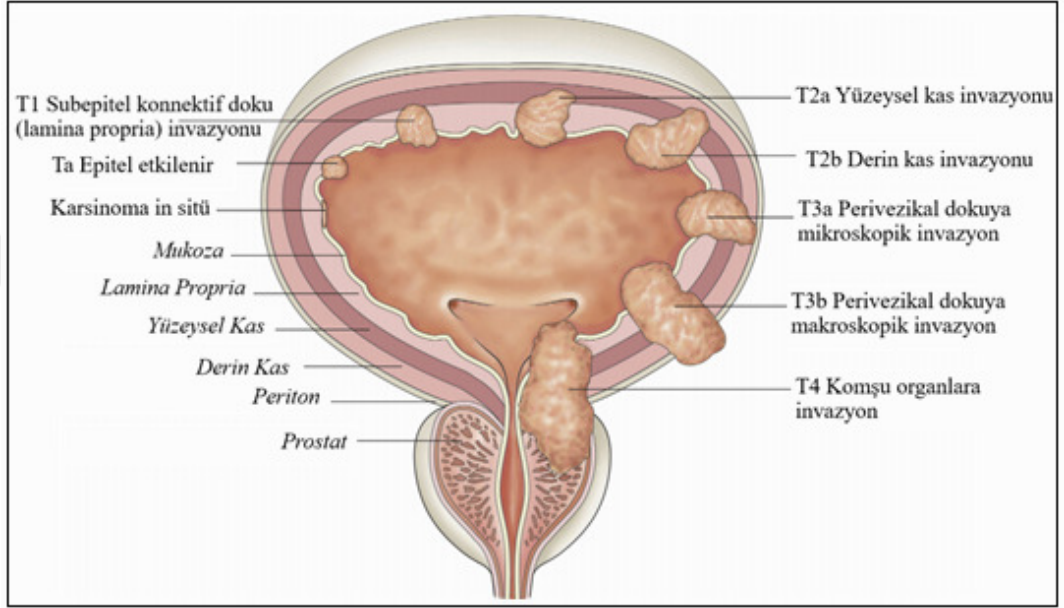
8.1.2. Mesane kanserlerinin sınıflandırılması

Mesane kanseri hastalığın evresi, derecesi, lenf nodlarının tutulumu, hastalığın nüks edip etmemesi tümör çapı ve sayısı gibi özelliklere bakılarak sınıflandırılır. Farklı sınıflandırma yöntemleri önerildiyse de klinik pratikte yönlendirici olan sınıflandırma kas invazyonu gözlenmeyen gruplarda risk gruplarının belirlenmesi, kas invazyonu gözlenen grubun ise bunlardan ayrı değerlendirilmesi şeklindedir (Treatment of Non-Metastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline 2017 American Urological Association).

8.1.2.1. Evre (Stage)

İnvazif ürotelyal karsinomda, en önemli prognostik faktör, tümör invazyonu ve metastaz derinliğine dayanan “evre”dir (Edge ve Compton, 2010). Bimanual muayene, sistoskopi ve kesitsel radyografik değerlendirmeyi içeren klinik evreleme, tam olarak yeterli değildir, diğer bir ifade ile her zaman doğru sonuç vermez, sübjektiftir (Reuter ve ark., 2006). Patolojik evreleme gold standart olmakla birlikte transüretral rezeksiyon örneklerinin kalitesi, koter ve distorsiyon artefaktları gibi kısıtlayıcı faktörler vardır (Hansel ve ark., 2013).

Transüretral rezeksiyon örneklerinin analizinde, patologlar fokal ve yüzeysel lamina propria invazyonunu tanımakta ve muscularis propria invazyonunu muscularis mucosae invazyonundan ayırt etmekte güçlük çekebilirler. Örneğin T1 evredeki bir hastanın T2 ile karıştırılması hasta bakımı açısından muazzam farklılıklar gerektirir, bu tarz karışıklıklar patolojik evrelemede büyük sorun yaratır (Miyamoto ve ark., 2010).



Şekil 2: TNM Evreleme sistemine göre mesane kanserinin sınıflandırılması ve mesane bölümleri (Down ve ark., 2016).

Tablo 1: Mesane kanseri TNM Evreleme sistemi

Primer Tümöre Göre (T)	
Tx	Primer tümör değerlendirilemez
T0	Primer tümör kanıtı yoktur
Ta	Non girişimsel papiller karsinoma
Tis	Karsinoma in Situ
T1	Lamina propria invazyonu
T2	Muscularis propria mesane duvarı invazyonu
	T2a: Kas yüzeyine invazyon
	T2b: Kas içine invazyon
T3	Perivezikal dokuya invazyon
	T3a: Mikroskopik invazyon
	T3b: Makroskopik invazyon
T4	Prostat, uterus, vajina, pelvik ve abdominal duvara invazyon
	T4a: Prostat, uterus ya da vajinaya invazyon
	T4b: Pelvis ya da abdominal duvara invazyon
Bölgesel Lenf Nodlarına Göre (N)	
NX	Lenf nodu değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tek bölgesel lenf nodu metastazı
N2	Çoklu bölgesel lenf nodu metastazı
N3	Yaygın illiak lenf nodu metastazı
Uzak Metastaza göre (M)	
Mx	Uzak metastaz değerlendirilemez
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

8.1.2.2. Derece (Grade)

NMIBC’de en önemli prognostik faktör derecedir. 1973 yılında, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), hücrel anaplaziye dayalı ürotelyal karsinom için sayısal

derecelendirme sistemi kurdu (Samaratunga, Makarov, ve Epstein, 2002). Bu derecelendirme sistemi birkaç kez modifiye edilmiştir. 2004 DSÖ derecelendirme sistemi “yüzeysel” mesane kanserlerini, bir dizi histolojik tanımlama ve klinik belirtileri olan benzersiz heterojen bir grup tümör olarak tanımak üzere güncellendi. Bu sistem ürotelyal karsinomu düşük dereceli veya yüksek dereceli olarak sınıflandırmaktadır.

Yeni sınıflandırma dört gruptan oluşur: Ürotelyal papilloma (iyi huylu bir lezyon), düşük malign potansiyelin papiller ürotelyal neoplazması (PUNLMP), düşük ve yüksek dereceli papiller kanser. Yapısal ve sitolojik bulgulara dayanan bu sistem, tümörlerin bir de-diferansiyasyon ölçeğine göre derece I-II-III şeklinde derecelendirildiği önceki sınıflandırma sisteminden daha yüksek bir prognostik değere sahiptir.

2016 DSÖ derecelendirme sistemi esas olarak 2004 sistemi ile aynıdır, ancak 2004 sürümü çoğu patolog tarafından tercih edilmektedir çünkü 1973 sistemindeki tanı kategorilerinin belirsizliğini ortadan kaldırmaktadır (Kamat ve ark., 2016).

8.1.2.3. Mesane kanserinin genetik özelliklere göre sınıflandırılması

Mesane kanserleri genetik özelliklerine göre papiller ve papiller olmayan tip, bazal ve luminal tip olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Gruplara çeşitli gen ekspresyon farklılıklarına göre ayrılmaktadır (Matulay ve Kamat, 2018).

8.1.2.3.1. Papiller ve non-papiller tip

Mesane tümörleri, papiller tümörlerde fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR)3'te aktive edici mutasyonları ve papiller olmayan tümörlerde TP53 ve RB1 majör tümör baskılayıcılarını içeren belirgin genetik değişiklikler temelinde papiller veya papiller olmayanlar olarak kategorize edilebilir. Son zamanlarda, papiller ve papiller olmayan mesane kanserlerini ayırt eden ek mutasyonlar tanımlanmıştır. Her iki alt tipte de kromatin modifiye edici enzimleri kodlayan genlerde yüksek bir mutasyon sıklığı vardır. Histon H3 lizin 4 (H3K4) metiltransferaz, KMT2D, mutasyonları papiller olmayan kanserlerde daha sık görülürken, histon H3 lizin (H3K27) demetilaz, KDM6A, mutasyonları, aktive edici telomeraz promotör mutasyonları ve inaktive edici STAG2 mutasyonları

papiller kanserlerde daha yaygındır (Allory ve ark., 2014; Balbás-Martínez ve ark., 2013; Gui ve ark., 2011; Hurst, Platt, ve Knowles, 2014; Solomon ve ark., 2013).

8.1.2.3.2. Bazal ve luminal tip

Mesane tümörleri, meme kanseri alt tiplerine benzer şekilde, gen ekspresyon paternlerine göre bazal ve luminal alt tiplere ayrılabilirler (Kamat ve ark., 2016). Bazal mesane kanserleri skuamöz ve sarkomatoid histopatolojik özelliklerden zengindir (Aine ve ark., 2015; W. Choi ve ark., 2014; Sjödaahl ve ark., 2012; Weinstein ve ark., 2014), Kök hücre karakteristiği (stemness) olan biyobelirteçleri ve epitelyal mezankimal geçiş biyobelirteçlerini eksprese eder ve çoğunlukla tanı esnasında metastatiktir. Tersine, luminal mesane kanserleri papiller özellikler sergiler. NMIBC ile özellikle FGFR3 gibi ortak mutasyonlara sahiptir (W. Choi ve ark., 2014; Damrauer ve ark., 2014; Weinstein ve ark., 2014). Preklinik modeller, luminal ve bazal mesane kanserlerinin normal ürotelyumdaki farklı öncü veya kök hücrelerden kaynaklandığını düşündürmektedir (Shin ve ark., 2014; Van Batavia ve ark., 2014).

Genetik özelliklere dayalı sınıflandırma farklı çalışmalarda birbirinden ufak farklılıklar gösterse de tedaviye yanıt açısından büyük önem taşımaktadır. Bazı alttipler cisplatin tedavisine duyarlılığı arttıran mutasyonlar taşır. Fakat luminal tip (p53 benzeri ya da infiltre grup olarak da adlandırılır) neoadjuvan cisplatine dayalı kemoterapiye dirençlidir. Bazal mesane kanserleri immun özellik taşırlar, immun sistem ile ilişkili genlerin ekspresyonları değişmiştir ve immun kontrol noktalarının blokajına duyarlıdır (J. Kim ve ark., 2015; Powles ve ark., 2014). Bazal tümörler en yüksek PD-L1 (programlı ölüm ligandı) zengin T hücre miktarına sahip olmalarına rağmen PD-L1 tedavilerine bir grup luminal tümörlerden daha kötü yanıt verirler (Rosenberg ve ark., 2016). Bazal mesane kanserleri epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve hipoksi indüklenebilir faktör (HIF) -1 zengindir. Bazal tümörler EGFR inhibitörlerine duyarlıdır ve bazal tümörü olan hastalar, HIF-1 hedefi olan VEGF'yi inhibe eden methotrexate, vinblastine, doxorubicin, cisplatin (MVAC) ve bevacizumab kombine tedavisine luminal tümörü olan hastalardan daha iyi yanıt verirler. Luminal mesane kanserleri FGFR3,

ERBB2 ve ERBB3 aktive edici mutasyonlar taşırlar, klinik uygulamada bu hastalara FGFR ve ERBB hedefleyen ilaçlar verilir (Kamat ve ark., 2016).

8.1.2.4. Ürotelyal karsinomun histolojik varyantları

Ürotelyal karsinoma çoğu mesane kanserini içerse de diğer histolojik tipler mesanede de bulunabilir, ancak çok daha düşük frekanslardadırlar. Ürotelyal karsinomlar sıklıkla farklılaşır ve sonuçta genellikle mesane ile sınırlı olmayan, çok sayıda histolojik varyant meydana gelir. Bu nedenle, mesanede histolojik bir varyantla karşılaşıldığında, diğer organlardan metastaz her zaman düşünülmeli ve ürotelyal menşeyi doğrulamak için immünohistokimyasal analiz yapılmalıdır. Skuamöz farklılaşma gösteren ürotelyal karsinom, glandüler farklılaşmaya sahip ürotelyal karsinom, yaygın varyantlardır. Skuamöz veya glandüler farklılaşma mesane ürotelyal karsinomasında yaygın olabilir fakat "skuamöz hücreli karsinom" ve "adenokarsinom" terimleri, ürotelyal karsinomun hiçbir bileşeni olmaksızın, saf skuamöz veya glandüler farklılaşma karsinomları için ayrılmıştır (Kamat ve ark., 2016).

Mikropapiller varyant, retraksiyon boşlukları ile çevrelenmiş küçük tümör yuvaları veya papilla ile karakterizedir. Mikropapiller ürotelyal karsinom sıklıkla lokal lenf nodlarına ve uzak bölgelere metastaz yapar (Compérat ve ark., 2010; Kamat ve ark., 2007). Yuvalanmış varyant, mesane duvarına sızan mülayim sitolojisi olan küçük tümör hücreleri yuvası ile karakterize edilir (Beltran ve ark., 2014; Linder ve ark., 2013). Plazmasitoid varyant, çekirdekleri hücre merkezinde olmayan tümör hücrelerinden oluşur ve plazma hücrelerini andıran bol miktarda eozinofilik sitoplazma ve peritoneal yayılım için güçlü bir yatkınlık gösterirler; neoadjuvan kemoterapiden sonra bile iyileşme oranı düşüktür (Dayyani ve ark., 2013; Ricardo-Gonzalez ve ark., 2012).

Mesane ürotelyal karsinomunun histolojik varyantları, konvansiyonel ürotelyal karsinoma göre daha ilerilerde tanı alır. Tanı konduğunda ekstrevezikal hastalık çoğunlukla metastaz yapmıştır. Günümüzde çoğu ürotelyal karsinoma varyantı için radikal sistektomi kullanılmaktadır (Black, Brown, ve Dinney, 2009; Willis ve Kamat, 2015). Ancak bazı varyantlarda cerrahi yeterli değildir ve sistemik tedavi

düşünülmelidir; örneğin, küçük hücreli karsinom neoadjuvan etoposide dayalı kemoterapi ile tedavi edilmelidir (Lynch ve ark., 2013).

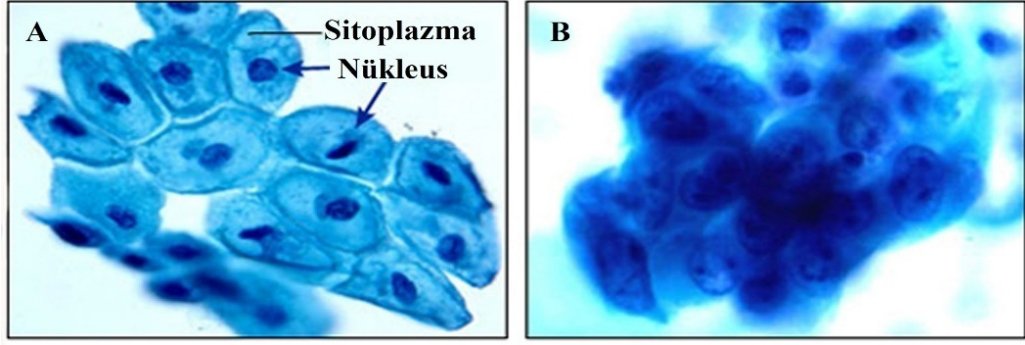
Ürotelyal karsinoma varyantlarının özellikle transüretal rezeksiyon örnekleri ile teşhis edilmesi zordur. Bazı çalışmalarda transüretal rezeksiyon örneklerinin analizi, daha sonra radikal sistektomide teyit edilen histolojik varyantların sadece %39'unu saptayabilirken, histolojik varyantların neredeyse yarısı patoloğlar tarafından tanınamamıştır (Abd El-Latif ve ark., 2013).

8.1.3. Mesane kanseri tanı ve tedavisi

Hematüri, kanlı idrar, mesane kanserinin ana belirtilerindendir. Mesane kanseri hastalarının yaklaşık %70'inde ağrısız hematüri gözlenir. Tekrarlayan enfeksiyonlar, sık idrara çıkma gibi alt üriner sistem semptomları da diğer belirtiler arasındadır. Belirtiler genellikle diğer üriner sistem hastalıkları ile çakıştığından mesane kanserinde esas tanı koydurucular, idrar sitolojisi, sistoskopi ve idrar yolu görüntülemeleridir.

8.1.3.1. İdrar sitolojisi

İdrar sitolojisi malignant ürotelyal hücrelerin tespiti için kullanılan non girişimsel bir metoddur. Hastadan alınan idrar örneği ya da mesane yıkaması örneği mikroskop altında incelenir, hücreler değerlendirilir. İleri derecede kanserler ve karsinoma in sitü tanısında görece yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip olmasına rağmen erken evrede duyarlılığı düşüktür. Farlı çalışmalarda elde edilen duyarlılıklar %30 – 83 arasında, özgüllükler ise %43 – 83 arasında değişmektedir (Gopalakrishna ve ark, 2016; Pannek, Rademacher ve Wöllner, 2017; Planz ve ark., 2005; Yafi ve ark., 2015). Sitolojide kanser açısından pozitif bir bulgu idrar yolunda malignant lezyonu kesinleştirir ancak negatif sitoloji sonucu tümör varlığını her zaman reddedemez (Gupta, VandenBussche, ve Bivalacqua, 2018). İdrar sitolojisinde sağlıklı ürotelyal hücrelerin şekilleri benzerdir, sitoplazma nükleus oranı korunmuştur. Malign hücreler genişler, sitoplazma nükleus oranı bozulur, hücre şekillerinde farklılıklar gözlenir.



Şekil 3: Normal ürotelyal hücreler (A) ve ileri derece mesane kanseri hücreleri (B).

Normal ürotelyal hücreler birbirlerine benzeyen ortak bir yapı gösterirler. Tümünün küçük bir nükleusu ve belirgin sitoplazması vardır. Mesane kanseri hücreleri ise genişlemiştir, daha yoğun ve büyük nükleusları vardır. (http://www.pathology.jhu.edu/bladdercancer/disease_info.cfm, erişim tarihi: 07.08.2018)

8.1.3.2. İdrar yolu görüntülemeleri

İdrar yolunun radyolojik görüntülenmesi ile idrar yolundaki anormal yapılar incelenebilir. Görüntüleme teknikleri arasında intravenöz pyelogram, transüretal ultrasound, bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) sayılabilir. MRI, diğer yöntemlere göre daha detaylı sonuçlar vermektedir. Mesane yakınındaki lenf nodlarının da incelenmesine olanak verdiğinden metastaz değerlendirmesi sağlar. Görüntüleme teknikleri tanı açısından önemli olduğu gibi kanserin evresini belirlemek için de elzemdir. Uygun tedavi yaklaşımının belirlenebilmesi için tedaviden önce doğru evreleme ve dereceleme yapılmalıdır. Güncel yaklaşımda evreleme özgüllüğü için altın standart mesane tümörünün transüretal olarak çıkarılması (TURBT) sonrasında BT ile görüntülemedir. Fakat BT tümör invazyonunun belirlenmesinde yeterince duyarlı değildir. MRI yumuşak doku farklılaşmasını daha iyi ayırtdebildiğinden MIBC, NMIBC ayrımında daha duyarlıdır (Down ve ark., 2016).

8.1.3.3. Tedavi yaklaşımları

Kas invazyonu gözlenmeyen mesane kanserlerinde güncel tedavi yaklaşımı mesanenin tamamen çıkarılmasıdır. İyi prognoz için mesanenin tamamen çıkarıldığından emin olunması gerekir. Çıkarılmış dokuda muscularis propria varlığı mesanenin tamamen çıkarıldığına işaret eder, yokluğu ise hastalık kalıntısı

riskini düşündürür. Hastalıklı doku kalıntısı erken nüks ile karakterizedir (Down ve ark., 2016).

NMIBC, 3 prognostik gruba ayrılmıştır (Tablo 2). Bu risk grupları Avrupa ve Amerika Üroloji dernek kılavuzlarında da invazif olmayan mesane kanserlerinin gruplanmasında önerilmektedir. Hastalara uygulanan tedaviler ve takip düzeni bu gruplara göre belirlenmektedir. Hasta örneklerini temin ettiğimiz Marmara Üniversitesi İstanbul Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniğinde de invazif olmayan mesane kanserleri hastalık derecesinin, nüks özelliklerinin ve tümör çapının da göz önünde bulundurulduğu, üroloji dernek klavuzlarında da yer alan risk belirleme ölçeğine göre 3 gruba ayrılmaktadır.

Düşük riskli tümörlerde, tümör çıkarıldıktan 3 ay sonra sistoskopi yapılır, hastalık bulunmazsa 9 ay sonra, 1 yıl sonra ve 5 yıl sonra kontrol sistoskopilerine devam edilir. Orta riskli tümörlerde 3 ayda bir sistoskopi ve sitoloji değerlendirmesi yapılır. Kanser bulgusu yoksa 5 yıl boyunca 3-6 ay aralıklarla sistoskopiye devam edilir. Bu tümörlerin ilk 5 yılda nüks (%62) ve progresyon ihtimali (%17) yüksektir bu sebeple bu hasta grubuna adjuvan intravezikal kemoterapi önerilir. Yüksek risk grubunda 5 yıllık nüks olasılığı %78, MIBC'ne ilerleme olasılığı %45'tir. Bu hastalar özel olarak değerlendirilir. İmmunoterapi ve radikal sistektomi önerilir (Down ve ark., 2016).

MIBC tedavisi evre ve pelvik lenf nodu tutulumuna göre şekillenmektedir. Hastalığın evrelenmesi, renal fonksiyonların anazili hassasiyetle yapılmalı ve tedavi buna uygun şekilde planlanmalıdır. Temel renal fonksiyonlara sahip ve genel sağlık durumu iyi olan hastalar neoadjuvan kemoterapi için uygundur. Ameliyat öncesi uygulanacak neoadjuvan kemoterapi bu hastaların sağkalım süresini uzatmaktadır. 2 yıllık sistoskopi takibindeki hastaların yaklaşık yarısında metastaz gözlenmektedir. Bu sebeple, neoadjuvan kemoterapi almayan hastalara adjuvan terapi önerilmektedir (Down ve ark., 2016; Kamat ve ark., 2016).

Tablo 2: Klinik açıdan düşük, orta ve yüksek riskli tümörler ve özellikleri.

Risk Grubu	Özellikleri
Düşük riskli tümörler	Düşük dereceli (LG) , primer, tek tümör Ta≤3 cm Düşük malinite potansiyeli olan papiler ürotelyal neoplazm (PUNLMP) CIS yok
Orta riskli tümörler	Düşük ve yüksek risk grubu hastalar arasında kalan tüm vakalar 1 yıl içinde nüks eden LG Ta Tek tümör LG, Ta>3cm LG Ta, multifokal Yüksek derece (HG) Ta≤3cm LG T1
Yüksek riskli tümörler	HG T1 tümör Tüm nüks eden HG Ta HG Ta, >3cm veya multifokal CIS Aynı özelliklere sahip G1G2 tümörler BCG başarısız olan HG hasta Herhangi bir histolojik tip Lenfovasküler invazyon HG prostatik üretral mevcudiyet

8.1.4. Mesane kanseri sebepleri ve risk faktörleri

Çoğu kanser tipinde olduğu gibi yaş mesane kanseri için de en önemli risk faktörlerinden biridir. Tütün ürünleri ve sigara (Burger ve ark., 2013), ailede mesane kanseri öyküsü (Mueller, Caporaso, ve Greene, 2008), genetik mutasyonlar, cinsiyet, etnik köken ve kimyasala maruziyet diğer risk faktörleridir (Ferrís ve ark., 2013). Mutasyonların yaygın görüldüğü genler HRAS, Rb1, PTEN/MMAC1, NAT2, GSTM1 genleridir. Endüstriyel kimyasallar, metal ve petrol ürünleri arasında ise alüminyum üretim süreçlerinde ortaya çıkan polisiklik aromatik hidrokarbonlar, floridler, aminobifenil ve ürünleri, aromatik aminler ve türevleri gibi maddeler yer almaktadır (Ferrís ve ark., 2013).

8.1.4.1. Yapısal risk faktörleri

Mesane kanseri riski genel olarak yaşla birlikte artmaktadır. Olguların büyük çoğunluğu 65 yaş üzeri olmakla birlikte nadiren 50 yaş altında ve çok çok nadir olarak da 10 yaşından küçüklerde gözlenir (Burger ve ark., 2013).

Kadınlarda görülme sıklığı erkeklerden 3-5 kat daha azdır. Asya, Hint ve Eskimo popülasyonlarında insidansı daha düşüktür. Beyazlarda, Afrikalı Amerikalılara göre daha sık rastlanır ancak bu fark lokalize tümörler için geçerlidir, MIBC insidansı iki popülasyonda benzerdir. Etnik köken ve cinsiyete bağlı insidans farkının sebepleri henüz aydınlatılamamıştır.

Güney Avrupa ülkeleri dünyadaki en yüksek mesane kanseri insidansına sahiptir, her yıl yüz bin kişide 30-40 yeni vaka gözlenir, bunu kuzey Amerika, batı Avrupa, kuzey Avrupa, İsrail ve kuzey Afrika takip eder. En düşük insidans Doğu Afrika, Melanezya ve orta Afrika ülkelerinde gözlenmektedir (Antoni ve ark., 2017).

8.1.4.2. Genetik faktörler

Mesane kanseri doğal ve çevresel koşulların birleşimi ile meydana gelen kompleks bir hastalıktır. Her bileşenin katkısı tam olarak bilinmemesine rağmen çeşitli mutasyonların ve mutajelere, karsinojenlere maruziyetin birikimi sonucu normal ürotelyal hücrelerin malign karakter kazanması ile gelişir. Hastalığın şiddeti, tedaviye yanıt ve sağkalım özellikleri bu risk faktörlerinin bileşimi ile şekillenmektedir. Sık gözlenen genetik risk faktörleri yüksek penetrans gösteren genlerdeki mutasyonlar, germline mutasyonlar, yatkınlık genlerindeki mutasyonlar ve karsinojen metabolizmasında yer alan genlerdeki polimorfizmler olarak gruplandırılabilir.

8.1.4.2.1. Yüksek penetrans gösteren genler ve ailesel kanser sendromları

Birinci derece akrabalarında mesane kanseri öyküsü olan bireylerde mesane kanseri olma riski (rölatif risk-RR) genel popülasyona göre 1,2 ile 4 kat arasında artmaktadır (Hemminki ve ark., 2011). Dizigotik ikizlerde RR:1,7 iken monozigotik ikizlerde 6,6'dır (Hemminki ve ark., 2011). Ancak ailesel mesane

kanserleri nadir gözükür ve tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %1'ini oluştururlar. Ailesel kanser sendromları 50 yaşın altında tanı, yüksek penetrans gösteren genlerin taşınması ile karakterize olur (Fletcher ve ark., 2004; Gripp, 2005; Hemminki ve ark., 2011; Kiemeny, 2008; Mueller ve ark., 2008).

8.1.4.2.2. Herediter nonpolipozis kolorektal kanser sendromu

MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 yanlış eşleşme onarım (mismatch repair) genlerindeki germline mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Üretelyal kanserleri genelde renal pelvis ve üretrada gelişir, nadiren vezikal bölgelerde görülür. Lynch sendromu ikinci kromozomun kısa kolunda bulunan MSH2 yanlış eşleşme onarım geninin germline mutasyonu sonucu ortaya çıkar, Lynch sendromlu erkeklerde 70 yaşından önce mesane kanseri geliştirme riski kadınlara göre 4,2 kat artmıştır. Birinci derece akrabaları taşıyıcı olan bireylerde ise mesane kanseri riski 7 kat artmıştır (Hemminki ve ark., 2011; Kiemeny, 2008).

8. 1.4.2.3. Herediter retinoblastoma

13'üncü kromozomda bulunan retinoblastoma genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Erken çocukluk döneminde bilateral ve multifokal retinoblastoma ile karakterizedir. Sekonder tümörler sıklıkla osteosarkomalar ve yumuşak doku sarkomaları olarak izlenir. Bu sendromda mesane kanseri gelişimi herediter nonpolipozis kolorektal kanser sendromundan daha sıktır. Sekonder tümörlerin gelişimi ilk etapta radyoterapi ve kemoterapiye bağlıdır ancak enükleasyon yapılmış hastalarda mesane kanseri sebebiyle ölüm oranı artmıştır (Hemminki ve ark., 2011; Kiemeny, 2008).

8.1.4.2.4. Costello sendromu

HRAS genindeki germline mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. HRAS geni 11'inci kromozomun kısa kolunda bulunur ve küçük GTP bağlayan protein süperailisini kodlar. Costello sendromu çoklu konjenital anomalilerle tanımlanan, nadir gözlenen otozomal dominant bir hastalıktır. Costello sendromu hastalarının rhabdomyosarkoma, nöroblastoma ve mesane kanseri yatkınlıkları normalden yüksektir (Gripp, 2005).

8.1.4.2.5. Apert sendromu

FGFR2 genindeki germline mutasyonlar sonucu oluşan, çoklu konjenital anomalilerle karakterize, 8 kraniyosinostozis sendromundan biridir. Mesane kanserine yatkınlığı artırır (Lindor ve ark., 2008).

8.1.4.2.6. CDC91L1 genindeki germline mutasyonlar

20'inci kromozomun uzun kolunda yer alan CDC91L1 geni, hücre düzenlenmesi ve senkronizasyonun büyük önem taşıyan fosfatidilinositol glikan U kodlar ve ekspresyonunu düzenler. Mutasyon taşıyan bireylerde mesane kanseri riski normalden fazladır (Hemminki ve ark., 2011; Lindor ve ark., 2008).

8.1.4.3. Karsinojen metabolizmasında görevli genlerdeki polimorfizmler

Karsinojen kimyasalların metabolize edilmesi, nötralize edilerek vücuttan uzaklaştırılması hayati önem taşımaktadır. Bu süreçlerde yer alan proteinlerde çeşitli mutasyon ya da polimorfizmler meydana gelebilir. Bu değişiklikler karsinojenin metabolize edilmesini yavaşlatabilir, geciktirebilir, tamamen engelleyebilir. Böylelikle karsinojen birikimi ile mesane kanserine zemin hazırlanabilir. Bu bölümde karsinojen metabolizmasında görevli çeşitli genlere ilişkin polimorfizmlere değinilmiştir.

8.1.4.3.1. Asetilasyon genleri

N-asetilasyon karsinojen kimyasalların nötralize edilmesi ve detoksifikasyonundaki en önemli yolaktır. Asetile metabolitler, reaktif formlarda N-okside edilmeden önce idrarla hızla atılırlar. İnsanlarda N-asetil transferaz genleri (NAT) polimorfiktir, mutant NAT2 genini homozigot olarak taşıyan bireylerin karsinojenleri nötralize etme ve uzaklaştırma yeteneği azalmıştır. NAT2, Kafkasyalıların %50'sinde, Afrikalı Amerikanların %30'unda ve Asyalıların %15'inde mutanttır. NAT2 mutasyon taşıyıcılarının mesane kanseri riski %40 artmıştır. Sigaradaki 4-aminobifeniller ve 2-naftalamin NAT yoluyla ile detoksifiye edilir dolayısıyla NAT mutant sigara içicilerinde de mesane kanseri riski artmıştır (Ferrís ve ark., 2013).

8.1.4.3.2. Glutasyon S-transferaz genleri

1'inci kromozomun kısa K1sa kolunda bulunan GSTM-1 geni Glutasyon S-transferaz-M1 enzimini kodlar. Bu enzim polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve reaktif oksijen türevleri dahil olmak üzere glutasyon ile konjugasyon yoluyla karsinojenlerin detoksifikasyonunda rol oynar. Kafkasyalı polölasyonun %50'sinde GSTM-1 geninin homozigot delesyonu gözlenir (GSTM1 null genotip). Bu polimorfizm enzim aktivitesinin kaybına sebep olur. GSTM1 null genotipi artmış mesane kanseri insidansı ile ilişkilendirilmiştir (Volanis ve ark., 2010).

8.1.4.3.3. Sitokrom P-450 grubu genler

Kromozom 15'in uzun kolunda bulunan Sitokrom P-450-1A2 geni (CYP1A2) aromatik aminlerin metabolik yolları, N-oksidasyon ve N-hidroksilasyon yollarında önemli rol oynar. Aromatik aminlere maruziyet ile tetiklenen mesane kanseri, CYP1A2 seviyesine bağlı olarak değişken yatkınlık gösterir. Bununla birlikte, CYP1A2 popölasyon polimorfizminin mesane kanseri riski üzerindeki etkisi belirsizdir. Benzer şekilde, diğer CYP polimorfizmleri (CYP1A1, CYP1B1, CYP2C19, CYP2D6 ve CYP2E1) teorik olarak aromatik aminlerin enzimatik aktivasyonunda yer almasına rağmen mesane kanseri riski ile ilgili tutarsız sonuçlar göstermiştir (Ferris ve ark., 2013; Moore ve ark., 2011).

8.1.4.3.4. Siklooksijenaz 2 geni

Siklooksijenaz-2 geni (COX2) polimorfizmleri kronik enflamasyonla ilişkili mesane kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Gangwar, Mandhani, ve Mittal, 2011). COX2, akut ve kronik inflamatuvar yanıtları düzenleyen prostaglandinlerin sentezinde yer alır.

8.1.4.4. DNA tamir genleri

Çevresel polisiklik aromatik hidrokarbon ve aromatik aminlerin neden olduğu hasarı etkili bir şekilde onaran ana onarım yolu, nükleotid çıkarma onarımıdır. Epidemiyolojik çalışmalar DNA onarım polimorfizmlerinin mesane kanseri riskini etkilediğini göstermektedir. Alkilleyici ve oksidan ajanlara maruziyetin neden olduğu bazların çıkarma onarımındaki, genetik polimorfizmlerin mesane kanseri

riskini deęiřtirebileceęi dūřūnūlmektedir. Genetik stabilitenin devamlılıęının saęlanmasındaki bir bařka mekanizma da çift sarmal kırıklarının onarımıdır. DNA tamir mekanizmaları ile mesane kanserinin iliřkilendirildięi çeřitli çalıřmalar varsa da bunların daha geniř popūlasyonlarda doęrulanması gereklidir (Mueller ve ark., 2008).

8.1.4.5. Diğer genetik yatkınlık faktōrleri

Mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollerin lenfosit kūltürleri farklı polisiklik aromatik hidrokarbon ve aromatik amin karsinojenlere maruz bırakıldığında mesane kanseri hastalarının lenfosit kūltürlerinde DNA hasarının sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde telomer uzunlukları da incelenmiş, kısa telomerlere sahip olanların mesane kanseri riskinin arttığı belirlenmiştir (Ferrís ve ark., 2013).

8.1.4.6. Çevresel ve mesleki risk faktōrleri

Bazı endūstrilerde kimyasala maruziyet hayli fazladır, bu nedenle mesleki kořullar sebebiyle geliřen mesane kanseri vakaları tūm vakaların %20-25'ine kadar artmıřtır ancak son yıllarda yeni iř yasaları sayesinde őzellikle geliřmiř ūlkelerde bu oran %5-10'lara kadar dūřmüřtür (Ferrís ve ark., 2013). Mesleki maruziyet sebebiyle mesane kanseri riskinin arttıęı bazı meslek grupları boya sanayii, kimya, tekstil, petrokimyasal endūstri, alüminyum sanayii, deri sanayii, kuafōrler gibi mesleklerdir.

Sigara kullanımı çevresel mesane kanseri risk faktōrlerinin bařında gelir. Mesane tūmōrlerinin yaklařık yarısı sigara içenlerde görūlür ve sigara içenlerin mesane kanseri geliřtirme riski içmeyenlere göre 2 ila 6 kat artmıřtır (Down ve ark., 2016). Sigara dumanı beta naftilamin ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi ūrotelyal karsinojenler içerir, bu bileřikler bōbrekler yoluyla atılır ve bu nedenle tūm ūriner sistem üzerinde karsinojenik etki gōsterir. İdrarın depolanması sebebiyle alt ūriner sisteminin bu kimyasallara maruziyet sūresi ūst ūriner sistemden daha fazladır bu sebeple alt ūriner sistemde hastalık insidansı artmıřtır. Mesane kanseri geliřimi genellikle sigaraya bařladıktan 20-30 yıl sonra gözlenir ve sigara bırakıldıktan sonra 1-4 yıl içerisinde mesane kanseri riski yaklařık %40 azalır

(Gandini ve ark., 2008). Yaklaşık 20 yıl sonra da bazal seviyeye iner. Çok sayıda çevresel risk faktörü bulunmakla birlikte bunların büyük kısmı da henüz tanımlanmamış veya yeni tanımlanmaktadır.

Bazı tedaviler hastalarda mesane kanseri gelişmesine aracılık edebilir. Pelvik malinitelerde kullanılan ışın radyoterapisi hastanın mesane kanseri riskini arttırabilmektedir. Hematolojik malinitelerin tedavisinde kullanılan sitostatik ajan, siklofosamid mesanenin skuamoz hücre karsinomu ile ilişkilendirilmiştir. Kronik enflamasyon da mesane kanseri için, özellikle de skuamoz hücre karsinomu için bir risk faktörüdür. Bu durum kronik şistozomiyaz, hematom enfeksiyonu, kronik sistit, mesane taşı ve kalıcı idrar sondası sebebiyle gelişebilir (Down ve ark., 2016).

Çevresel ve mesleki faktörler değerlendirilirken genetik özellikler atlanmamalıdır. Tüm çevresel faktörler genetik katkı ile birleşerek sonuç doğurur. Aynı kimyasallara maruz kalmış ya da aynı zaman zarfında, aynı miktarda sigara içmiş bireylerde mesane kanseri gözlenme oranı birbirinden farklı olabilir. Bu durum karsinogenleri metabolize eden genler, DNA tamir genleri, yüksek penetrans gösteren genler ve ailesel kanser sendromları ile ilişkili genler ve diğer genetik faktörlerdeki farklılıklar sonucu ortaya çıkar.

8.2.Mesane Kanseri İdrar Belirteçleri

Mesane kanseri, hastaların girişimsel yöntemler ile takip edildiği, pahalı kanserler arasında yer almaktadır ve yüksek nüks oranı sebebiyle, genellikle hayat boyu takip edilmesi gerekmektedir. Hastaların büyük kısmı tanı esnasında NMIBC'dir ve malesef hematüri varlığı gibi belirteçler tanı koymada yetersiz kalmaktadır. Özellikle NMIBC hastanın sistoskopi ile tanı ve takibi esastır. Hastanın yaşam kalitesini bozan, fiziksel ve ekonomik yük oluşturan bu girişimsel tanı ve takip yöntemleri yerine girişimsel olmayan belirteçler aranmaktadır.

Biyobelirteçler basitçe, hastalık tanı ve takibinde kullanılan, farklı klinik tabloların birbirinden ayrılmasını sağlayacak moleküller olarak tanımlanabilir. Biyobelirteçlerin performansı duyarlılık, özgüllük, pozitif öngörü değeri ve negatif ön görü değerine bağlıdır.

Mesane kanseri tanı ve takibinde idrar oldukça kıymetli bir biyolojik materyaldir. Hem girişimsel olmayan yöntemler ile elde edilir, hem de mesane içinde biriktiğinden mesane hücrelerine ait özellikleri büyük oranda yansıtabilir. İdrar biyobelirteçleri tanısal anlamda yeni bir çağ açacağı gibi yüksek nüks oranına sahip mesane kanseri hastalarında tümör henüz gözle görülebilir seviyeye gelmeden idrar belirteçleri ile saptanması; fiziksel, ekonomik ve psikolojik açıdan büyük avantaj sağlayacaktır.

İdrar biyobelirteci çalışmalarında 3 ana amaç vardır;

1. İnvazif test sıklığını azaltarak hastalığı erken evrede tespit edebilmek,
2. Rekürren hastalık varlığını dışlamak
3. NMIBC'nin MIBC'ye progresyonunu saptayabilmek ve terapiye yanıtı ön görebilmek.

Bu 3 amacı karşılamak üzere bazı biyomarkerlar tespit edilmiş hatta bazıları Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Ancak FDA tarafından onaylanan biyomarkerlar da dahil olmak üzere biyobelirteçler yetersiz kalmaktadır. Kimisinin pozitif öngörü oranı düşük, kimisinin sahte pozitif veya sahte negatif değerleri düşük, kimisi yeterince özgün ya da duyarlı değildir (Soria ve ark., 2018; Tan ve ark., 2018).

178 hastanın dahil edildiği bir çalışmada tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri karşılaştırılmış yeni tanı alan hastalarda idrar sitolojisinin en düşük duyarlılığa (%28) sahip olduğu, UroVysion FISH yönteminin %80 ve NMP22 BladderCheck testinin %88 duyarlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Nüks hastalarında da oranlar benzerdir, idrar sitolojisi, NMP22 BladderCheck ve UroVysion FISH için elde edilen duyarlılıklar %33, 57 ve 85'tir. Ortalama özgüllük ise sırasıyla %95, 67 ve 48'dir (Kehinde ve ark., 2011).

BTA testi FDA tarafından onaylanmış kantitatif ve kalitatif tipleri bulunan, insan komplement faktör H ilişkili proteinin saptanmasına dayanan bir testtir. Mesane kanseri tanısındaki duyarlılığı %57-83 arasında, özgüllüğü ise %60-92 arasında değişmektedir. İdrar yolu enfeksiyonu, taş, benign prostatik hipertrofi, katater kullanımı, hematüri gibi durumlardan fazlasıyla etkilenmektedir, bu sebeple rutinde karar verici olarak kullanımı önerilmez (Faena ve ark. 2018).

ImmunoCyt/uCyt+ testi sitoloji ile birlikte kullanılmaktadır. Yüksek moleküler ağırlıklı karsinoembriyonik antijen ve mesane tümörü ilişkili musinlerin floresan işaretli antikorlarca yakalanmasına dayanır (H.-X. Li ve ark., 2010). Çok sayıda hücrenin sitopatolog tarafından değerlendirilip skorlanmasını gerektirir, dolayısıyla değerlendirmeyi yapan kişinin tecrübesi oldukça önemlidir. Genel duyarlılığı %50-100 ve özgüllüğü %69-79 arasında değişmektedir. Tanısal modele dahil edilmesi halinde mesane kanserini %91 doğrulukla öngörebildiği belirlenmiştir (Cha ve ark., 2012). 7422 uCyt/ImmunoCyt testi, 7075 sitoloji sonucu incelenmiş, sitoloji duyarlılığı %34,5 ve uCyt/ImmunoCyt duyarlılığı %68,1 olarak tespit edilmiştir, iki test birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık %72,8 seviyesine ulaşmıştır. Özgüllük ise sitoloji için %97,9 ve uCyt/ImmunoCyt için %72,3 olarak tespit edilmiştir, iki değerlendirme bir arada yapıldığında özgüllük %71,9 değerine ulaşmaktadır. Farklı derecelerdeki hastalar da benzer şekilde incelendiğinde uCyt/ImmunoCyt testinin sitoloji ile birlikte kullanılmasının gereksiz sistoskopinin önüne geçebileceği sonucuna varılmıştır (Comploj ve ark., 2013).

8.2.1. Mesane kanseri biyobelirteci olarak üriner miRNA'lar

miRNA'lar, hedef mRNA bozunmasına veya translasyonel baskılanmaya aracılık eden 20-24 nükleotit uzunluğunda protein kodlayıcı olmayan RNA gen ürünleridir. miRNA'lar onkogenler veya tümör baskılayıcıları olarak hizmet edebilir. Hedefleri ile baz eşleşmesi yaparak gen ekspresyonunu düzenlediklerinden patolojik ve fizyolojik yollarda yer alırlar (Homami ve Ghazi, 2016). Kan plazması, idrar, dışkı veya biyopsi örneği gibi çok çeşitli biyolojik örneklerden elde edilebilirler ve genellikle çeşitli depolama koşullarına karşı dayanıklıdırlar. İdrarda; hücre dışı, serbest ve ekzozomal formda bulunabilirler. miRNA'lardaki değişiklikler, girişimsel olmayan şekilde saptanabilir ve yüksek derecede duyarlı ve standartlaştırılmış teknikler kullanılarak vücut sıvılarında ölçülebilir. Bu nedenle, miRNA'lar tanı, prognoz ve klinik takip açısından iyi birer moleküler belirteç adayıdır. İlk kez 2010 yılında Hanke ve arkadaşları idrardaki miRNA'ların mesane kanseri tanısında kullanılabileceğini belirtmiştir (Hanke ve ark., 2010). Mesane idrar ile fizyolojik ilişki içerisinden, üriner

miRNA'lar mesane kanseri belirteci potansiyeli açısından yoğun olarak incelenmektedir (Wieczorek ve Reszka, 2018).

Mesane kanseri hastalarının idrarında deregule olmuş, tanısal ya da prognostik değeri olabilecek çeşitli miRNA'lar tespit edilmiştir, literatürde sıklıkla bahsi geçen miRNA'lar Tablo 3'de listelenmiştir.

Mesane kanseri ile ilişkilendirilmiş çok sayıda miRNA bulunmasına rağmen çoğu çalışma bağımsız gruplar tarafından tekrarlandığında farklı sonuçlar elde edilmiş ve aday biyobelirteç üzerinde tam bir fikir birliği oluşmamıştır (Andreu ve ark., 2017; Juracek ve ark., 2018; W. Liu ve ark., 2015; Pospisilova ve ark., 2016; Sapre ve ark., 2016; Sasaki ve ark., 2016; J. Wang ve ark., 2015; Yun ve ark., 2012).

Sasaki ve arkadaşlarının mesane kanseri hücre hatlarında miRNA ekspresyonlarını incelediği çalışmada miR-301b, -563 ve -146a-5p'nin normal hücrelere göre 2 kattan fazla eksprese edildiği saptanmıştır. Aynı miRNA'lar idrar örneklerinde incelenmiş ve miR-146a-5p ekspresyonunun mesane kanseri hastalarının idrar örneklerinde sağlıklı kontrollere nazaran anlamlı düzeyde arttığı ($p=0.0014$) ve transüretal rezeksiyon sonrasında normal seviyeye düştüğü saptanmıştır (Sasaki ve ark., 2016). Rezeksiyon sonrası miRNA seviyesinin normal değerlere gerilemesi, idrarda miR-146a-5p artışının kanser hücrelerinden kaynaklandığını dolayısıyla, üriner miR-146a-5p miktarının mesane kanseri için iyi bir tanı ve takip belirteci olabileceğini düşündürür.

Tablo 3: Mesane kanserinde deregule olan üriner miRNA'lar.

miRNA	miRNA
Let-7a-5p (Armstrong ve ark., 2015)	miR-193a-3p (Urquidi ve ark., 2016)
let-7b (Armstrong ve ark., 2015; De Long ve ark., 2015; Urquidi ve ark., 2016)	miR-200a (Urquidi ve ark., 2016; G. Wang ve ark., 2012)
miR-7-5p (Du ve ark., 2017)	miR-200a-3p (Du ve ark., 2017)
miR-15a (De Long ve ark., 2015)	miR-200b (Armstrong ve ark., 2015; G. Wang ve ark., 2012)
miR-15b (Miah ve ark., 2012)	miR-200c-3p (Armstrong ve ark., 2015; G. Wang ve ark., 2012)
miR-16 (Sapre ve ark., 2016; Weber ve ark., 2010)	miR-200c (De Long ve ark., 2015; Sapre ve ark., 2016; Urquidi ve ark., 2016)
miR-16-5p (Armstrong ve ark., 2015)	miR-204 (Mengual ve ark., 2013)
miR-18a (Mengual ve ark., 2013)	miR-205 (Sapre ve ark., 2016)
miR-19 (Weber ve ark., 2010)	miR-205-5p (Armstrong ve ark., 2015)
miR-21 (De Long ve ark., 2015; Sapre ve ark., 2016; Weber ve ark., 2010)	miR-210 (Eissa, Matboli, Essawy, ve Kotb, 2015; Weber ve ark., 2010)
miR-21-5p (Armstrong ve ark., 2015)	miR-214 (S. M. Kim ve ark., 2013; J. Wang ve ark., 2015)
miR-22-3p (Armstrong ve ark., 2015; Du ve ark., 2017)	miR-221 (Sapre ve ark., 2016)
miR-23a-3p (Armstrong ve ark., 2015)	miR-222 (Puerta-Gil ve ark., 2012; Urquidi ve ark., 2016)
miR-25 (Mengual ve ark., 2013)	miR-223-3p (Armstrong ve ark., 2015)
miR-26a (De Long ve ark., 2015)	miR-223 (Urquidi ve ark., 2016)
miR-29a-3p (Du ve ark., 2017)	miR-224 (Urquidi ve ark., 2016)
miR-29b-3p (Armstrong ve ark., 2015)	miR-320e (Armstrong ve ark., 2015)
miR-30a (Urquidi ve ark., 2016)	miR-338-3p (Armstrong ve ark., 2015)
miR-30a-5p (Armstrong ve ark., 2015)	miR-375 (Du ve ark., 2017)
miR-34a (Sapre ve ark., 2016)	miR-378e (Armstrong ve ark., 2015)
miR-93 (De Long ve ark., 2015; Urquidi ve ark., 2016)	miR-399-3p (Urquidi ve ark., 2016)
miR-96 (Eissa, Habib, Ali, ve Kotb, 2015; Urquidi ve ark., 2016; Yamada ve ark., 2011)	miR-423-5p (Du ve ark., 2017)
miR-99a (Zhang ve ark., 2014)	miR-429 (Urquidi ve ark., 2016)
miR-99b (Urquidi ve ark., 2016)	miR-451a (Armstrong ve ark., 2015)
miR-106b (Urquidi ve ark., 2016; X. Zhou ve ark., 2014)	miR-491-5p (Urquidi ve ark., 2016)
miR-125b (Snowdon ve ark., 2013)	miR-520e (Tölle ve ark., 2013)

Tablo 3: Mesane kanserinde deregule olan ürener miRNA'lar. (devam)

miRNA	miRNA
miR-125b (Armstrong ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2014)	miR-429 (G. Wang ve ark., 2012)
miR-126 (Hanke ve ark., 2010; Snowdon ve ark., 2013)	miR-548ai (Armstrong ve ark., 2015)
miR-126-5p (Du ve ark., 2017)	miR-548aa (Armstrong ve ark., 2015)
miR-135b (Miah ve ark., 2012)	miR-548n (Armstrong ve ark., 2015)
miR-139-5p (Weber ve ark., 2010)	miR-452 (Puerta-Gil ve ark., 2012)
miR-140-5p (Mengual ve ark., 2013; Urquidi ve ark., 2016)	miR-618 (Tölle ve ark., 2013)
miR-140-3p (Urquidi ve ark., 2016)	miR-652 (Urquidi ve ark., 2016)
miR-141 (Urquidi ve ark., 2016; G. Wang ve ark., 2012)	miR-720 (Armstrong ve ark., 2015)
miR-142-3p (Mengual ve ark., 2013)	miR-766 (Urquidi ve ark., 2016)
miR-142-5p (Urquidi ve ark., 2016)	miR-940 (De Long ve ark., 2015)
miR-143 (Puerta-Gil ve ark., 2012; Urquidi ve ark., 2016)	miR-1224-3p (Miah ve ark., 2012)
miR-145 (Yun ve ark., 2012)	miR-1225b-5p (Tölle ve ark., 2013)
miR-146b-5p (Urquidi ve ark., 2016)	miR-1290 (Armstrong ve ark., 2015)
miR-152 (Hanke ve ark., 2010)	miR-1305 (Urquidi ve ark., 2016)
miR-182 (Hanke ve ark., 2010)	miR-1972 (Armstrong ve ark., 2015)
miR-183 (Yamada ve ark., 2011)	miR-4516 (Armstrong ve ark., 2015)
miR-187 (Mengual ve ark., 2013)	miR-4454 (Armstrong ve ark., 2015)
miR-191 (De Long ve ark., 2015; Urquidi ve ark., 2016)	miR-4455 (Armstrong ve ark., 2015)

12'li miRNA idrar panelinin tanısal performansını sistoskopi ile karşılaştırmak için 81 hastanın idrar miRNA profilinin analiz edildiği çalışmada, miR-16, miR-200c, miR-205, miR-21, miR-221 ve miR-34a dahil olmak üzere altı miRNA'dan oluşan bir grup miRNA tümör öngörüsünde en iyi performansı vermiştir (AUC = 0,85). 50 hasta ile yapılan validasyon çalışması sonrasında bu 6 panelin her iki kohortta da çoğunlukla eksprese edildiği, miR-16, -21 ve 200c'nin ise her iki kohortta, tüm bireylerde eksprese edildiği gözlenmiştir. Ekspresyonların idrar osmolalitesine göre normalizasyonu sonucunda bu panelin ekspresyonunun mesane kanseri hastalarının idrarında sağlıklı bireylerden yüksek olduğu saptanmıştır. Bu panelin nüks öngörü duyarlılığı %88 ve özgüllüğü ise %48'dir, validasyon kohortunda panel analizi ile sistoskopi oranı %30 azalmıştır (Sapre ve ark., 2016).

85 idrar örneğinin TaqMan düşük yoğunluklu array ile analiz edildiği çalışmada 46 miRNA 121 kişilik validasyon çalışması için seçilmiştir. 121 kişinin

61'i mesane kanseri tanısı almış hastalardan 60'ı ise sağlıklı kontrollerden oluşmaktadır, Mamm U6 endojen kontrol olarak kullanılıp veri normalizasyonu buna göre yapılmıştır (Urquidi ve ark., 2016). Çok değişkenli analiz, 25-miRNA modelinin %87 duyarlılık ve %100 özgüllük ile mesane kanseri varlığını tahmin edebileceğini göstermiştir. Biyobelirteç çalışmalarında uygulanabilirlik ve maliyet açısından en az yeter sayıda belirteç kullanımı tercih edilmektedir dolayısıyla 10'lu bir miRNA paneli analiz edilmiş ve bu modelin %84 duyarlılık ve %87 özgüllük (AUC 0.902) ile mesane kanseri tanısı koyabildiği belirlenmiştir. Belirteç sayısının azaltılması performans kaybına neden olsa da miR-140-5p, miR-199a-3p, miR-93, miR-652, miR-1305, miR-224, miR-96, miR-766; 10'lu, 15'li ve 25'li panellerin tümünde yer almıştır. Bu miRNA'lar daha önce çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiş olsalar da çoğunun daha önce mesane kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmemiştir (Fendler ve ark., 2016; Urquidi ve ark., 2016).

Son zamanlarda miR-31-5p, miR-93-5p ve miR-191-5p üriner ekspresyonları incelenmiş ve mesane kanseri hastalarında kontrollere göre anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. miR-93-5p ve miR-31-5p'nin farklı histopatolojik gruplarda mesane kanseri belirteci olarak kullanılabileceği ve ekspresyonunun postoperatif olarak azaldığı belirlenmiştir (Juracek ve ark., 2018).

Du ve arkadaşları mesane kanserinde üriner miRNA'ların diyagnostik ve prognostik performansını belirlemek için en kapsamlı çalışmalardan birini yapmıştır. Sağlıklı kontroller ve mesane kanseri hastalarına ait idrar örneklerindeki serbest miRNA'lar miSeq ile dizilenmiş iki grup arasında en fazla fark gözlenen grup RT-qPZR ile doğrulanmıştır. Ekspresyon farkının en fazla olduğu 23 miRNA tespit edilmiştir. Bunların 5'i (miR-7-5p, miR-22-3p, miR-29a-3p, miR-126-5p ve miR-375) mesane kanseri hastalarında anlamlı düzeyde fazla eksprese edilirken 2'si (miR-200a-3p, miR-423-5p) hastalarda kontrole göre daha düşük seviyede eksprese edilmektedir. Elde edilen bulgular iki farklı kohortta daha incelenmiş miR-22-3p ve -200a-3p'nin kasa invaze olmayan mesane kanserinde tümör nüksü için bağımsız faktörler olduğu saptanmıştır. Tümör rezeksiyonu sonrasında miR-22-3p ve -29a-3p seviyelerinin düştüğü belirlenmiştir, bu durum miR-22-3p ve -29a-3p ile tümör varlığı arasında bir bağ olduğunu göstermektedir (Du ve ark., 2018). Hematüri mesane kanserinin kritik semptomlarından biridir, bu sebeple eritrosit

kökenli miRNA'lar tespit edilip mesane kanseri biyobelirteç çalışmalarından çıkartılmalıdır. Aksi takdirde hematüri kökenli bir miRNA mesane kanseri belirtici olarak değerlendirilip çalışmanın kalitesi ve güvenilirliği azalabilir (X. Liu ve ark., 2017).

12 vücut sıvısında miRNA ekspresyonu incelenmiş ve elde edilen idrar ekspresyon verileri mesane kanseri hastalarına ait ekspresyon verileri ile kıyaslanmıştır. Normalizasyon için U6'nın kullanıldığı bu çalışmada delta CT değeri; elde edilen CT değerinin 40'tan çıkarılması ile hesaplanmıştır dolayısıyla delta CT değeri fazla olan miRNA'nın fazla eksprese edildiği anlaşılmalıdır. 714 miRNA içeren human miScript Assay 384 array kullanılarak miRNA ekspresyonları incelenmiştir. 600 miRNA en az 1 vücut sıvısında tespit edilmiştir, 61 miRNA ise örneklerin tümünde tespit edilmiştir. İdrarda tespit edilen toplam miRNA sayısı 204'tür. Plazma ve idrarda tespit edilebilen ortak miRNA sayısının az olması sirkülasyondaki miRNA'ların büyük kısmının böbreklerce toplandığını ya da idrarda parçalandığını düşündürmektedir. Bu çalışmada kontrollerde miR-136-3p ekspresyonu saptanamamış, miR-139-5p'nin yalnızca sağlıklı kontrollerin idrar örneklerinde eksprese olduğu, mesane kanserli bireylerin idrarında eksprese edilmediği gözlenmiştir. miR-16, 3mesane kanseri hastasından yalnızca birinin idrarında eksprese olurken sağlıklı kontrollerin hiç birinde ekspresyon saptanamamıştır. MiR-19b ve miR-21-5p ise mesane kanseri örneklerinde eksprese edilirken sağlıklı kontrollerde ekspresyon saptanamamıştır (Weber ve ark., 2010).

8.2.1.1. Ekzozom biyogenezi ve ekzozomal miRNA'lar

İdrardaki miRNA'lar veziküler formda veya serbest olarak bulunabilir. Serbest miRNA'lar çıplak miRNA yapısında olabileceği gibi ribonükleoprotein kompleksleri şeklinde de bulunabilir. Ribonükleoprotein kompleksleri Argonaute, HDL veya nükleoplasmin ile eşleşmiş miRNA'lardan oluşur. Veziküler form ise ekzozomlar, mikroveziküller ve apoptotik badiler şeklinde gözlenmektedir (Fendler ve ark., 2016).

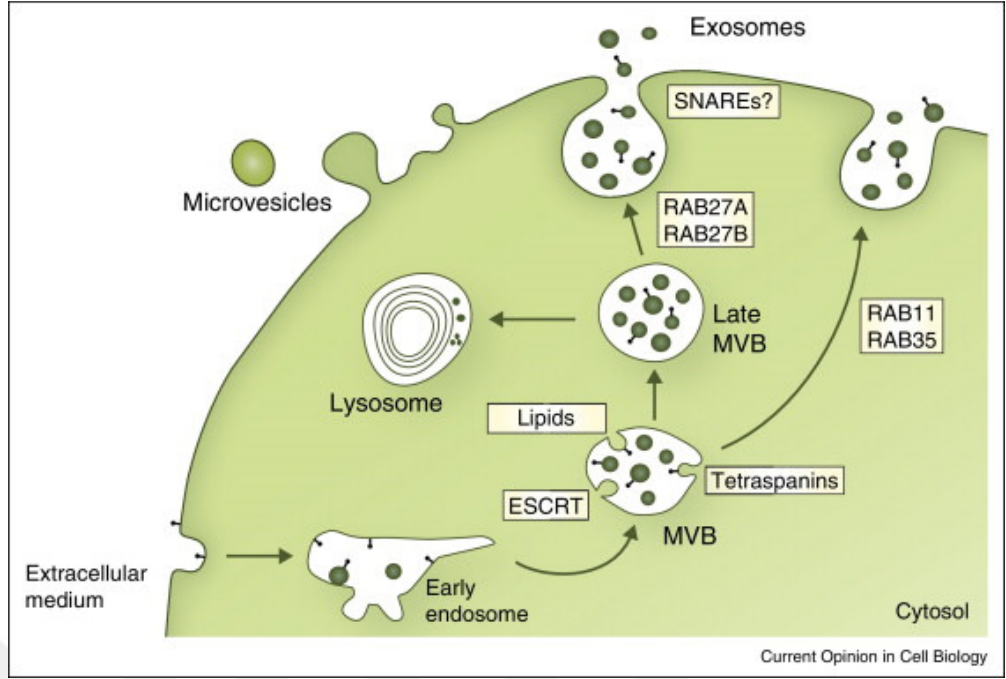
Ekzozomlar kolesterol ve sfingolipiden zengin, integral membran proteinleri, periferik membran proteinleri, sitozolik ve nükleer proteinler, miRNA, mRNA ve metabolitler gibi intrasellüler bileşenleri içeren veziküllerdir. Membranlarında

intraselüler bileşenler iç kısımda korunurken, plazma membranının dış yüzünde bulunan proteinler ekzozomun dış yüzünde bulunur (Street ve ark., 2017). Ekzozomlar endozomal yolk ile üretilirler (Şekil 4), plazma membranında oluşan çöküntüler ile endositik veziküller oluşur, bunların birleşmesi ile de erken endozomlar meydana gelir. Endositik veziküller ve endozom, membranın çökmesi ile oluştuğundan yüzeyleri membrana göre ters yerleşimlidir, hücrenin dış yüzeyinde bulunan moleküller içte, dış yüzeyde olanlar ise içte kalır. Bu erken endozomlar olgunlaşır, atasal membran düzenine erişir, bu aşamada endozomlar lizozomlar ile birleşip degrade olabilir ya da geç endozoma olgunlaşır ve içerisinde intraluminal veziküller (ILV) oluşur. Geç endozomlar, içeriğindeki ILV'ler sebebiyle multiveziküler body (MVB) olarak da adlandırılır. Bu aşamada endozomal membran tersine döner ve ILV yüzeyinde dış taraf-dışta şeklinde tabir edilen oryantasyon oluşur, artık dış yüzde hücrenin dış yüzünde sergilenen elemanlar bulunmaktadır. Bir sonraki adım ILV'lerin ekzozom halinde hücre dışına salınmasıdır (Street ve ark., 2017). Bu süreç taşıma için gerekli endozomal ayırma kompleksine (Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)) bağımlıdır. ESCRT 4 kompleks ve bunlarla ilişkili proteinlerden oluşur. ESCRT-0, ubiquitin bağımlı olarak kargo sınıflandırmasından sorumludur, ESCRT-I ve ESCRT-II tomurcuk oluşumunu tetikler, ESCRT-III vezikül kopmasını başlatır, aksesuar proteinler ise ESCRT ayrılması ve yenilenmesini sağlar. ESCRT vezikül oluşumunu yönlendirmesine rağmen ESCRT bağımsız vezikül oluşumları da tanımlanmıştır. ESCRT bağımsız vezikül oluşum mekanizmalarında lipidler, tetraspaninler ve ısı şok proteinleri görevlidir (Kowal ve ark., 2014). Küçük GTPaz ailesi RAB proteinleri vezikül oluşumu, sitoskelet etkileşimi ile vezikül ve organel hareketliliği ve membran kaynaşmasının başlatacak olan vezikülün hedefe kenetlenmesi gibi önemli süreçlerde yer almaktadır (Stenmark, 2009). İki farklı intraselüler bileşenin kenetlenmesi sonrasında çözünebilir NFS ekleme protein reseptörü (SNARE) kompleksleri lipid tabakaların kaynaşmasına aracılık eder, ancak bu süreç her zaman SNARE komplekslerine ihtiyaç duymaz (Zylbersztejn ve Galli, 2011).

Ekzozomlara alınan protein, lipid ve nükleik asitler rastlantısal olarak paketlenmez, her ne kadar tam mekanizma aydınlatılamamış olsa da çeşitli

moleküller aracılığı ile yükün ekzozoma seçici olarak alındığına dair çok sayıda bulgu vardır. Heterojen ribonükleoprotein A2B1 (hnRNPA2B1) sumoillenir, yapısındaki dizi motifi ile miRNA'ları tanır, KRAS'ın da miRNA paketlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu elemanlardaki değişimler ekzozomun miRNA içeriğini değiştirir (Hessvik ve Llorente, 2018). Genel bir değerlendirme olarak; ekzozom yapısındaki lipidler, proteinler, ribonükleoproteinler ve bunların etkileştiği tüm elemanlar, hücre iskeleti elemanları, bunlarla etkileşen vezikül yüzey bileşenleri, GTPazlar gibi ekzozom oluşum, taşıma ve salınım süreçlerinde yer alan tüm bileşenlerin ekzozoma paketlenen miRNA'ların belirlenmesinde rolü vardır. Hücresel stres, hipoksi, cisplatin muamelesi gibi çeşitli hücresel olaylar ekzozom oluşumunu tetikler dolayısıyla kanser ve ekzozomlar arasında hem sebep hem de sonuç kabul edilebilecek bir ilişki vardır. Hücreler kanserleşme sonrasında daha fazla ekzozom salgıladığı gibi, salgıladıkları ekzozomlar da diğer hücreleri kanserleştirebilmektedir (Yang ve ark., 2013). Mesane kanseri hücrelerinin ekzozom alımının zamana ve miktara bağlı, aktif ve seçici bir olay olduğu, heparin muamelesi ile kısmen de olsa engellenebildiği gözlenmiştir (Franzen ve ark., 2014). Ekzozomların mesane kanseri hücrelerinde invazyon, migrasyon ve anjiyogenezi arttırdığı, yine mesane kanseri hücrelerinde proliferasyonu tetiklediği, ilaç direncinin ekzozomlar aracılığı ile hücreden hücreye nakledildiği, immun sistem hücrelerini kanser hücrelerine karşı duyarsızlaştırdığı gözlenmiştir (Franzen ve ark., 2014).

Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden daha fazla ekzozom salgıladığı, ekzozomların hücreler arası haberleşmeyi sağladığı, invazyon, tümör gelişimi gibi olayları tetiklediği literatür taramasından da anlaşılmaktadır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda hem ekzozomların kontrollü olarak salınması, hem miRNA'ların kontrollü biçimde ekzozoma paketlenmesi göz önünde bulundurularak idradaki serbest miRNA'ların incelenmesinden ziyade, idrardaki ekzozomal miRNA'ların incelenmesinin mesane kanseri tanısı açısından daha özgül bir seçim olabileceği düşünülmüş, bu sebeple çalışmamızda mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollerin idrar ekzozomal miRNA ekspresyonları incelenmiştir.



Şekil 4: Ekzozom oluşumunun şematize anlatımı.

Kowal ve arkadaşlarından alınmıştır (Kowal ve ark., 2014).

Kanser hücrelerinden köken alan ekzozomlar hem bir haberleşme ağı kurmakta hem de diğer hücrelerde kanserleşmeyi başlatıp tümör invazyonuna sebep olabilmektedir (Soung ve ark., 2016). Dolayısıyla mesane kanseri hastalarında idrar ekzozomal miRNA profillerinin incelenmesi kanser hücrelerini yansıtacağından tanı ve takip açısından önemli olabilir. Literatürde mesane kanseri hastalarının idrar örneklerinde ekzozomal miRNA'ların incelendiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır ancak bu çalışmalarda ortak bir biyobelirteç saptanamamış, her biri farklı miRNA ya da miRNA grubu üzerinde durmuştur (Armstrong ve ark., 2015; Sapre ve ark., 2016, Berrondo ve ark., 2016; Long ve ark., 2015).

Mesane kanseri hastalarında sıklıkla rastlanan hematüri idrardaki miRNA profilini değiştirebilmektedir bu sebeple bu hastalarda hücre dışı, ekzozomal miRNA'ların incelenmesi daha güvenilir biyobelirteçler elde edilmesini sağlayabilir.

8.2.1.2. miR-136-3p

CAUCAUCGUCUCAA AUGAGUCU dizisine sahiptir. Notch3 genini hedeflediği Luciferaz Reporter Assay ve qRT-PZR ile doğrulanmıştır. Daha farklı genleri hedeflediği düşünölmekle beraber bunlar güçlü kanıtlara sahip yöntemlerle doğrulanamamıştır. Array sistemi kullanılarak farklı vöcut sıvılarının miRNA içeriklerinin incelendiği bir çalışmada, sağlıklı kontrollerde miR-136-3p ekspresyonu olmadığı, miR-136-3p'nın yalnızca mesane kanseri hastalarının idrarında eksprese olduğu saptanmıştır (Weber ve ark., 2010)

8.2.1.3. miR-210-3p

CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA dizisine sahiptir. Hücre döngüsü proliferasyon gibi süreçlerde yer alan çok sayıda gen hedefleri arasında yer almaktadır. miR-210-3p ve miR-96 ekspresyonunun mesane kanseri hastalarının idrarında kontrollere göre arttığı ve tanı koymada idrar sitolojisinden üstün olduğu tespit edilmiştir (Eissa ve ark., 2015). Mesane kanseri hastalarını negatif sistoskopi sonucu olanlardan ayırma gücü oldukça yüksektir (AUC=0.933) HYAL1, lncRNA-UCA1, miR-210-3p ve miR-96 protein ve epigenetik kombinasyonunun %100 duyarlılık ve %89 özgüllüğe sahip olduğu belirlenmiştir (AUC=0.981) (Eissa ve ark., 2015). Bu çalışmada normalizasyon için U6 kullanılmıştır. Ayrıca dokuda miR-210-3p ekspresyonunun hipoksiyi yansıtabileceği düşünülmektedir (Irlam-Jones ve ark., 2016).

8.2.1.4. miR-21-5p

UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA dizisine sahiptir. PTEN, BCL2 gibi apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin de bulunduğu çok sayıda geni hedeflemektedir (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>, erişim tarihi 05.09.2018 13:21). İdrar süpernatantında ekspresyonu vardır (Pazourkova ve ark., 2016). Mesane kanserinde doku ve biyolojik sıvılardaki ekspresyon farklılıklarının ya da benzerliklerinin ortaya çıkarılmaya çalışıldığı bir çalışmada mesane kanseri hastalarında miR-21'in hem tümör dokusu ve beyaz kan hücrelerinde, hem de idrar ekzozomlarında sağlıklı kontrollere göre fazla eksprese olduğu gözlenmiştir. Erken tanı belirteci potansiyelini belirlemek amacıyla yalnızca Ta (düşük derece)

hastalarda tümör dokusu ve idrar ekzozomlarındaki ekspresyonu incelenmiş ancak biyobelirteç özelliği saptanmamıştır. Bu çalışma oldukça düşük sayıda örnek ile yürütüldüğünden (4 örnek) miR-21'in erken evre mesane kanseri için biyobelirteç olma özelliğini tam anlamıyla dışlamaz (Armstrong ve ark., 2015). Mesane kanseri hastaların idrar, doku ve kan örneklerindeki miRNA profil benzerliklerinin incelendiği bir çalışmada miR-21 ve -4454'ün tüm doku tiplerinde eksprese edildiği saptanmıştır (Armstrong ve ark., 2015). Mesane mukozasında miR-21 ekspresyonunun kanserli hastalarda sağlıklılara göre arttığı ve miR-21, 129 ekspresyonlarının tümör evre ve derecesi ile korele olduğu saptanmıştır (X. Zhou ve ark., 2014). Benzer şekilde dokuda miR-21 ekspresyonunun artmasının kötü sağ kalım ile ilişkili olduğu, miR-21 ve 378'in nüks açısından bağımsız prognostik faktörler olduğu tespit edilmiştir (Zaravinos ve ark., 2012). Mesane kanseri hastalarının idrar süpernatantında ve tam idrarda, kontrollere göre ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (De Long ve ark.). 81 kişilik keşif kohortu ve 50 hastalık doğrulama kohortunda yapılan çalışma 6 miRNA'dan oluşan panelin mesane kanseri için oldukça güçlü bir belirteç olduğunu ortaya koymuştur. Doğrulama kohortunda bu panelin kullanımı sistoskopi oranını %30 azaltmıştır. Bu çalışmada normalizasyon için housekeeping gen kullanılmamış, normalizasyonlar idrar osmolalitesine göre yapılmıştır. miR-16, -200c, -205, -21, -221, -34a paneli tümör varlığını öngörebilmektedir (AUC=0.85). Aynı panel validasyon kohortunda nüksü de öngörebilmektedir. T1 evre tümörlerde ise en iyi performans elde edilmektedir (AUC=0.92) (Sapre ve ark., 2016). Doğrulama kohortunda yalnızca 2 ileri evre kanser bu panel ile yakalanamamıştır. İleri evre kanserlerin zaten hali hazırda kullanılan klinik yöntemler ile tespit edilebildiği göz önünde bulundurulursa T1 evre kanserlerin bu panel ile tespit edilebilmesinin ne denli kıymetli olduğu anlaşılacaktır. Paneldeki 6 miRNA'nın da tümör varlığında ekspresyonu artmaktadır. Özellikle T1 evre kanserlerde bu durumun olması bu miRNA panelinin metastaz, EMT gibi karsinogenezin ileri aşamalarında değil tümörögenезin ilk basamaklarında yer aldığını düşündürür.

8.2.1.5. miR-139-5p

UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU dizisine sahiptir. PIK3CA, NOTCH, IGF1R, JUN gibi çok çeşitli gen hedefleri arasında yer almaktadır. miR-139-5p/3p mesane kanseri dokularında down regule olmaktadır (Ratert ve ark., 2013; Yonemori ve ark., 2016). Bu iki miRNA mesane kanseri hücrelerinde hücre göçü ve invazyonu inhibe eden tümör supressör miRNA görevini üstlenir. Hücre hatlarında down regülasyonları ise invazyon ve migrasyonun artmasına sebep olur. MMP11 geni bu miRNA'ların direkt hedefidir ve mesane kanseri hastalarında yüksek MMP11 ekspresyonunun daha kısa sağ kalımı öngörebildiği tespit edilmiştir (Yonemori ve ark., 2016).

8.2.1.6. miR-19b1-5p

AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC dizisine sahiptir, 13'üncü kromozomda yer alır (3q31.3) (<http://www.mirbase.org>- erişim tarihi 4.9.18, 16:15). Deneysel olarak doğrulanmış hedef genleri aşağıda listelenmiştir (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>, erişim tarihi 05.09.2018 12:57).

Tablo 4'te belirtilen genlerin dışında çok sayıda genin miR-19b1-5p'nin hedefi olabileceği düşünülmektedir ancak bunların doğrulaması daha düşük kanıt düzeyine sahip NGS, mikroarray gibi yöntemler ile yapıldığından dikkate alınmamıştır.

Tablo 4: miR-19b1-5p'nin hedef genleri ve doğrulama yöntemleri

Gen sembolü	Gen adı	Doğrulama yöntemi
ITGB8	integrin subunit beta 8	Luciferase reporter assay
CASP8	kaspaz8	Luciferase reporter assay
KDR	kinase insert domain receptor	Luciferase reporter assay
CCND1	(siklin D1	Western blot
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	Luciferase reporter assay Western blot
MYC	MYC proto-oncogene	qRT-PZR

Sağlıklı insan salyasında ve plazmasında ekspresyonunun arttığı, plasentada yoğun olarak eksprese edildiği bildirilmiştir. Mesane dokusunda ekspresyon saptanamamıştır (http://guanlab.ccmb.med.umich.edu/mirmine/highchart_box.php?mirna=hsa-miR-19b-1-5p&issue=all&vecline, erişim tarihi 05.09.2018 12:59).

70 kişinin idrar süpernatantlarının incelendiği çalışmada 35'inci döngüden önce CT verdiği belirlenmiştir (Pazourkova ve ark., 2016). Aynı çalışmada kanda eksprese edilen miR-16'nın idrarda da eksprese edildiği ve miR-21'in de idrarda en çok eksprese edilen miRNA'lar arasında yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca mesane kanseri hastalarının doku örneklerinde kontrollere göre ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (Han ve ark., 2011). PTEN genini hedefleyen bir onkogenik miRNA olduğu da diğer bir bulgudur (Enokida ve ark., 2016).

8.2.1.7. miR-16-5p

miR-16'nın kanda eksprese edilmesinin yanısıra idrarda da eksprese edildiği saptanmıştır (Pazourkova ve ark., 2016). Mesane kanseri hastalarına ait parafin doku, idrar ekzozomu, plazma ve beyaz kan hücrelerinde en fazla eksprese edilen miRNA'lar arasında yer almaktadır. Özellikle plazmada oldukça yoğun eksprese olup, en fazla eksprese edilen miRNA'lar arasında miR-451'in ardından ikinci sırada yer aldığı belirlenmiştir (Armstrong ve ark., 2015). Mir-451a ve miR-16 hemoliz markeri olarak değerlendirilmektedir (Armstrong ve ark., 2015; Pritchard ve ark., 2012). miR-16'nın CCND1 genini hedefleyen bir tümör baskılayıcı miRNA olduğu düşünülmektedir (Enokida ve ark., 2016).

miR-16 ekspresyonunun, mesane kanseri hastalarının tam idrarında kontrollere göre arttığı saptanmıştır ancak normalizasyon idrar osmolalitesine göre yapılmıştır (Sapre ve ark., 2016). Farklı bir çalışmada 6 hasta ve 3 kontrol örneği kullanılmış, mikroarray ile global normalizasyon yöntemi kullanılarak, mesane kanseri hastalarının idrar süpernatantı ve doku örneklerinde miR-16, -96 ve -183 ekspresyonunun kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. Mikroarray doğrulaması daha yüksek sayıda örnek kullanılarak, RT-PZR ile yapılmıştır, referans olarak RNU6B kullanılmıştır. Bu doğrulama ve istatistik analizler sonrasında yalnızca miR-99a ve -125b'nin tanısal değeri olduğu belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2014).

Daha sonra yapılan bir çalışmada miR-16'nın üriner ekzozomlarda miRNA ekspresyonlarının normalizasyonunda kullanılmasının uygun olacağı önerildiyse de bu çalışma mesane kanseri hastalarında yürütülmemiştir ve örnek sayısı bir normalizasyon stratejisi belirlemek için hayli azdır (Lange ve ark., 2017). Bu sebeple miR-16 çalışmamıza dahil edilmiştir ancak housekeeping miRNA olarak kullanılmamıştır.

8.2.1.8. İdrarda miRNA normalizasyonu

Mikro RNA çalışmalarında farklı normalizasyon stratejileri kullanılmaktadır. Hanke ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada tam idrarda miR-152'yi referans/kontrol olarak kullanmış ve mesane kanseri hastalarında miR-126 ve -182 ekspresyonunun kontrole göre arttığını miR126:182 oranının 0.768 AUC'ye sahip bir biyobelirteç olduğunu saptamışlardır (Hanke ve ark., 2010). İdrar sedimentinde yapılan bir çalışmada ise RNU44 ve 48 referans olarak kullanılmış ve miR-15b ve -1224-3p ekspresyonunun mesane kanseri hastalarında arttığı miR-135b'nin ise azaldığı tespit edilmiştir (AUC=0.86) (Miah ve ark., 2012). Tam idrar için RNU6B (Snowdon, Boag, Feilotter, Izard, ve Siemens, 2013), ozmolarite (Sapre ve ark., 2016); idrar sedimenti için RNU44, -48, miR-30c, -103 ve RNU6 (Eissave ark., 2015; W. Liu ve ark., 2015; Mengual ve ark., 2013; Miah ve ark., 2012; G. Wang ve ark., 2012); üriner ekzozomlar için RNU48 (Crossland, Norden, Bibby, Davis, ve Dickinson, 2016a); idrar süpernatantı için RNU6, RNU6B, RNU48, sık kullanan referanslardır (De Long ve ark., 2015; S. M. Kim ve ark., 2013; J. Wang ve ark., 2015; Yun ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2014; X. Zhou ve ark., 2014).

8.2.2. Mesane kanseri biyobelirteci olarak üriner proteinler

Mesane kanseri tanısında ve takibinde sistoskopi oranının azaltılabilmesi için çeşitli üriner protein ekspresyon değişiklikleri incelenmiş ve bunların bir kısmı için Amerikan Gıda ilaç İdaresi'nden (FDA) onay alınmıştır. Hali hazırda klinik kullanım için FDA onaylı altı test bulunmaktadır. Bunlar BTA stat, BTA TRAK, NMP22, NMP22 Bladder Check Test, uCyt ve UroVysion testleridir. Bu kitlerin duyarlılıkları %57-82 özgüllükleri %74-88 arasında değişmekte ve hassasiyet kanserin evre ve derecesi arttıkça artmaktadır. Duyarlılığı %98 olan sistoskopinin

önüne geçemediklerinden sistoskopi yapılmadan tek başlarına kullanılamaz (Tan ve ark., 2018).

8.2.2.1. Apürinik/apirimidinik endonükleaz 1/redoks faktör-1 (Ape1-Ref1)

Ape1 baz çıkarma onarım yolağında yer alan çok fonksiyonlu bir proteindir. Oksidatif baz hasarını onarır, çok sayıda transkripsiyon faktörünün redüktif aktivatörü olduğundan redoks efektör faktör (Ref-1) ismini almıştır. Apoptoz, inflamasyon, anjiyogenez ve sağkalım yollarındaki birçok proteini aktive eder (Thakur ve ark., 2014). Ape1/Ref1 birçok kanser tipinde aktive olarak daha agresif fenotipe sebep olur. Ape1/Ref1'in downstream transkripsiyon faktörleri p53 gibi kanser gelişimine katkı sağlayan moleküller olduğundan Ape1/Ref1 redoks sinyalinin inhibisyonu çoğu tümörün büyüme ve progresyonunu yavaşlatmaktadır. Ape1/Ref1 inhibisyonu çeşitli kanser ilaçları ile birlikte kullanılması durumunda da oldukça etkin olmaktadır (Thakur ve ark., 2014).

169 mesane kanseri hastası ve 108 kontrol kullanılarak yapılan incelemede, mesane kanseri hastalarının idrarlarında Ape1/Ref1 konsantrasyonunun kontrole göre arttığı, tümör evre ve derecesi ile korele olduğu, ayrıca nüks öyküsü olan hastalarda daha yükek seviyelerde bulunduğu tespit edilmiş, diyagnostik bir marker olabileceği saptanmıştır (S. Choi ve ark., 2016).

8.2.2.2. Mesane kanseri ilişkili nükleer matriks proteini 4 (BLCA4)

BLCA-4 mesane kanseri hücreleri tarafından eksprese edilen 6 mesane spesifik nükleer proteinden biridir (Getzenberg ve ark., 1996). Aktivatör protein (AP)-1, AP-2 gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşir. Bu proteinler mesane kanserinde IL-1 α , IL-8, VEGF ve MMP-9 ile etkileşerek tümörögenezi ve tümör invazyonunu artırır (Konety ve ark., 2000). BLCA4 spesifik olarak mesane kanseri dokularını hedef alan bir nükleer matriks proteindir, enfeksiyon, sigara kullanımı katater varlığı ve sistit gibi durumlardan etkilenmediği tespit edilmiştir (Deiningner ve ark., 2018).

Mesane transisyonel hücre karsinomu hastalarının idrarlarında cDNA mikroarray ile incelenmiş, düşük evre yüksek evre tümör ayrımını %80 başarı ile saptayabildiği belirlenmiştir (Guo ve ark., 2011).

91 mesane kanseri hastasının idrarlarının incelendiği çalışmada BLCA4 ve NMP22 konsantrasyonlarının, mesane kanseri hastalarında, sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu ROC eğrileri incelendiğinde iki protein için sırasıyla 0,830 ve 0,836 AUC değerine sahip olduğu belirlenmiştir (Guo ve ark., 2011).

8.2.2.3. Adaptör protein crk (CRK)

Hücre adezyonu, yayılım ve migrasyonu düzenleyen, proto onkogen ürünü bir adaptör proteindir. Tutunma ile indüklenen MAPK8 aktivasyonuna, membran kıvrılmasına ve hücre motilitesine Rac bağımlı olarak aracılık eder. Apoptotik hücrelerin fagositozunda da yer alır. Mesane kanseri hücrelerinde HGF/c-Met ilmeği üzerinden EMT ve metastazı indüklediği tespit edilmiştir (Matsumoto ve ark., 2015). Gastrik kanserlerde de mir-126'nın Crk'yı da hedefleyerek büyümeyi durdurduğu gözlenmiştir (LIU ve ark., 2014).

Mesane kanserinin moleküler patogeneğinde yer aldığından, bu çalışmaya dahil edilmiştir. Literatürde üriner konsantrasyonunun incelendiği bir çalışma yoktur.

8.2.2.4. Nükleer matriks protein 22 (NMP22)

Nükleer matriks proteinleri hücre çekirdeğinin yapısal bileşenlerindendir ve nükleer yapının korunmasında destek sağlar. NMP22 malignant ürotelyal hücrelerde sağlıklı ürothelyumdan daha fazla bulunur ve apoptoz sonucu idrara salınır, dolayısıyla mesane kanseri hastalarının idrarında MNP22 seviyesi kontrole göre artmıştır. İdrarda MNP22 varlığını incelemek için 2 test geliştirilmiştir. MNP22BC niceleyici bir testtir, NMP22 Bladder Check ise kalitatif bir testtir. (Mbeutcha ve ark., 2016). 134 hasta ve 42 kontrol kullanılarak ELISA ile incelenen NMP22'nin de dahil olduğu bir grup protein %89 duyarlılık ve %91 özgüllük ile mesane kanseri hastalarını normallerden ayırmıştır (Tan ve ark., 2018). Toplam 4384 hastanın kullanıldığı 7 bağımsız çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde

NMP22'nin ortalama %69 özgülük ve %81 duyarlılığa sahip olduğu belirlenmiştir (Mowatt ve ark., 2010).

Mesane kanseri riski taşıyan 1300 kişinin değerlendirildiği bir çalışmada NMP22 BladderCheck testinin (%56), idrar sitolojisine (%16) göre daha duyarlı olduğu ancak idrar sitolojisi kadar özgül olmadığı belirlenmiştir (Grossman ve ark., 2005). BladderCheck, idrar sitolojisi ve sistoskopi değerlendirmelerinin bir arada yapılması durumunda mesane kanseri öngörü doğruluğu %80'lere ulaşmıştır. BTA testleri gibi NMP22 testleri de hücre döngüsü ve apoptozu etkileyen yaş, sigara kullanımı, enfeksiyon, taş, lökosit varlığı gibi durumlardan etkilenmektedir. Bu sebeplerle tam olarak tanısal bir test olarak değerlendirilmekten ziyade negatif sitolojik değerlendirme yapılmış, mesane kanseri öyküsü olan hastalarda acil yada ertelenmiş sistoskopi kararının verilmesi için kullanılması önerilmektedir (Faiena ve ark., 2018).

8.2.2.5.Vimentin (VIM)

Epitelyal mezankimal geçiş belirteci olan e-kaderin ve sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyon kaybı, vimentin ve fibronektin upregulasyonu kasa invaze mesane kanseri tanısı, tedaviye direnç ve kötü gidişat ile ilişkilendirilmektedir (Knowles ve Hurst, 2015). İdrar örneklerinde metilasyon düzeyi incelenmiş ve yüksek evreli hastalarda daha fazla metile olduğu ayrıca metilasyonun nüks belirteci olabileceği saptanmıştır (Reinert ve ark., 2012). Başka bir çalışmada da vimentinin de dahil olduğu bir grup genin idrardaki metilasyon profilleri ile mesane kanseri hastalarını %94 duyarlılık ve %90 özgülük ile sağlıklı kontroller, renal kanser ve prostat kanseri hastalarından ayrılabilirdiği belirlenmiştir (Costa ve ark., 2010). İdrardaki konsantrasyonu değerlendirilmemiştir, çeşitli çalışmalarda idrar sitolojisi vimentin boyaması ile incelenmiştir (Ohsaki ve ark., 2011).

9. GEREÇ VE YÖNTEM

9.1.Hasta Örneklerinin Eldesi ve Klinik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, Marmara Üniversitesi İstanbul Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji kliniğinde, Kasım 2016 – Mayıs 2018 tarihleri arasında mesane kanseri tanısı almış 59 hasta, mesane kanseri öyküsü olmayan 34 sağlıklı birey ve Kasım 2016'dan itibaren takip edilen ve hastalık nüksü bulunmayan 12 takip hastasından idrar örnekleri alınmıştır. Hastaların patolojik değerlendirmeleri Marmara Üniversitesi İstanbul Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarında yapılmış, çalışmaya ait deneyler ise Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında, anabilimdalı imkanları ve BAPKO bütçesi kullanılarak yapılmıştır. Toplanan idrar örnekleri uygun biçimde kodlanmış, -80°C'de bir sonraki aşamada kullanılıncaya dek saklanmıştır. Tez çalışmasının etik açıdan uygunluğu, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Komisyonu'nun 15.07.2016 tarihli Etik Komisyonunda incelenmiş ve oy birliğiyle onaylanmıştır.

Çalışma kapsamında toplanan idrar örneklerinden Urine Exosome RNA Isolation Kit (Norgen – Kanada) kullanılarak ekzozomal RNA izolasyonu yapılmıştır, ekzozomal RNA'lardan Universal cDNA Synthesis kit II (Exiqon – Danimarka) kullanılarak cDNA sentezlenmiş, ExiLENT SYBR Green master mix ve miRCURY LNA Universal RT microRNA PZR LNA PZR primer sets (Exiqon – Danimarka) kullanılarak mikroRNA ekspresyonları incelenmiştir. İdrar örnekleri santrifüjlenerek hücre debrisisinden arındırıldıktan ELISA kitleri (Bioassay Technology Laboratory, YLBiont – Çin) ile protein içerikleri incelenmiştir.

9.2.Kullanılan Aletler

Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)

Isı Bloğu, Techne DB-ZA (İngiltere)

Soğutmalı Santrifüj IEC, MP4R (A.B.D.)

Manyetik Karıştırıcı, Elektro-Mag (Türkiye)
Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (A.B.D.)
Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® B (Almanya)
Etüv, Heraeus (Almanya)
Laminar Flow, Özge A.Ş (Türkiye)
Otoklav, All American (A.B.D.)
Mikroplate Fotometre, Multiskan (Thermo Scientific, A.B.D.)
Kırık Buz Makinası, Scotsman (A.B.D.)
Buz Dolabı, Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu -20°C, Philco (Türkiye)
Derin Dondurucu -80°C, Thermo 702 (A.B.D.)
Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)
Biyolojik Güvenlik Kabini (A.B.D.)
Eş zamanlı PZR cihazı, Light Cycler 480 Roche (Almanya)

9.3.Kullanılan Sarf Malzemeleri

Eppendorf Tüp 1.5 ml, Axygen (A.B.D.)
Eppendorf Tüp 2.0 ml, Axygen (A.B.D.)
Falkon Tüp 50 ml, TPP (İsviçre)
Falkon Tüp 15 ml, TPP (İsviçre)
Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)
Filtreli Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)
Serolojik Pipetler (5ml, 10ml, 25 ml), Axygen (A.B.D.)
Urine Exosome RNA Isolation Kit (Norgen – Kanada)
Universal cDNA Synthesis kit II (Exiqon – Danimarka)
ExiLENT SYBR Green master mix (Exiqon – Danimarka)

miRCURY LNA PZR primer set, hsa-miR-21-5p (Exiqon – Danimarka)

miRCURY LNA PZR primer set, hsa-miR-210-3p (Exiqon – Danimarka)

miRCURY LNA PZR primer set, hsa-miR-19b-1-5p (Exiqon – Danimarka)

miRCURY LNA PZR primer set, hsa-miR-139-5p (Exiqon – Danimarka)

miRCURY LNA PZR primer set, hsa-miR-136-3p (Exiqon – Danimarka)

miRCURY LNA PZR primer set, hsa-miR-16-5p (Exiqon – Danimarka)

miRCURY LNA PZR primer set, RNU 48 (Exiqon – Danimarka)

miRCURY LNA PZR primer set, U6 sn RNA (Exiqon – Danimarka)

Human Adapter Molecule crk ELISA kit (Bioassay Technology Laboratory – Çin)

Human DNA (apurinic or apyrimidinic site) lyase ELISA kit (Bioassay Technology Laboratory – Çin)

Human Bladder Cancer Associated Nuclear Matrix Protein 4 ELISA kit (Bioassay Technology Laboratory – Çin)

Human Nuclear Martix Protein 22 ELISA kit (Bioassay Technology Laboratory – Çin)

Human Vimentin ELISA kit (Bioassay Technology Laboratory – Çin)

Human Creatinine (Cr) ELISA kit (YLBiont – Çin)

9.4.Kullanılan Kimyasallar

EtOH, Merck (Almanya)

Deiyonize Su

İzopropanol

9.5.İdrar Örneklerinden Ekzozomal RNA İzolasyonu

Yapılan araştırmalarda çeşitli yöntemlerin ekzozom izolasyonundaki etkinliği karşılaştırılmış ve Norgen Biotek Urine Exosome RNA Isolation Kit'in ekzozom izolasyonunda en iyi performansa sahip olduğu gösterilmiştir (Crossland ve ark.,

2016). İdrar örneklerinden ekzozomal RNA izolasyonu Urine Exosome RNA Isolation Kit (Norgen – Kanada) kullanılarak, üretici firma yönergeleri doğrultusunda yapılmıştır.

- Kit kullanılmadan önce tüm solüsyonlar oda sıcaklığına getirilmiş, Slurry B1 solüsyonu karıştırıcıda muhafaza edilerek iyice çalkalanması sağlanmıştır.
- Wash solüsyon A'ya 90 ml %100 EtOH eklenmiştir.

Yöntemin basamakları aşağıdaki gibidir.

1. 20 mL idrar 50 ml falkona alındı. 1000 rpm x 10 dakika santrifüjlendi.
2. Üst faz yeni falkona alındı. 2500 rpm x 10 dakika santrifüjlendi.
3. 10 ml üst faz 15ml falkona alındı, 300µl Slurry B1 + 250 µl Binding Buffer A eklendi. 10 saniye vortexlendi.
4. 2500 rpm x 2 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.
5. Pellet 300µl Lysis Buffer A içinde pipetaj ile çözüldü, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası 300 µl %67 izopropanol eklendi, 10 sn vortexlendi, kit içeriğindeki filtreye aktarıldı, 14.000 rpm x 1 dakika santrifüjlendi.
7. Kolona 400 µl Wash solution A eklendi, 14.000 rpm x 1 dakika santrifüjlendi.
 - a. Yıkama basamağı 2 kez daha tekrarlanıp toplam 3 yıkama yapıldı.
8. Kolon boş olarak 14.000 rpm x 3 dakika santrifüjlendi, toplama tüpü atıldı.
9. Kolon elüsyon tüpüne alındı, 80 µl Elüsyon Solüsyonu A eklendi, 2.000 rpm x 2 dakika, ardından 14.000 rpm x2 dakika santrifüjlenip RNA içeren solüsyon -80°C'de saklandı.

9.6.Ekzozomal RNA'lardan cDNA Sentezi

İdrar örneklerinden izole edilen RNA'lar kalıp olarak kullanılarak RNA'dan cDNA sentezi MiRCURY LNA Universal RT microRNA PZR Universal cDNA Synthesis kit kullanılarak yapıldı. Kit, olgun miRNA'lara poly-A kuyruğu takılması ve poli A kuyruğuna özgü poly-T primer ile cDNA sentezlenmesini sağlar.

Optimizasyon deneyleri sonucu en yüksek verimin sağlandığı reaksiyon içeriği ve koşulları aşağıdaki gibidir.

Tablo 5: cDNA sentez reaksiyon içeriği ve koşulları.

Reaksiyon toplam 10 µl hacimde gerçekleştirilmiş, sentez 42°C sıcaklıkta, enzim durdurma ise 95°C sıcaklıkta gerçekleştirildikten sonra ürünler 4°C'ye soğutulmuştur.

Reaksiyon İçeriği		Reaksiyon Koşulları	
Bileşen	Miktar (µl)	Sıcaklık (°C)	Zaman (Dakika)
5x Reaksiyon Tamponu	2	42	60
ddH ₂ O	1	95	5
Enzim	1	4	∞
RNA	6		

9.7.cDNA'dan Real-time PZR Amplifikasyonu ile miRNA Kantitasyonu

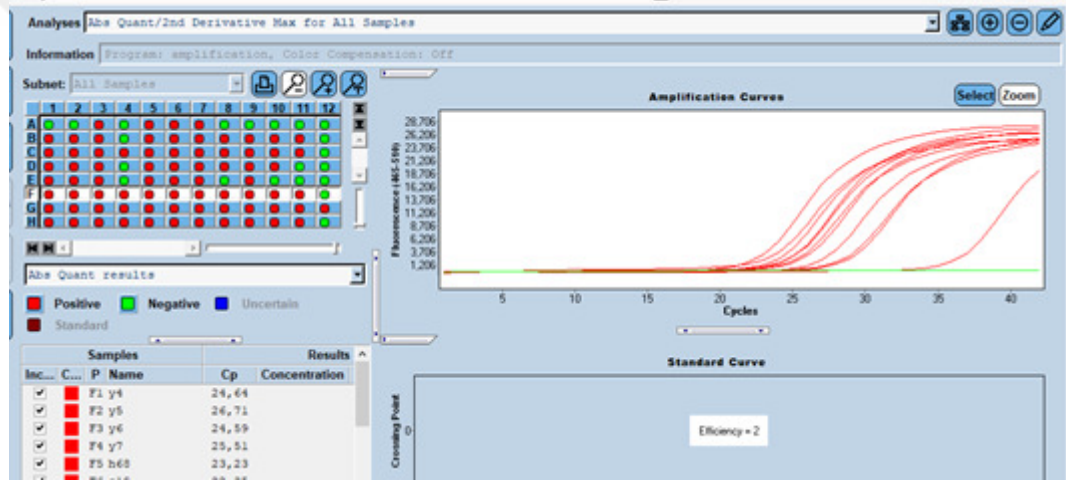
Elde edilen cDNA'dan mikroRNA spesifik LNA primerler ile hedef miRNA'lar amplifiye edildi. Amplifikasyon takibi için SYBR Green boyası kullanıldı. cDNA örnekleri 1:40, 1:30, 1:20, 1:10 ve 1:5 dilüe edilerek denemeler yapılmış ve 1:10 dilüsyon ile devam edilmesine karar verilmiştir. Optimizasyon denemeleri sonucunda elde edilen koşullar ve reaksiyon içeriği aşağıdaki gibidir (Tablo 6).

Eş zamanlı PZR reaksiyonu DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibine olanak sağlar. SYBR Green bu amaçla sıklıkla kullanılan boyalardan biridir. Çift iplikli DNA molekülüne bağlanarak floresan ışıma verir. SYBR Green boyasından alınan ışımanın sınır değeri aştığı noktaya Ct ya da Cp değeri adı verilmektedir. Bu noktada DNA amplifiye olmuş ve DNA'ya bağlanan boyanın verdiği ışıma sınır değeri aşmıştır (Şekil 5).

Tablo 6: Eş zamanlı niceleyici PZR reaksiyon içeriği ve koşulları.

Reaksiyon toplam 10µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon için kit kullanım kılavuzunda belirtilen 60°C kullanılmış, 45 döngü boyunca amplifikasyon yapıp ışıma alınmıştır. Amplifikasyon sonrasında 40-90°C aralığında devamlı ışıma alınarak erime eğrisi elde edilmiştir.

Reaksiyon İçeriği		Reaksiyon Koşulları	
Bileşen	Miktar (µl)	Sıcaklık (°C)	Zaman (Saniye)
Exilent Sybr Green Master mix	5	95	600
Primer Seti	1	95	10
1:10 cDNA	4	60	60
		45 döngü, Ramp Rate 1.6 °C/s Optik okuma	
Son Hacim	10	Erime eğrisi analizi	

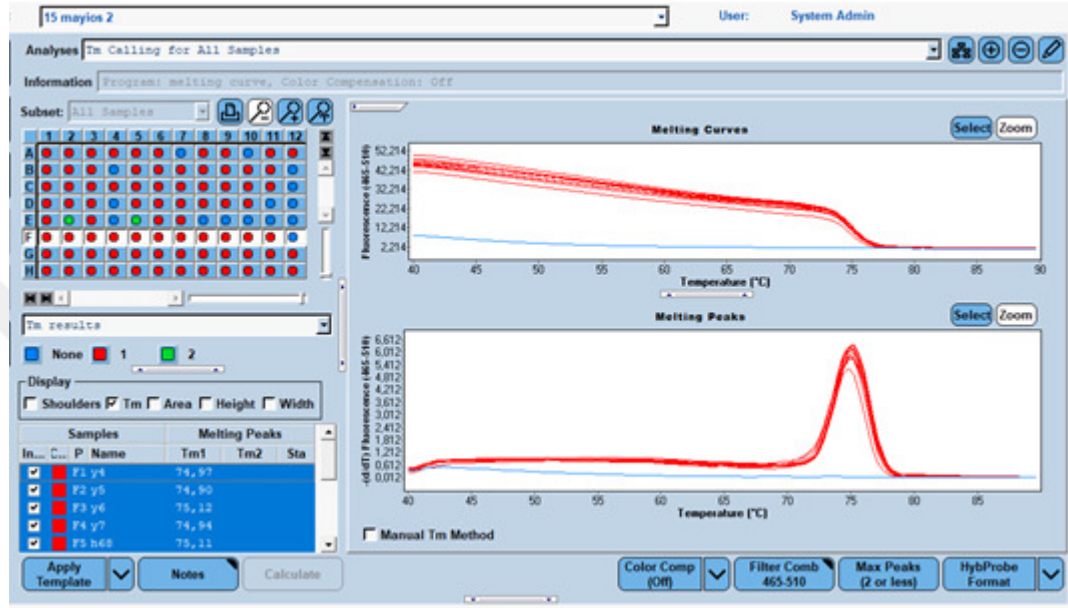


Şekil 5: Eş zamanlı PZR amplifikasyon eğrisi.

Amplifikasyon eğrisinde SYBR Green boyasından alınan ışımanın sınır değeri aştığı noktaya Ct ya da Cp değeri adı verilmektedir. Bu noktada DNA amplifiye olduğundan SYBR Green boyası çift iplikli ürünlere bağlanmıştır ve floresan ışıma yapmaktadır. LightCycler 480 cihazının entegre yazılımı her döngüde floresan ışıma miktarını ölçer, eşik değerini aştığı ilk noktayı Cp değeri olarak verir. Cp değeri küçük olan ömelerde amplifikasyon daha erken gerçekleşmiştir, daha çok amplikon oluşur, yani hedef gen daha fazla eksprese edilmektedir.

İşımanın sınır değeri aştığı anda amplifikasyondan emin olunur ancak doğru amplikonun takibinin yapıldığının belirlenebilmesi için erime eğrisinin incelenmesi gerekmektedir, SYBR Green belirli bir DNA moleküle bağlanan spesifik bir boya değil, tüm çift iplikli DNA moleküllerine bağlanan bir boyadır. Çift iplikli bir DNA molekülünün erime sıcaklığı yani molekülün %50'sinin denatüre olabilmesi için gerekli sıcaklık değeri molekülün uzunluğuna ve baz içeriğine bağlıdır. Dolayısıyla belli bir primer kullanılarak amplifiye edilmiş dizilerin belirli bir erime sıcaklığı olacaktır. (M W Pfaffl, 2001). Eş zamanlı PZR ile amplifiye edilen DNA

moleküllerinin erime sıcaklıkları cihaz tarafından görüntülenebilmektedir. Bütün amplikonlar için benzer ısı aralığında pik alınması PZR reaksiyonunun özgülüğünün ispatıdır. Aynı sıcaklık değerinde pik veren örneklerde hedef dizi amplifiye olmuştur, elde edilen sinyal bir kontaminasyon ya da özgün olmayan bağlanmanın sonucu değildir (Şekil 5).



Şekil 6: Eş zamanlı PZR erime eğrisi.

PZR sonucu elde edilen ürünün doğru ürün olup olmadığının anlaşılmasını sağlar. Çift iplikli bir DNA molekülünün Tm değeri molekülün %50'sinin denatüre olabilmesi için gerekli sıcaklık değeridir. Molekülün uzunluğuna ve baz içeriğine bağlıdır. Bir primer ile elde edilen eş amplikonlar aynı ya da çok benzer Tm değerine sahip olmalıdır.

Deneylerde kullanılan LNA primerler oldukça spesifik olmasına rağmen elde edilen ürünlerin erime eğrileri incelenmiş, non spesifik bağlanma sonucu yanlış amplikon veren örneklerin deneyleri tekrar edilmiştir.

Eş zamanlı niceleyici PZR reaksiyonu ile kantitasyon yapılmasına yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan sıklıkla kullanılanı göreceli kantitasyon yöntemidir. Yöntem kabaca, belirli şartlar altında ekspresyonu değişmeyen, her doku ya da hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası varyasyon göstermeden eksprese edilen bir "house keeping" gen ekspresyonunun hedef gen ekspresyonu ile kıyaslanmasına dayanır. Bu yönteme delta delta Ct adı verilmektedir. Bu yöntem, hedef DNA molekülü ve standart olarak kullanılan DNA molekülünün aynı verimlilik ile amplifiye olduğunu kabul ederek aşağıdaki formülasyona dayalı kantitasyon yapar.

$$\text{Oran} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta CP_{\text{hedef}} (\text{kontrol-örnek})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}} (\text{kontrol-örnek})}}$$

Formülde geçen oran; hedef gen ekspresyonunun kontrole oranı, E; verimlilik, ΔCP ise Ct değerleri farkını ifade etmektedir.

Hedef gen ve kontrol geninin PZR verimlilikleri birbirine ve 2'ye eşit kabul edildiğinde yeni formülasyon aşağıdaki gibi olacaktır.

$$\text{Oran} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

Daha açık biçimde ifade etmek gerekirse,

CtA: Kontrole ait house keeping gen Ct değeri

CtB: Hastaya ait house keeping gen ct değeri

CtC: Kontrole ait hedef miRNA Ct değeri

CtD: Hastaya ait hedef miRNA Ct değeri olmak üzere

$$\Delta Ct \text{ Hasta} = CtD - CtB$$

$$\Delta Ct \text{ Kontrol} = CtC - CtA$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Hasta} - \Delta Ct \text{ Kontrol} = (CtD - CtB) - (CtC - CtA)$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Kontrole göre kat olarak ekspresyon değişimini ifade etmektedir.}$$

Pfaffl tarafından geliştirilen bu formülasyon günümüzde göreceli kantitasyon için kullanılmaktadır (Michael W Pfaffl ve Pfaffl Michael, 2001). Kantitasyon ve analiz LightCycler 480 yazılımı ve delta delta Ct yöntemi kullanılarak yapılmıştır. miRNA ekspresyonları RNU48 ve U6 ekspresyonuna göre normalize edilmiştir.

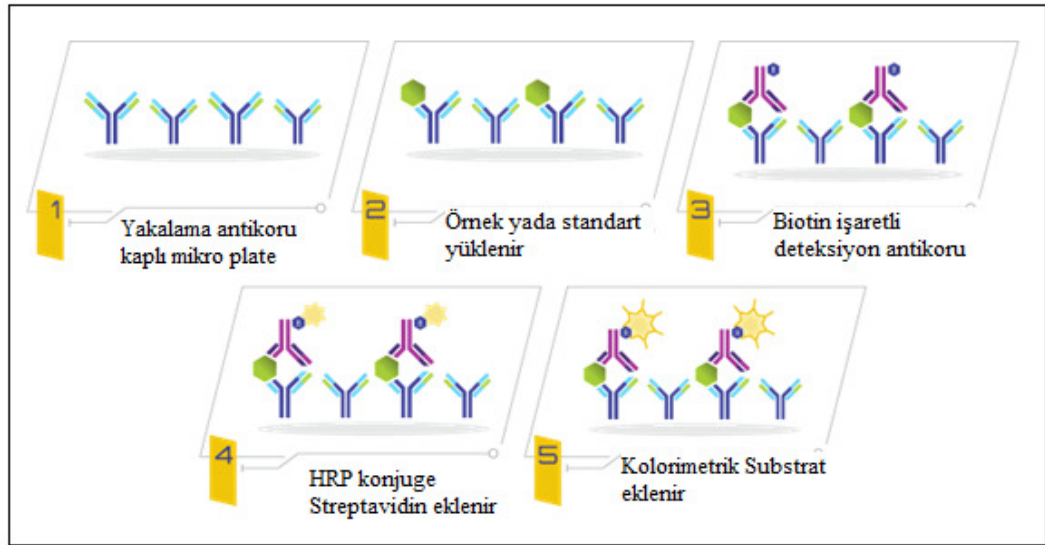
9.8.ELISA Testi ile İdrar Örneklerinde Protein Kantitasyonu

İdrar örnekleri steril numune kaplarına alındı, bekletilmeden -80 °C'ye kaldırıldı. ELISA deneyleri öncesi oda sıcaklığında erimeye bırakıldı. Çalkalanıp

çökeltiiler giderildikten sonra 2500 rpm hızda 20 dakika boyunca santrifüjlendi. Üst faz yeni bir falkona alınarak ELISA deneylerinde kullanıldı.

ELISA testleri için Bioassay Technology Laboratory ve ylbiont ELISA kit'leri kullanılmıştır, kit sandviç ELISA tipindedir. Elisa testi ile incelenen proteinlerden biri Vimentin'dir. 96 kuyulu plate Vimentin monoklonal antikor ile kaplıdır, idrar örnekleri platelere yüklenir, biotin konjuge anti human Vimentin antikor eklenip idrar örneklerindeki Vimentine bağlanması sağlanır. Yıkama ile bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP eklenerek biotin konjuge anti human Vimentin antikora bağlanması sağlanır. Yıkama basamakları ile bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu eklenerek bağlı bulunan insan Vimentini miktarına göre renk oluşumu sağlanır. Asidik yapılı durdurma solüsyonu ile reaksiyon sonlandırılıp 450 nm dalga boyunda renk ölçümü yapılır. Kullanılan diğer ELISA kitleri de aynı prensiple çalışmaktadır. ELISA yönteminin basamakları ve genel prensibi aşağıdaki gibidir (Şekil 7).

- Kullanılmadan önce tüm malzemeler oda sıcaklığına getirildi.
 - 30X yıkama solüsyonundan distile su ile 1X yıkama solüsyonu elde edildi.
 - Kit içeriğindeki standart solüsyon ile 6 farklı konsantrasyonda standart elde edildi. Standartların hazırlanışı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 7). Yöntemin basamakları aşağıdaki gibidir.
1. Standart kuyularına 50µl standart+50 µl streptavidin-HRP eklendi.
 2. Örnek kuyularına 40 µl idrar +10 µl anti-VIM antikor+50 µl streptavidin-HRP eklendi.
 3. Multi skan cihazında karışması sağladı, plate kapatılıp 60 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
 4. Plate koruyucu bandı açıldı 5 kez yıkama yapıldı. Her yıkamada, her kuyuya 400 µl yıkama solüsyonu eklendi, 1 dakika beklendi, yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı.
 5. Her kuyuya 50 µl subtrat A solüsyonu ve substrat B solüsyonu eklendi.
 6. Plate kapatılıp karanlık ortamda, 10 dakika, 37 °C'de inkübe edildi.
 7. Tüm kuyulara 50 µl Stop solüsyonu eklendi, mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi.
 8. 450 nm dalga boyunda okuma yapıp optik dansiteler kayıt edildi.



Şekil 7: Sandwich ELISA yönteminin şematize anlatımı.

Sandwich ELISA yönteminde plate hedef proteine özgü monoklonal antikor ile kaplıdır, örnekler platelere yüklenir, örnek içerisindeki hedef protein yakalama antikorlu tarafından yakalanır. Biotin işaretli deteksiyon antikorlu yakalama antikorlu ve hedef proteine bağlanır. Streptavidin-HRP eklenerek biotine bağlanması sağlanır. Yıkama basamakları ile bağlanmayan yapılar uzaklaştırılır. Kolorimetrik substrat solüsyonu eklenerek Streptavidin-HRP kompleksinin renk oluşması sağlanır. Asidik yapılı durdurma solüsyonu ile reaksiyon sonlandırılıp 450 nm dalga boyunda renk ölçümü yapılır. Fotometrik ölçüm sonrası konsantrasyonu bilinen standart solüsyonlar için konsantrasyon eğrisi çizilir, bu eğrinin denkleminde yararlanılarak konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonu hesaplanır.

Tablo 7: Elisa deneylerinde kullanılan standartlar, dilüsyon şekilleri ve konsantrasyonları.

Deneylerde kullanılacak standartlar, kit içerisinde sağlanan konsantrasyonu bilinen protein solüsyonlarıdır. Ana standart solüsyonundan dilüsyon ile 5 adet standart hazırlanır ve konsantrasyon eğrisi standart solüsyonlarından alınan fotometrik ölçüm sonuçları ile çizilir.

Standart Adı	Konsantrasyon (ng/ml)						İçerik
	VIM	Ape1/ Ref1	BLCA 4	NMP2 2	CRK	Cr	
S	64	12,8	72	80	16	2,4	Orijinal Standart solüsyon
S5	32	6,4	36	40	8	1,2	120 µl S + 120 µl Standart Dilüent
S4	16	3,2	18	20	4	0,6	120 µl S5 + 120 µl Standart Dilüent
S3	8	1,6	9	10	2	0,3	120 µl S4 + 120 µl Standart Dilüent
S3	4	0,8	4,5	5	1	0,15	120 µl S3 + 120 µl Standart Dilüent
S1	2	0,4	2,25	2,5	0,5	0,075	120 µl S2 + 120 µl Standart Dilüent

Elisa deneyleri sonucu elde edilen üriner protein konsantrasyonları, bireyin dehidrate olması gibi fizyolojik durumları dışlamak için kreatinine göre normalize edilerek bildirilmiştir. (Tang, Toh, ve Teo, 2015).

9.9.İstatistiksel Analiz

Protein ve mikro RNA ekspresyonları incelendikten sonra gruplar arası istatistiksel analizler SPSS, GraphPad, MedCalc programları kullanılarak yapılmıştır. Değerlerin normal dağılıma uygunluklarının analizi Shapiro-Wilk testi ile analiz edilmiştir. Normal dağılıma uygun olmayan değerler için non parametrik, normal dağılım gösteren değerler için parametrik analiz yöntemleri kullanılıp, istatistiksel farkın anlamlılık düzeyinin değerlendirilmesinde $p \leq 0,05$ sınır değeri kullanılmıştır.

Hasta, kontrol ve takip hastası grubunda ekspresyonu olmayan örnek sayısı fazla olan miRNA'lar için ekspresyon miktarının yanı sıra ekspresyon varlığı-yokluğu durumu da incelenmiştir. Var-yok incelemelerinde χ^2 testi ve Fisher'ın kesinlik testi (Fisher's exact test) kullanılmıştır. RT-PZR deneylerinde istatistiksel değerlendirmeler ΔC_t değerleri ile yapılarak anlamlı fark gözlenmesi durumunda ekspresyon $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri kullanılarak ifade edilmiştir.

Normal dağılıma uygun olmayan niceliksel ölçümlerin gruplar arasındaki dağılımının incelenmesinde Mann Whitney U testi, 3'ten fazla ve normal dağılıma uymayan grupta ortancaların incelenmesinde Kruskal Wallis H testi, normal dağılım gösteren gruplarda dağılımların incelenmesinde ANNOVA testi, normal dağılıma uygun 2'li gruplarda niceliksel değerlerin incelenmesinde T testi kullanılmıştır.

Tanısal değer araştırılmasında duyarlılık ve özgüllük belirlemeleri için ROC eğrileri kullanılmıştır. Tanısal panel belirlenmesinde lojistik regresyon analizleri yapılarak yine panel için ROC eğrisi çizilerek duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplanmıştır. Lojistik regresyon modelinin veriye uyumu Hosmer ve Lemeshow testi ile incelenmiştir, sonucun 0,05 değerinden büyük olması model ve veri arası uyumun yeterli seviyede olduğunu göstermektedir (Çokluk, 2010).

10. BULGULAR

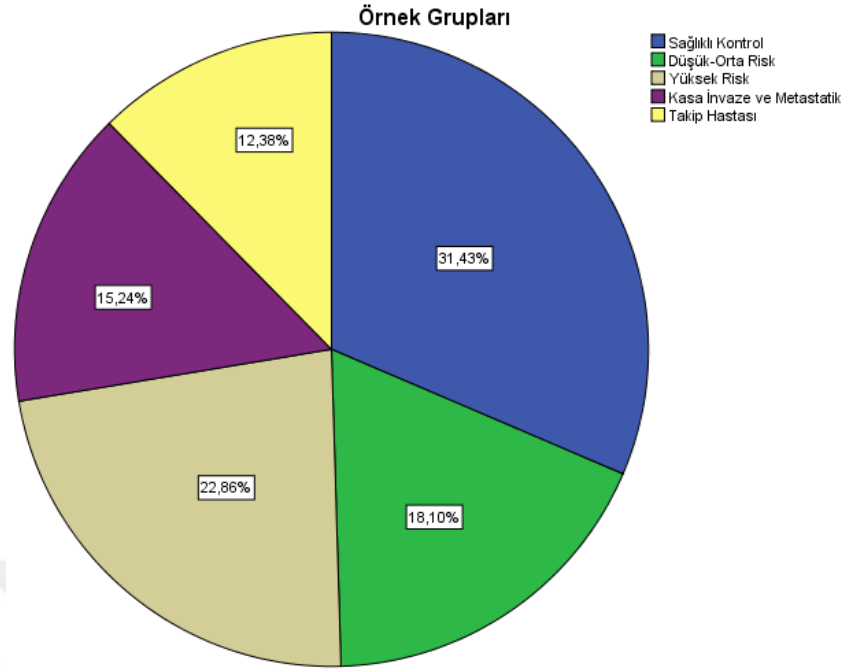
10.1. Örnek Gruplarının Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmaya toplam 105 birey dahil edilmiştir. Bunlardan 59'u mesane kanseri hastası, 34'ü sağlıklı kontrol ve 12'si takip hastasıdır. Hastaların yaş dağılımları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen bireylerin yaş dağılımları.

	Sayı	Yaş			
		Minimum	Maksimum	Ortalama	St. Hata
Sağlıklı Kontrol	34	25,00	87,00	53,41	2,68
Mesane Kanser	59	37,00	87,00	66,04	1,53
Düşük- Orta Risk	19	37	87	66,21	3,36
Yüksek Risk	24	43,00	85,00	67,83	2,18
Kasa İnvaze- Metastatik	16	49,00	79,00	63,12	2,34
Takip Hastası	12	48,00	80,00	70,92	2,18

Biyobelirteçlerde anlam aranması aşamasında örnekler risk gruplarına ayrılarak değerlendirme yapılmıştır. Risk gruplarının dağılımı tabloda özetlenmiştir ayrıca pasta grafikte de görsel olarak netleştirilmiştir (Şekil 8, Tablo 9).



Şekil 8: Çalışmaya dahil edilen grupların dağılım yüzdeleri.

Mesane kanseri hastaları risk gruplarının yanısıra tümörün primer ve nüks olmasına göre de sınıflandırılmıştır. Buna göre 59 mesane kanseri hastasının 42'si primer tümöre sahipken 17'si nüks hastasıdır. Hasta sayılarının dağılımı benzer olmakla birlikte primer tümörlerde invazif metastatik hastalık yüzdesi daha fazladır.

Tablo 9: Primer tümörlü ve nüks hastalarının risk grubu dağılımları.

		Sayı	%
Primer Tümör	Düşük-Orta Risk	12	28,6
	Yüksek Risk	16	38,1
	Kasa İnvaze ve Metastatik	14	33,3
	Toplam	42	100,0
Nüks	Düşük-Orta Risk	7	41,2
	Yüksek Risk	8	47,1
	Kasa İnvaze ve Metastatik	2	11,8
	Toplam	17	100,0

10.2. İdrar Örneklerinden Ekzozomal RNA İzolasyon Sonuçları

Ekzozomal RNA izolasyonu sonucu elde edilen total RNA miktarı 100-800 ng aralığında olmalıdır. Elde edilen konsantrasyonlar 3-6 ng/ μ l aralığındadır ve son hacim 80 μ l'dir. Böylelikle elde edilen total RNA miktarı 250-500 ng aralığında olup kitin kabul edilebilir sınırları içerisinde ve ileriki deneyler için uygundur.

10.3. Real-Time PZR Sonuçları

Real-Time PZR deneyleri sonucu elde edilen ortalama Ct değerleri Tablo 9'da listelenmiştir. Bu değerler rölatif kantitasyonda kullanılacak olup, tüm reaksiyonlar duplike yapılmış ve hesaplama aşamasında elde edilen 2 değerın ortalaması alınmıştır. Ct değeri belirtilmemiş örneklerde amplifikasyon olmamıştır. Tablo 11'de Δ Ct değerleri yer almaktadır, tüm Δ Ct değerleri RNU48 ve U6 house keeping genleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 10: miRNA ekspresyon deneylerinde elde edilen ortalama Ct değerleri.

H: Mesane Kanseri Hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: Takip Hastası

Ömek \ miRNA	miR-136-3p	miR-210-3p	miR-21-5p	miR-139-5p	miR-19b1-5p	miR-16-5p	RNU48	U6
H1		30,90	29,07			26,06	30,60	24,82
H2		32,86	26,14	38,585	35,78	21,94	32,08	31,46
H3	38,3	34,05	29,40			28,4	32,08	29,59
H5	35,355	25,59	19,96	32,64	31,965	17,22	24,58	20,93
H7	35,79	33,04	27,32		40	28,1	32,39	26,66
H8	36,03	21,96	18,655	33,64	32,255	18,99	22,38	20,59
H9	37,12	26,88	20,56	35,96	34,56	16,82	30,29	25,01
H10		35,53	26,915	40		26,95	29,54	24,01
H12		35,24	25,485			25,46	26,24	21,07
H13		33,23	21,9	35,21	35,955	21,3	26,83	21,24
H14			27,72			30,15	29,04	25,79
H16		37,06	27,43			24,47	28,77	23,16
H19			27,3	36		26,26	29,46	24,06
H20			27,735			31,9	28,19	23,48
H21			30,22			30,3	32,29	26,45
H22		33,46	26,92			25,77	31,58	31,71
H23	36	28,24	22,715	36	35,505	19,07	30,71	27,31
H24	36	23,1	17,35	32,65	32,03	18,12	23,72	19,85
H25		32,32	29,125			28,29	29,41	24,68
H26		31,01	24,985	36	36	24,75	33,39	28,78
H27	31,79	26,67	19,07	32,22	33,01	15,15	24,87	28,76
H28	36,21	35,18	28,14	39		27,34	28,52	23,15
H29		25,64	23,02	34,37	33,83	21,59	24,67	20,46
H31		32,64	22,74	38	38	25,1	28,51	28,31
H32	36,49	30,54	24,16	38		24,33	30,83	26,94
H33		31,92	24,937		40	23,09	29,61	25,91
H34	35,93	26,2	20,27	32,08	33,69	16,33	24,75	28,52
H37		27,29	21,3	36,04	35,21	19,93	26,64	22,81
H38		26,79	22,5	38	34,765	22,56	25,99	24,67
H39		32,93	26,71			26,75	31,25	30,29
H40		29,3	22,2	36,0	34	23,56	28,86	28,52
H41		30,2	22,835	36,19	34,255	22,08	23,23	20,29
H42	34,02	26,52	21,38	35,92	33,13	19,11	27,7	26,57
H43		28,15	22,99	34,08	35,98	20,47	20,95	17,8
H44	32,31	23,11	19,75	30,93	32,45	20,7	23,91	25,47
H45	38,63	30,07	24,41	37,89		22,37	29,82	29,64
H46		27,6	24,65	35,72	37,73	23,39	23,93	21,64

Tablo 10: miRNA ekspresyon deneylerinde elde edilen ortalama Ct değerleri. (devam)

H: Mesane Kanseri Hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: Takip Hastası

miRNA Örnek	miR-136- 3p	miR-210- 3p	miR-21- 5p	miR-139- 5p	miR-19b1- 5p	miR-16-5p	RNU48	U6
H47		26,71	20,26	35,07	32,66	19,02	27,18	26,56
H48	30,25	22,9	16,66	29,91	28,42	13,37	25,75	23,36
H49	34,4	22,81	22,32	34,77	35,52	23,55	23,94	20,77
H50	35,5	27,11	19,5	38,5	33,25	19,32	27,21	27,86
H51	35,09	29,34	22,77			24,6	28,91	27,08
H52	36,53	26,66	22,22	39,65	33,98	22,13	26,03	26,15
H54		31,15	26,37		33,98	26,66	25,96	20,35
H55	33,84	25,2	18,94	32,66	30,86	18,06	28,17	22,85
H56		33,1	26,56			27,16	29,72	25,55
H58		36,16	29,98			32,19	34,47	28,02
H59	38	21,94	19,11	30,81	31,38	18,2	25,53	20,29
H60		26,45	21,24	38	34,12	22,92	28,49	22,94
H61	32,32	25,17	18,51	36,1	31,56	18,92	27,06	22,47
H63	32,98	23,62	18,33	33,85		18,25	26,88	23,19
H64	35,83	22,63	18,08	31,28		16,17	23,2	21,22
H65		32,74	25,22	37		26,04	32,44	29,58
H66	37	32,2	25,1			25,04	31,87	28,32
H67		28,66	24,72			25,85	29,8	25,5
H68		28,87	26,17	37		21,57	23,23	17,64
H70		27,61	23,1	35,4		22,48	25,24	20,85
H71		24,82	21,05	35,56		19,37	24,64	19,57
H72		27,98	22,5	37		24,36	26,71	22,14
H73	35,55	27,29	19,86	36,35	33,13	19,84	24,59	28,26
H74			33,23			31,76	25,51	20,1
H74			33,23			31,76	25,51	20,1
S1		30,01	24,71	38		23,93	23,79	18,47
S2	36,34	27,86	22,08	38	35,735	23,39	28,12	28,64
S3		33,03	27,64			28,62	35,08	31,04
S4		30,63	25,16		37,42	26,16	33,5	30,39
S5		31,03	25,03	38	36,06	24,36	29,51	28,19
S6	38	34,48	28,28			28,63	34,15	30,79
S7		31,05	24,1	38	35,02	24,57	32,52	31,16
S8	34,65	27,17	20,94	34,09	34,09	20,22	24,76	26,46
S9		32,49	25,61			24,3	29,25	28,11
S10		32,64	26,27			27,78	28,09	24,01
S11		31,06	26,55	37	35,64	24,6	27,72	24,20
S12		32,92	27,77	37	34,26	25,09	27,04	21,87

Tablo 10: miRNA ekspresyon deneylerinde elde edilen ortalama Ct değerleri. (devam)

H: Mesane Kanseri Hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: Takip Hastası

S13		30,72	25,82	37		23,64	26,19	21,74
S14		32,5	27,215	38,24	36,955	26,13	26,56	21,5
S15		31,16	23,91		35,42	25,58	28,3	23,07
S16		32,02	28,57			26,61	30,59	27,15
S17		30,23	24,64	37	37	24,37	29,97	24,2
S18		33,79	28,81		35,28	29,3	33,48	30,67
S19	32,02	24,49	18,1	26,99	30,7	13,75	22,35	19,88
S20		28,86	22,71	35,14	37	19,67	23,74	22,59
S21		32,87	25,79	37		28,95	28,21	23,15
S22		31,67	26,26	37		23,2	24,99	25,24
S23		37	30,12			28,23	37	32,55
S24		31,53	24,09			25,86	28,66	24,52
S25	28,56	23,68	17,36	28,72	29,76	12,5	21,57	22,65
S26		34,96	28,55			29,14	35,12	29,83
S27	36,5	27,28	22,14		34,27	22,37	28,18	23,69
S28		33,31	24,54			24,83	31,19	25,97
S29		30,88	20,98			21,03	27,75	21,78
S30			37			35,24	27,63	22,49
S31		31,12	23,18		36,05	23,74	27,32	23,09
S32		31,675	26,80	38,5	37,74	27,78	31,60	25,94
S33	38	25,72	16,1	33,49	32,06	18,92	29,72	24,87
S34	35,54	30,83	22,9			24,93	27,45	23,26
T3	36,25	31,3	24,77	36,62		25,49	29,5	24,23
T4	35,6	28,31	20,74	34,12	40	22,75	27,76	25,68
T5	37,33	29,44	22,38			24,34	29,84	26,2
T11	35,53	31,5	25,14			26,58	25,59	19,91
T12		28,91	24,56	35,63	34,8	23,84	26,63	20,51
T14		28,3	19,65	36,58	35,18	19,28	27,31	29,87
T15		29,81	22,65	36,9		23,2	27,14	21,76
T16		32,66	29,14			30,08	30,09	25,51
T17		32,46	27,6			28,64	28,51	25,57
T18		30,59	22,39	36,42		24,01	29,09	30,64
T19		35,225	26,65			32,69	31,35	25,09
T20	35,09	28,46	21,86	32,86	34,85	21,91	30,34	25,08

Tablo 11: miRNA ekspresyon deneylerinde elde edilen ΔCt değerleri

H: Mesane Kanseri Hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: Takip Hastası

Örnek	ΔCt miR-136-3p	ΔCt miR-210-3p	ΔCt miR-21	ΔCt miR-139-5p	ΔCt miR-19
H1		3,74	1,91		
H2		4,36	-2,36	10,09	7,29
H3	8,28	4,03	-0,62		
H5	14,45	4,68	-0,96	11,73	11,06
H7	6,74	3,99	-1,73		10,95
H8	15,38	1,31	-2,00	12,99	11,60
H9	13,08	2,84	-3,48	11,92	10,52
H10		8,70	0,08	13,17	
T19		5,51	-3,06		
H12		10,99	1,23		
H13		10,11	-1,22	12,09	12,83
H14			-0,61		
H15		6,76	3,06		
H16		11,59	1,97		
H18			-2,92		
H19			0,71	9,41	
H20			-0,12		
H21			0,54		
H22		3,78	-2,77		
H23	10,30	2,55	-2,98	10,30	9,81
H24	15,44	2,54	-3,22	12,09	11,47
H25		4,86	1,66		
H26		2,04	-3,99	7,03	7,03
H27	8,86	3,75	-3,86	9,29	10,08
H28	9,87	8,85	1,80	12,66	
H29		3,40	0,78	12,14	11,59
H30	9,47	4,08	-2,85	10,44	10,39
H31		5,33	-4,57	10,69	10,69
H32	9,12	3,18	-3,21	10,63	
H33		5,72	-1,27		13,80
H34	12,73	3,00	-2,93	8,88	10,49
H37		4,16	-1,83	12,91	12,08
H38		2,39	-1,91	13,59	10,36
H39		3,50	-2,72		
H40		2,33	-4,78	9,05	7,02
H41		8,33	0,97	14,32	12,39
H42	9,56	2,06	-3,08	11,46	8,67
H43		8,41	3,25	14,34	16,24

Tablo 11: miRNA'lara ait Δ Ct değerleri (devam)

H: Mesane Kanseri Hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: Takip Hastası

Örnek	Δ ct miR-136-3p	Δ ct miR-210-3p	Δ ct miR- 21	Δ ct miR-139-5p	Δ ct miR-19
H44	8,95	-0,25	-3,61	7,57	9,09
H45	11,35	2,79	-2,87	10,61	
H46		4,61	1,66	12,73	14,74
H47		2,46	-3,99	10,82	8,41
H48	9,42	2,07	-4,17	9,08	7,59
H49	11,65	0,06	-0,43	12,02	12,77
H50	10,70	2,31	-5,30	13,70	8,45
H51	8,23	2,48	-4,09		
H52	11,76	1,89	-2,55	14,88	9,21
H54		6,83	2,05		9,66
H55	10,81	2,17	-4,09	9,63	7,83
H56		5,62	-0,92		
H57		3,05	-3,29	9,80	
H58		4,60	-1,58		
H59	16,66	0,60	-2,23	9,47	10,04
H60		1,67	-3,54	13,22	9,34
H61	9,50	2,35	-4,31	13,28	8,74
H63	10,21	0,85	-4,44	11,08	
H64	15,63	2,43	-2,12	11,08	
H65		3,39	-4,13	7,65	
H66	8,59	3,79	-3,31		
H67		1,61	-2,33		
H68		8,06	5,36	16,19	
H69	5,14	1,36	-5,76		
H70		4,75	0,24	12,54	
H71		3,63	-0,14	14,37	
H72		3,58	-1,90	12,60	
H73	11,32	3,06	-4,37	12,12	8,90
H74			7,44		
S1		7,95	2,65	15,94	
S2	9,62	1,14	-4,64	11,28	9,02
S3		1,45	-3,94		
S4		0,61	-4,86		7,40
S5		3,68	-2,32	10,65	8,71
S6	6,81	3,29	-2,91		
S7		1,63	-5,32	8,58	5,60
S8	10,84	3,36	-2,87	10,28	10,28
S9		5,27	-1,61		

Tablo 11: miRNA'lara ait Δ Ct değerleri (devam)

H: Mesane Kanseri Hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: Takip Hastası

Ömek	Δ ct miR-136-3p	Δ ct miR-210-3p	Δ ct miR-21	Δ ct miR-139-5p	Δ ct miR-19
S10		6,01	-0,36		
S11		5,55	1,04	11,49	10,13
S12		8,25	3,10	12,33	9,59
S13		6,86	1,96	13,14	
S14		7,77	2,49	13,51	12,23
S15		5,51	-1,74		9,77
S16		3,90	0,45		
S17		4,05	-1,54	10,82	10,82
S18		2,64	-2,34		4,13
S19	13,36	5,83	-0,56	8,33	12,04
S20		6,86	0,71	13,14	15,00
S21		6,10	-0,98	10,23	
S22		7,19	1,78	12,52	
S23		4,41	-2,47		
S24		5,18	-2,26		
S25	9,65	4,77	-1,55	9,81	10,85
S26		3,60	-2,81		
S27	11,75	2,53	-2,61		9,52
S28		5,98	-2,79		
S29		7,36	-2,54		
S30			8,55		
S31		6,40	-1,54		11,33
S32		3,23	-1,65	10,06	9,30
S33	13,50	1,22	-8,40	8,99	7,56
S34	10,33	5,62	-2,31		
T3	9,84	4,89	-1,64	10,21	
T4	10,20	2,91	-4,66	8,72	14,60
T5	10,54	2,65	-4,41		
T11	11,50	7,47	1,11		
T12		5,25	0,90	11,97	11,14
T14		2,81	-5,84	11,09	9,69
T15		5,78	-1,38	12,87	
T16		4,10	0,58		
T17		4,89	0,03		
T18		2,68	-5,52	8,51	
T20	9,31	2,68	-3,92	7,08	9,07

10.3.1. miR-136-3p Ekspresyonlarının Analizi

Hasta, kontrol ve takip hastası grubunda miR-136-3p ekspresyonu olmayan örnek sayısı hayli fazla olduğundan miR-136-3p ekspresyonunun mesane kanseri hastalarında kontrole göre ne ölçüde değişim gösterdiğinin incelenmesinde 4 gözlü tablo kullanılmıştır. Hasta, kontrol ve takip grubunda miR-136-3p ekspresyonu olan ve olmayan hasta sayısı Tablo 12’de belirtilmiştir.

Tablo 12: Mesane kanseri hastaları, takip hastaları ve kontrol grubunda miR-136-3p eksprese eden ve etmeyen hasta sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.

Örnek	miR-136-3p Ekspresyonu						Toplam
	Var			Yok			
	Gözlenen		Beklenen	Gözlenen		Beklenen	
	Sayı	%		Sayı	%		
Sağlıklı Kontrol	8	23,5	12,6	26	76,5	21,4	34
Mesane Kanseri	26	44,1	21,9	33	55,9	37,1	59
Takip Hastası	5	41,7	4,5	7	58,3	7,5	12
Toplam	39			66			105
							p=0,134

Mesane kanseri hastaları ve kontrol grubunda mir-136-3p varlığı açısından herhangi bir fark gözlenmemiştir ($p=0,134$). Mesane kanseri, sağlıklı kontrol ve takip hastası grubunda ekspresyon varlığının kıyaslanması χ^2 analizi ile yapılmıştır ve gruplar arasında dağılım farkı olmadığı gözlenmiştir. Gözlenen ve beklenen değerler Tablo 12’de belirtilmiştir.

Mesane kanseri risk grupları açısından miR-136-3p varlığı değerlendirildiğinde ekspresyon gözlenen ve gözlenmeyen hastaların dağılımı aşağıdaki tablodaki gibidir (Tablo 13, Şekil 8). Tablonun istatistiksel değerlendirmesi yapıldığında kasa invaze metastatik hasta grubu ile sağlıklı kontroller arasındaki dağılım farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p=0,0117$). Buna göre kasa invaze metastatik mesane kanseri hastaları sağlıklı kontrollere göre daha yüksek oranda miR-136-3p eksprese etme eğilimindedir. Hasta grupları ve sağlıklı kontrollerdeki genel dağılımın tesadüf eseri olup olmadığının anlaşılması için örnek gruplarında miR-13-3p eksprese eden

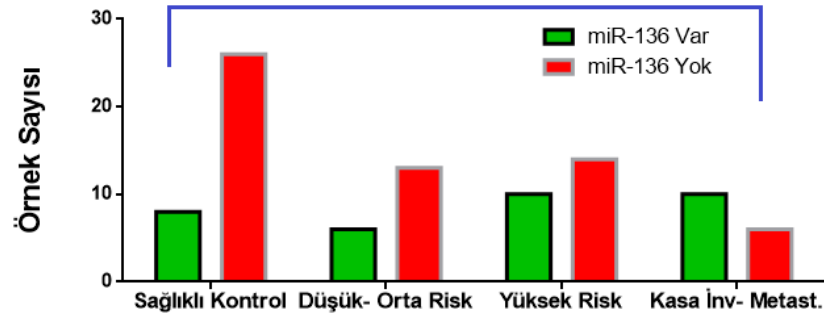
ve etmeyen sayılarının trendi incelenmiştir. Bunun için “trend için χ^2 kare testi (Chi square for trend)” yöntemi kullanılmıştır. Trend eğrisi Şekil 9’da belirtilmiştir, anlamlılık düzeyi ise $p=0,0073$ olarak hesaplanmıştır yani örnek grupları arasında kontrolden; kasa invaze mesastatik mesane kanserine doğru gidildikçe miR-136-3p eksprese eden örneklerin yüzdesi artmaktadır ve bu durum rastlantısal değildir.

Örnek	miR-136-3p Ekspresyonu						
	Var			Yok			
	Gözlenen		Beklenen	Gözlenen		Beklenen	Toplam
	Sayı	%		Sayı	%		
Kontrol	8	23,5	12,6	26	76,5	21,4	34
Düşük- Orta Risk	6	31,6	7,1	13	68,4	11,9	19
Yüksek Risk	10	41,7	8,9	14	58,3	15,1	24
Kasa İnvaze - Metastatik	10	62,5	5,9	6	37,5	10,1	16
Toplam	33			60			

Kasa invaze- metastatik hasta grubu ile sağlıklı kontroller arası p=0,0117

Kasa invaze- metastatik hasta grubu ile sağlıklı kontroller arası $p=0,0117$

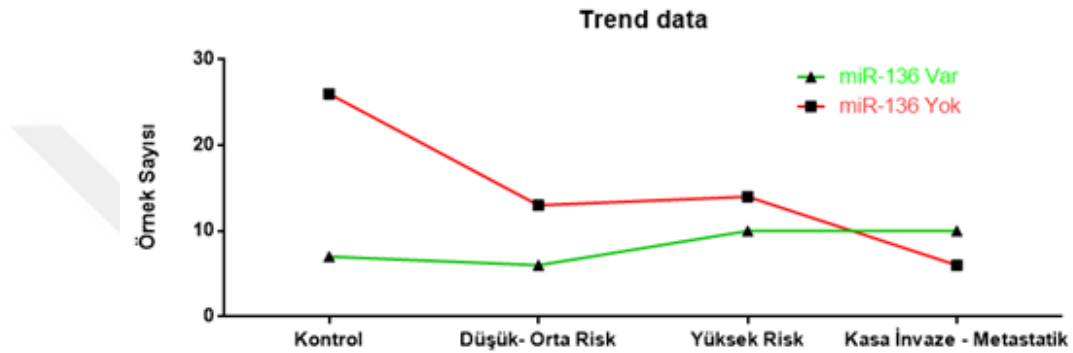
Tablo 13: Mesane kanseri risk gruplarında miR-136-3p eksprese eden ve etmeyen hasta sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.



Şekil 9: Sağlıklı kontroller ve mesane kanseri risk gruplarında mir-136-3p eksprese eden ve etmeyen örnek sayıları.

Primer tümörü olan hastalar ve nüks hastaları miR-136-3p eksprese edip etmemesi açısından incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir 42 primer tümör hastasının 21’inde miR-136-3p ekspresyonu gözlenirken 21’inde gözlenmemiştir, 17 nüks hastasının ise 12’sinde miR-136-3p ekspresyonu gözlenmezken 5’inde gözlenmiştir. Oranlar farklı olmasına rağmen bu

farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Tablo 14). Aynı değerlendirme ΔCt değerleri kullanılarak ekspresyon düzeyi açısından yapıldığında yine gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. miR-136-3p eksprese eden ve etmeyen hastaların yaşa göre dağılımı değerlendirilmiş ve yaş ile ekspresyon durumu arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir. Bireylerin yaşı ile miR-136-3p ekspresyon miktarı arasındaki ilişki Pearson korelasyonu ile incelenmiştir miR-136-3p ΔCt değerinin yaş ile herhangi bir ilişkisi olmadığı belirlenmiştir ($p=0,547$).



Şekil 10: Sağlıklı kontroller ve mesane kanseri risk gruplarında miR-136-3p ekspresyonu trend eğrisi

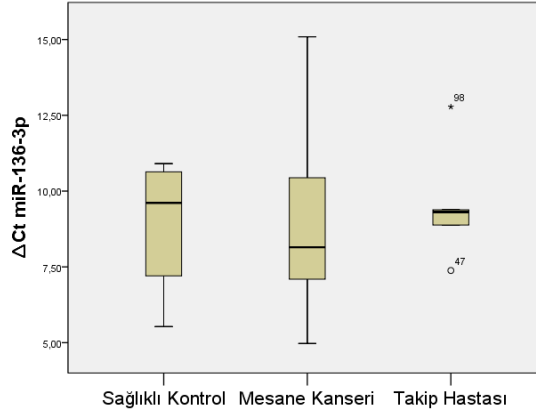
Tablo 14: Primer tümör ve nüks hastalarında miR-136-3p eksprese eden ve etmeyen hasta sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.

Örnek	miR-136-3p Ekspresyonu						Toplam
	Var			Yok			
	Gözlenen		Beklenen	Gözlenen		Beklenen	
	Sayı	%		Sayı	%		
Primer Tümör	21	50	18,5	21	50	23,5	42
Nüks	5	29,4	7,5	12	70,6	9,5	17
Toplam	26			33			59

$p>0,05$

miR-136-3p ekspresyonu gözlenen hasta örnekleri, kontroller ve takip örneklerinde ekspresyon farkının anlamlı olup olmadığının incelenmesi için ekspresyon gözlenen örneklerin ΔCt değerleri hesaplandı. ΔCt değerleri hesaplanırken RNU48 ve U6 housekeeping kontrol olarak kullanıldı. Buna göre sağlıklı kontrol ve takip hastalarının miR-136-3p ΔCt değerleri normal dağılıma uygunken, mesane kanseri hastalarının ΔCt değerlerinin normal dağılıma uygun

olmadığı gözlemlendi. Bu sebeple gruplar arası fark parametrik olmayan yöntemlerden Kruskal Wallis testi ile incelendi. Gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Kontrol grubu, mesane kanseri hastaları ve takip örneklerindeki miR-136-3p ΔCt değerleri Şekil 11’de gösterilmiştir.



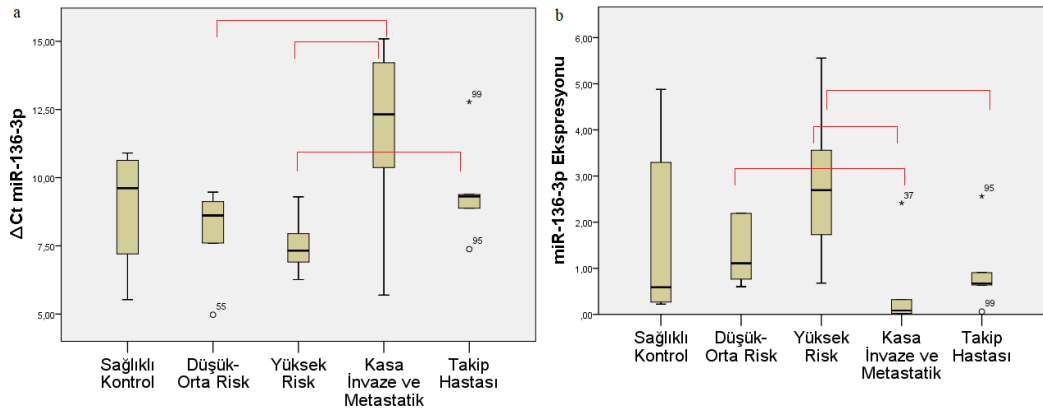
Şekil 11: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarının miR-136-3p ΔCt değerleri.

Mesane kanseri risk gruplarında kontrole göre miR-136-3p ekspresyonunda anlamlı bir fark olup olmadığının incelenmesi için öncelikle grupların ΔCt miR-136-3p değerinin normal dağılıma uygun olup olmadığı incelenmiştir. Sağlıklı kontroller, düşük-orta risk grubu, yüksek risk grubu ve metastatik- kasa invaze gruplarının tümünün ΔCt değerinin normal dağılıma uyduğu gözlenmiştir, grupların ortalama ΔCt değerinin grup içi dağılımının anlamlı düzeyde fark gösterip göstermediği ANNOVA testi ile incelenmiş gruplar arasında anlamlı fark olduğu gözlenmiştir ($p=0,002$). Grupların 2’li olarak T- testi ile incelenmesi sonucunda kasa invaze ve metastatik grubun ortalama ΔCt değerinin, düşük orta risk grubundan ve yüksek risk grubundan yüksek olduğu, yüksek risk grubu hastalarının ortalama ΔCt değerinin ise takip hastalarından düşük olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla; $p=0,023$; $p=0,002$; $p=0,011$, Tablo 15). miR-136-3p ΔCt değerlerinde istatistiksel fark gözlenen grupların ekspresyonlarının değerlendirilmesinde $2^{-\Delta Ct}$ değeri hesaplanarak ekspresyonun kat olarak değişimi belirlenmiştir. Ekspresyon değerleri normal dağılıma uymadığından grupların ortanca değerleri incelenmiştir. Grupların ΔCt ve ekspresyon değerleri Şekil 12’de gösterilmiştir.

Tablo 15 : Mesane kanseri risk grupları, kontrol grubu ve takip hastalarında anlamlı fark gözlenen miR-136-3p Δ Ct değerleri ve ekspresyonlar

S.H:Standart hata, S.s: Standart Sapma, Ç.a: Çeyrekler açıklığı.

Örnek		Sayı	Ortalama	S.H	Örnek	Sayı	Ortalama	S.H	p
Düşük-Orta Risk	Δ Ct	6	8,07	0,67	Kasa invaze ve metastatik	10	11,61	0,99	0,023
	Ortanca	S.s.	Ç.a			Ortanca	S.s.	Ç.a	
Ekspresyon	1,11	5,11	4,32		Ekspresyon	,085	2,59	0,82	
Yüksek Risk	Δ Ct	10	7,45	0,26	Kasa invaze ve metastatik	10	11,61	0,99	0,002
	Ortanca	S.s.	Ç.a			Ortanca	S.s.	Ç.a	
Ekspresyon	2,69	1,36	1,85		Ekspresyon	,085	2,59	0,82	
Yüksek Risk	Δ Ct	10	7,45	0,26	Takip Hastası	5	9,55	0,885	0,011
	Ortanca	S.s.	Ç.a			Ortanca	S.s.	Ç.a	
Ekspresyon	2,694	1,36	1,85		Ekspresyon	,67	,94	1,38	
Sağlıklı Kontrol	Δ Ct	8	8,91	0,73	Sağlıklı kontrollerle herhangi bir hasta grubu arasında anlamlı ekspresyon farkı gözlenmemiştir.				
Ekspresyon	0,5883	3,24	3,82						



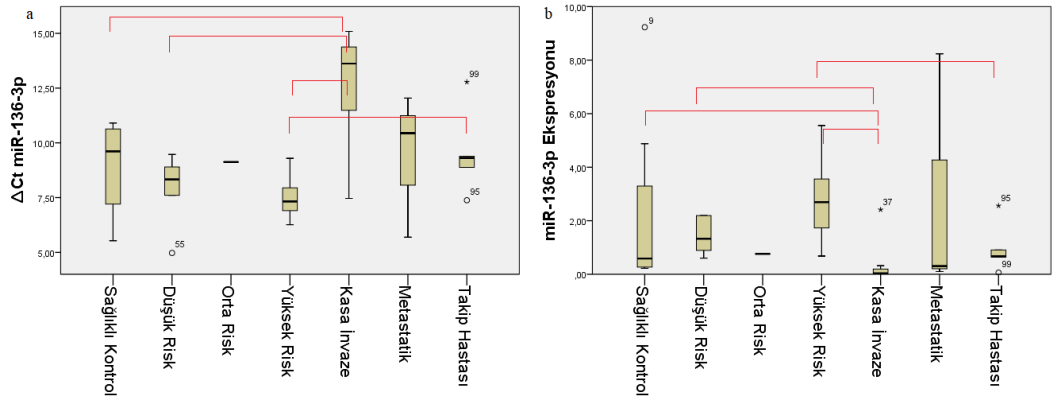
Şekil 12: Mesane kanseri risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarının miR-136-3p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.

Mesane kanseri alt risk grupları arasında miR-136-3p Δ Ct değerleri incelenmiş, değerlerin normal dağılıma uygun oldukları belirlenmiştir. Bu sebeple Δ Ct

değerleri arasındaki fark T testi ile incelenmiş, ancak ekspresyonlar normal dağılıma uygun olmadığından farkın ekspresyon cinsinden ifadesinde ortancalar kullanılmıştır. T testi çözümlmeleri kontrol grubu ile kas invazyonu gözlenen grup arasında ($p=0,029$), düşük risk hasta grubu ile kasa invaze hasta grubu arasında ($p=0,030$), yüksek risk hasta grubu ile kasa invaze grup arasında ($p=0,03$), yüksek risk grubu ile takip hastaları arasında ($p=0,019$) anlamlı fark olduğunu göstermiştir. Ekspresyonlar açısından bakıldığında sağlıklı kontrollerin miR-136-3p ekspresyonu, kas invazyonu gözlenen grubun yaklaşık 17 katı, düşük risk hasta grubunun miR-136-3p ekspresyonu, kas invazyonu gözlenen grubun yaklaşık 39 katı, yüksek risk hasta grubunun miR-136-3p ekspresyonu, kas invazyonu gözlenen grubun yaklaşık 79 katıdır. Yüksek risk grubu hastaların ekspresyonu ise takip hastalarının yaklaşık 4 katı kadardır. ΔCt ve ekspresyonlara ilişkin sayısal veriler tablo 16’da, ekspresyon ve ΔCt grafikleri ise şekil 13’te gösterilmiştir.

Tablo 16: Mesane kanseri alt risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında anlamlı fark gözlenen ΔCt değerleri ve ekspresyonlar.

Örnek		Sayı	Ort.	S.H	Örnek	Sayı	Ortalama	S.H	p
Sağlıklı Kontroller	ΔCt	8	8,92	0,73	Kasa invaze	7	12,56	1,03	0,029
	Ortanca	S.s.	Ç.a			Ortanca	S.s.	Ç.a	
Ekspresyon	0,59	3,24	3,82		Ekspresyon	,034	0,89	0,30	
Düşük Risk	ΔCt	5	7,86	0,78	Kasa invaze	7	12,56	1,03	0,030
	Ortanca	S.s.	Ç.a			Ortanca	S.s.	Ç.a	
Ekspresyon	1,32	5,55	7,14		Ekspresyon	,034	0,89	0,30	
Yüksek Risk	ΔCt	10	7,45	0,26	Kasa invaze	7	12,56	1,03	0,002
	Ortanca	S.s.	Ç.a			Ortanca	S.s.	Ç.a	
Ekspresyon	2,694	1,36	1,85		Ekspresyon	,034	0,89	0,30	
Yüksek Risk	ΔCt	10	7,45	0,26	Takip Hastası	5	9,55	0,885	0,019
	Ortanca	S.s.	Ç.a			Ortanca	S.s.	Ç.a	
Ekspresyon	2,694	1,36	1,85		Ekspresyon	,67	,94	1,38	



Şekil 13: Mesane kanseri alt risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarının miR-136-3p ΔC_t (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.

10.3.2. miR-210-3p Ekspresyonlarının Analizi

Toplam 59 mesane kanseri hastası, 34 sağlıklı kontrol ve 12 takip hastasına ait üriner ekzozomda miR-210-3p ekspresyonu incelenmiştir. Tekrarlara rağmen 4 hasta ve 1 kontrolde ekspresyon saptanamamıştır. Buna göre miR-210-3p eksprese eden 55 hasta, 33 kontrol ve 12 takip hastası vardır (Tablo 17) ve bu dağılım istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo 17: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarında miR-210-3p eksprese eden ve etmeyen örnek sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.

Örnek	miR-210-3p Ekspresyonu						Toplam
	Var			Yok			
	Gözlenen		Beklenen	Gözlenen		Beklenen	
	Sayı	%		Sayı	%		
Sağlıklı Kontrol	33	97,1	32,4	1	2,9	1,6	34
Mesane Kanseri	55	93,2	56,2	4	6,8	2,8	59
Takip Hastası	12	100	11,4	0	0	0,6	12
Toplam							
p>0,05							

Mesane kanseri risk gruplarının miR-210-3p eksprese edip etmediği incelendiğinde gruplar arası fark gözlenmemiştir.

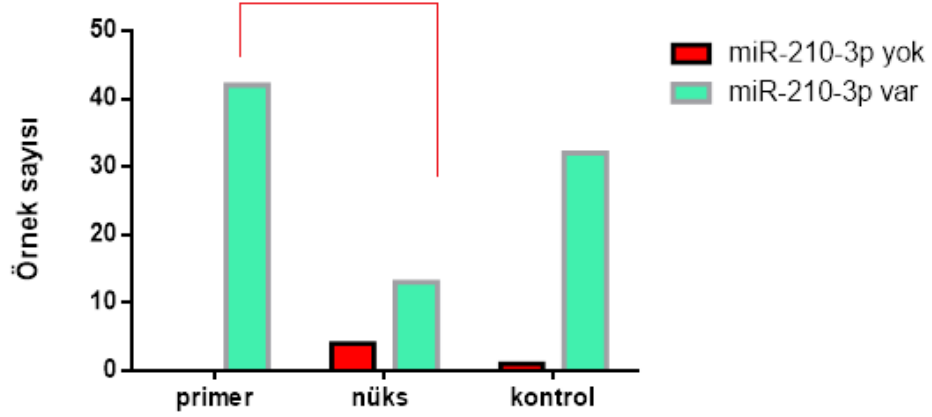
Primer tümör, nüks hastaları ve sağlıklı kontroller arasında miR-210-3p eksprese edip etmemeleri açısından fark olup olmadığı incelendiğinde primer tümörü olan hastalarda miR-210-3p eksprese den örnek yüzdesinin, nüks hastalarından fazla olduğu gözlenmiştir (p=0,0052, Tablo 18 ve Şekil 14). Nüks hastalarıyla kontrol örnekleri arasında ve primer tümörler ile kontroller arasında anlamlı bir fark

gözlenmemiştir. Örneklerin yaşı ile ekspresyon varlığı arasında zayıf bir korelasyon gözlemlendiyse de örnek sayısı hayli az olduğundan bu durum dikkate alınmamıştır.

Tablo 18: Primer tümör, nüks hastaları ve kontrol grubunda miR-210-3p eksprese eden ve etmeyen örnek sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.

Örnek	miR-210-3p Ekspresyonu						
	Var			Yok			
	Gözlenen		Beklenen	Gözlenen		Beklenen	Toplam
	Sayı	%		Sayı	%		
Primer Tümör	42	100	39,7	0	0	2,3	42
Nüks	13	76,5	16,1	4	23,5	0,9	17
Sağlıklı Kontrol	33	97,1	32,4	1	2,9	1,6	34
Toplam	88			5			93
Primer tümör ve nüks hastaları arasında p=0,0052							

Primer tümör ve nüks hastaları arasında $p=0,0052$



Şekil 14: Primer tümörü olan hastalar, nüks hastaları ve sağlıklı kontrollerin miR-210-3p eksprese eden ve etmeyen örnek sayıları.

Ct değeri elde edilen toplam 100 örneğin ekspresyon farkının istatistiksel değerlendirmesi ΔCt değerlerinin karşılaştırılması ile yapılmıştır. Sağlıklı kontrol, mesane kanseri ve takip hastalarının ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında değerler normal dağılıma uygun olmadığından Kruskal Wallis testi ile incelenmiş ve ikili gruplar arasında fark Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. Mesane kanseri hastaları ile sağlıklı kontrollerin miR-210-3p ΔCt değerleri arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0,049$). Ekspresyon değerlerine ilişkin sayısal veriler Tablo 19'da yer almaktadır. Mesane kanseri hastaları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarının ekspresyon ve ΔCt grafikleri ise şekil 15'te gösterilmiştir.

Tablo 19: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri risk grupları ve takip hastalarının miR-210-3p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.

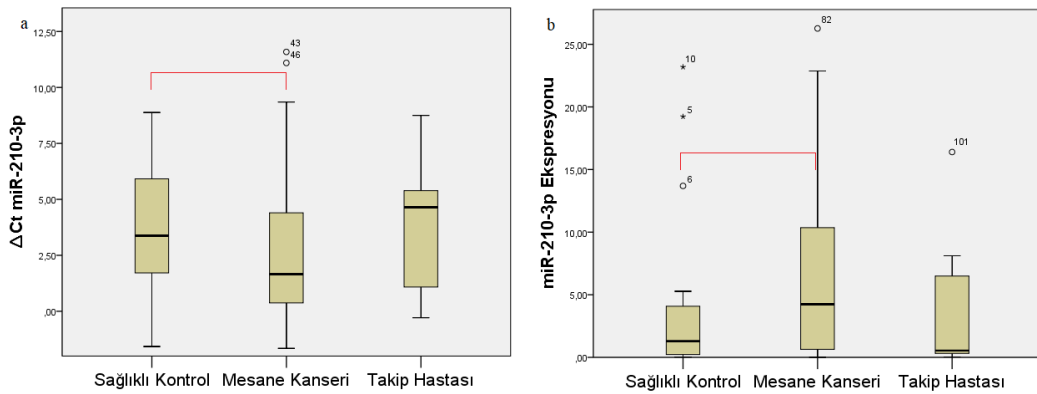
s.s: standart sapma, ç.a: çeyrekler açıklığı

	miR-210-3p Ekspresyonu		
	Ortanca	s.s.	Ç.a.
Sağlıklı Kontrol	1,29	9,78	4,09
Mesane Kanseri	4,24	10,28	10,03
Düşük-Orta Risk	4,86	6,89	11,70
Yüksek Risk	4,66	11,68	17
Kasa İnvaze-Metastatik	2,44	11,54	9,71
Takip Hastaları	0,54	5,06	6,92

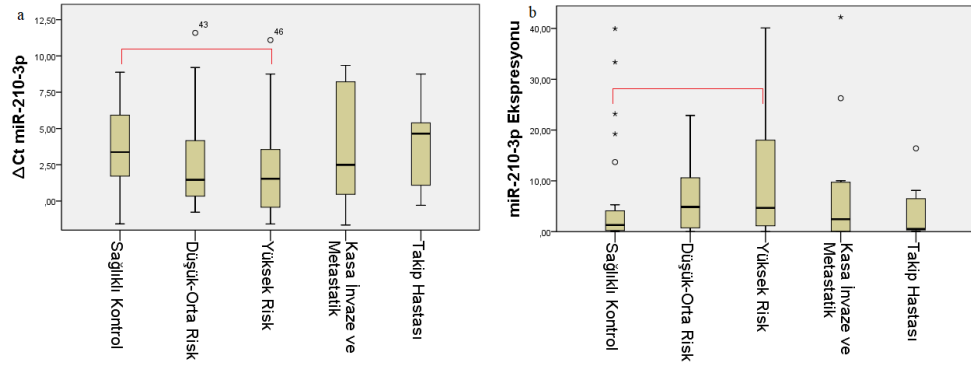
Sağlıklı kontroller ve mesane kanseri hastaları için p=0,049

Sağlıklı kontroller ve yüksek risk grubu için p=0,035

Mesane kanseri risk gruplarında ekspresyon düzeyinde herhangi bir fark olup olmadığının incelenmesi için öncelikle veri analizi yapılmış ve grupların ΔCt değerlerinin normal dağılıma uymadığı belirlenmiştir. Bu sebeple gruplar arası farkın aranmasında parametrik olmayan yöntemler kullanılmış ve gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0,199$). Örnek gruplarının 2'şerli karşılaştırmaları Mann Whitney U testi ile yapılmıştır ve yüksek riskli hasta grubunda miR-210-3p ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre yaklaşık 4 kat arttığı belirlenmiştir ($p=0,035$) (Şekil 16).

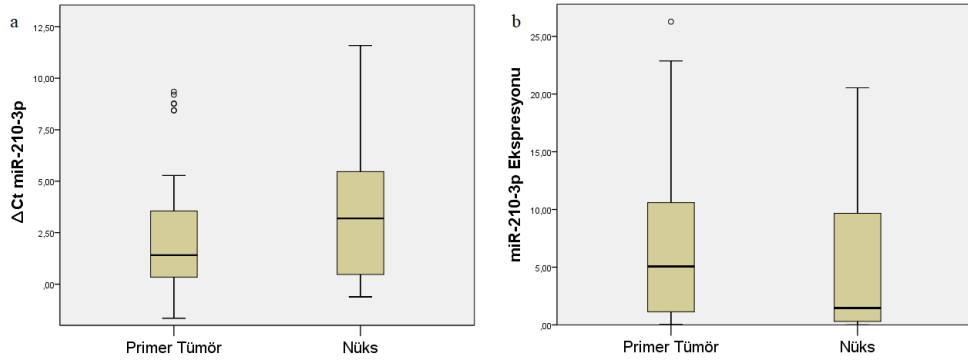


Şekil 15: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip grubunda miR-210-3p ekspresyonu ve ΔCt değerleri.



Şekil 16: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri risk grupları ve takip hastalarının miR-210-3p ΔCt (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.

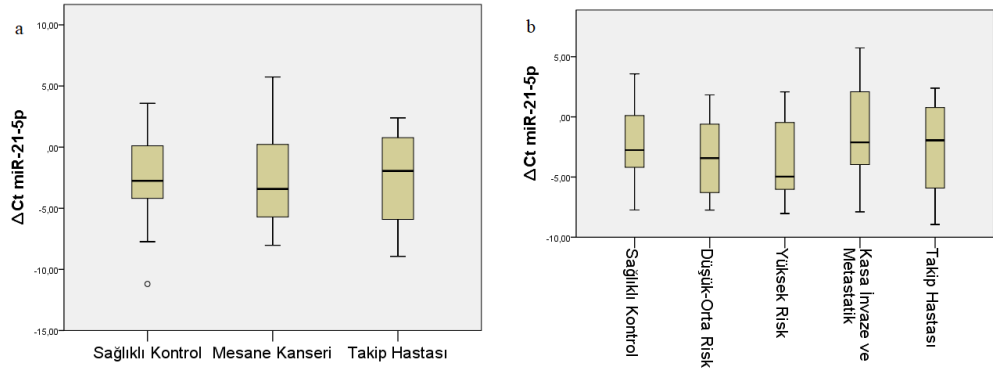
Primer tümörü olan hastalar ve nüks hastalarının ΔCt miR-210-3p değerleri, veri normal dağılıma uymadığından Mann Whitney U testi ile incelenmiştir ve gruplar arası anlamlı fark gözlenmemiştir. Primer tümör ve nüks hastalarının ΔCt miR-210-3p dağılımları Şekil 17’de gösterilmiştir. Bireylerin yaşı ve ΔCt miR-210-3p değerleri arasında da anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. miR-210-3p ekspresyonunun yaşıla ilişkisi yoktur.



Şekil 17: Primer tümör ve nüks hastalarının ΔCt miR-210-3p (a) ve miR-210-3p ekspresyon (b) değerleri.

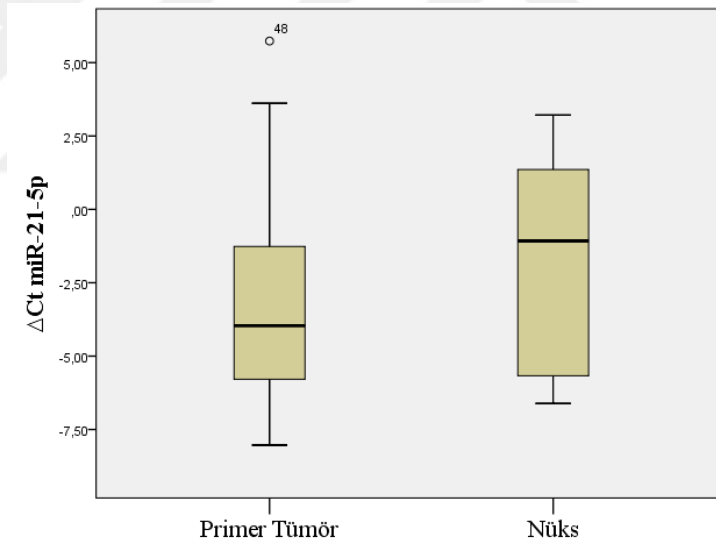
10.3.3. miR-21-5p Ekspresyonlarının Analizi

Örneklerin tümünde miR-21-5p ekspresyonu saptanmıştır. Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarının ΔCt değerleri incelenmiş ve normal dağılıma uygun olmadıkları gözlenmiştir. Bu sebeple istatistiksel anlam aranmasında non parametrik yöntemler kullanılmış ve miR-21-5p ΔCt değerlerinin gruplar arasında farklı olmadığı belirlenmiştir. Mesane kanseri risk grupları açısından değerlendirildiğinde de grupların kendi arasında ya da kontrole göre ΔCt değerlerinde anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir. Gruplara ait ΔCt değerleri Şekil 18’de gösterilmiştir.



Şekil 18: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri risk grupları ve takip hastalarının (a) ve mesane kanseri risk gruplarının (b) ΔC_t miR-21-5p değerleri.

Primer tümör ve nüks hastaları miR-21-5p ΔC_t değerleri açısından incelendiğinde nüks hastalarının ΔC_t değeri primer tümörü olanlara göre 4 kat artmış gibi gözükmesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 19 ve $p > 0,05$). miR-21-5p ekspresyonunun yaş ile de herhangi bir ilişkisi olmadığı saptanmıştır.



Şekil 19: Nüks ve primer tümör hastalarının ΔC_t miR-21-5p değerleri.

10.3.4. miR-139-5p Ekspresyonlarının Analizi

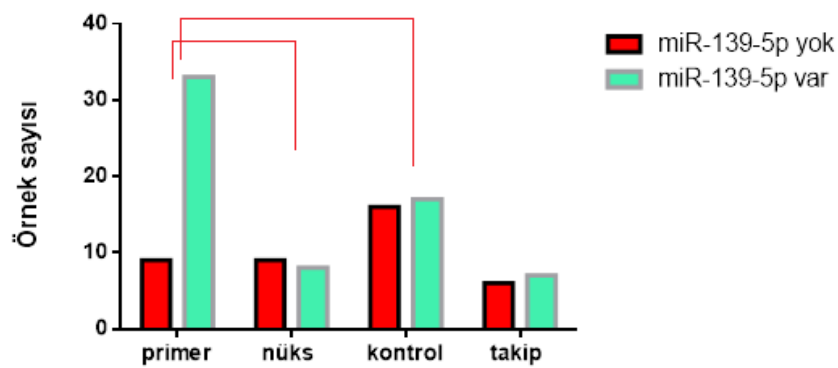
59 hastanın 18'inde, 34 kontrol örneğinin 17'sinde ve 12 takip hastasının 5'inde miR-139-5p ekspresyonu saptanamamıştır (Tablo 20). Ekspresyon varlığı ya da yokluğu açısından değerlendirildiğinde sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip örnekleri arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Mesane kanseri risk grupları açısından incelendiğinde de miR-139-5p ekspresyonu

gözlenen ve gözlenmeyen hastaların dağılımında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Örneklerin yaşı ile miR-139-5p eksprese edip etmemesi arasında da herhangi bir ilişki gözlenmemiştir.

Tablo 20: Mesane kanseri hastaları, takip hastaları ve kontrol grubunda miR-139-5p eksprese eden ve etmeyen hasta sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.

Örnek	miR-139-5p Ekspresyonu						
	Var			Yok			
	Gözlenen		Beklenen	Gözlenen		Beklenen	Toplam
	Sayı	%		Sayı	%		
Sağlıklı Kontrol	17	50	21	17	50	13	34
Mesane Kanseri	41	69,5	36,5	18	30,5	22,5	59
Takip Hastası	7	58,3	7,4	5	41,7	4,6	12
Toplam	65			40			105

Primer tümörü olan hastalar, nüks hastaları ve sağlıklı kontroller miR-139-5p eksprese edip etmemelerine göre Fisher's exact test ile değerlendirilmiştir. İkili gruplar arası farkın aranmasında 4 gözlü tablo kullanılmıştır. Primer tümörü olan hasta grubunda miR-139-5p eksprese edenlerin nüks örneklerine göre daha yüksek oranda bulunduğu ve bu farkın anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p=0,0281$; Şekil 20 ve Tablo 21). Primer tümör grubunda miR-139-5p eksprese eden örnek yüzdesinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,0145$).



Şekil 20: Primer tümör, nüks hastaları, takip hastaları ve sağlıklı kontrollerde miR-139-5p eksprese eden ve etmeyen örnek sayıları.

Tablo 21: Primer tümör, nüks, takip hastaları ve kontrol grubunda miR-139-5p eksprese eden örnek sayıları ve yüzdeleri.

	miR-139-5p Ekspresyonu				
	Var		Yok		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	
Primer Tümör	33	78,6	9	21,4	42
Nüks	8	47,1	9	52,9	17
Kontrol	17	50	17	50	34
Takip	7	58,3	5	41,7	13
Toplam	65		40		105

Primer tümör ve nüks hastaları için p=0,0281

Primer tümör ve kontrol grubu için p=0,0145

Ekspresyon gözlenen örneklerin ΔCt değerleri incelendiğinde normal dağılıma uydukları belirlenmiş ve aralarındaki fark T testi ile incelenmiştir. Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarının ΔCt miR-139-5p değerleri arasında istatistiksel bir fark olmadığı gözlenmiştir.

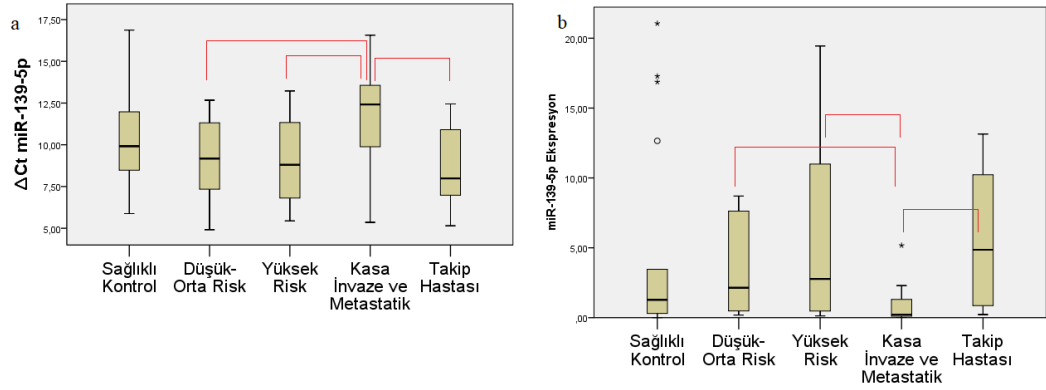
Mesane kanseri risk grupları açısından miR-139-5p ΔCt değerleri incelendiğinde, ΔCt değerlerinin normal dağılıma uygun olarak dağıldığı belirlenmiştir. Bu sebeple gruplar arası farkın aranmasında parametrik yöntemler kullanılmıştır. İki grup arası fark T testi ile incelenmiştir. Kasa invaze-metastatik grubun ortalama ΔCt değerinin düşük orta risk grubundan, yüksek risk grubundan ve takip hastalarından anlamlı derecede farklı olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $p=0,027$, $p=0,020$ ve $p=0,045$). Grupların ekspresyon değerleri normal dağılmadığından farkın ekspresyon cinsinden ifadesi ortancalar üzerinden yapılmıştır. Buna göre düşük orta risk grubu hastaların ve yüksek risk grubu hastaların miR-139-5p ekspresyonu kasa invaze metastatik hastaların yaklaşık 10 katıyken, takip hastalarının ekspresyonu ise kasa invaze metastatik hasta grubunun yaklaşık 20 katı kadardır (Şekil 21 ve Tablo 22).

Tablo 22: miR-139-5p ekspresyon farkı gözlenen grupların ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.

S.s: standart sapma ve ç.a: çeyrekler açıklığı

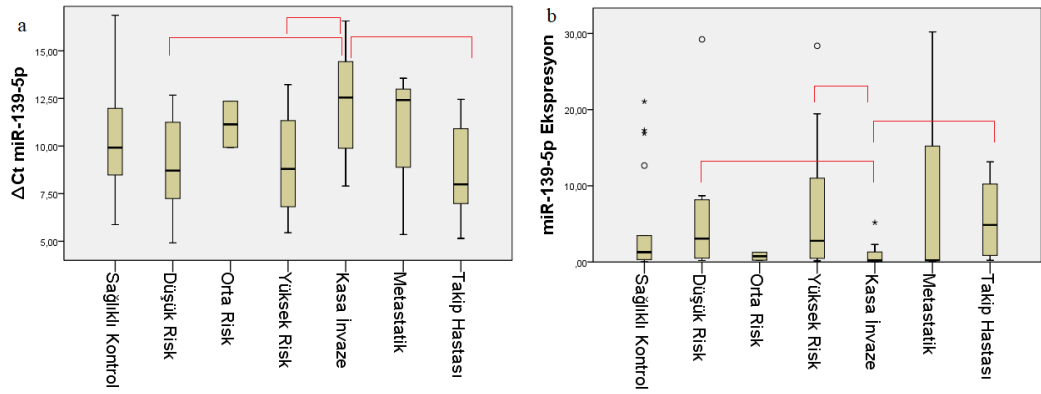
Örnek	Sayı		Ortanca	S.s	Ç.a
	Ekspresyon var	Ekspresyon yok			
Sağlıklı Kontrol	17	17	1,28	7,22	7,80
Düşük-Orta Risk	14	5	2,14	12,3	7,47
Yüksek Risk	14	10	2,77	8,84	11,89
Kasa invaze ve metastatik	13	3	0,23	8,26	1,72
Takip Hastası	7	5	4,86	12,34	12,85

Düşük orta risk grubu ve kasa invaze metastatik grup arası p=0,027
Yüksek risk ve kasa invaze metastatik grup arası p=0,020
Takip hastaları ve kasa invaze metastatik grup arası p=0,045



Şekil 21: Mesane kanseri risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında miR-139-5p ΔCt (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.

Kasa invaze metastatik grubun miR-139-5p ekspresyonunun düşük-orta risk grubu, yüksek risk grubu ve takip hastalarından oluşan gruba göre anlamlı ölçüde düşük olduğunun belirlenmesi üzerine mesane kanseri alt risk gruplarında da ekspresyonlar incelenmiştir. Buna göre kasa invaze grubun ΔCt değeri düşük risk, yüksek risk ve takip hastası grubundan farklıdır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (sırasıyla p=0,009; p=0,010; p=0,024). Farkın ekspresyon olarak ifadesi için mesane kanseri alt risk gruplarının ekspresyon değerleri incelenmiş ve normal dağılıma uygun olmadıkları belirlenmiştir, bu sebeple grupların ortanca ekspresyon değerleri dikkate alınmıştır. Grupların ΔCt ve ekspresyon grafikleri şekil 22’de gösterilmiştir. Ekspresyonlara ilişkin istatistiksel değerler ise tablo 23’te yer almaktadır. Elde edilen değerlere göre kas invazyonu gözlenen grubun miR-139-5p ekspresyonu düşük risk, yüksek risk ve takip hastalarına göre hayli düşüktür.



Şekil 22: Mesane kanseri alt risk grupları, sağlıklı kontrollere ve takip hastalarında miR-139-5p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.

Tablo 23: Mesane kanseri alt risk gruplarının miR-139-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.

Örnek	Sayı		Ortanca	S.s	Ç.a
	Ekspresyon var	Ekspresyon yok			
Sağlıklı Kontrol	17	17	1,28	7,22	7,80
Düşük Risk	12	4	3,06	13,03	7,94
Orta Risk	2	1	0,75	0,73	-
Yüksek Risk	14	10	2,77	8,84	11,89
Kasa invaze	10	3	0,21	1,63	1,50
Metastatik	3	0	0,23	17,33	-
Takip Hastası	7	5	4,86	12,34	12,85

Düşük risk grubu ve kasa invaze grup arası p=0,009
Yüksek risk ve kasa invaze grup arası p=0,010
Takip hastaları ve kasa invaze grup arası p=0,024

Primer tümörü olan hastalar ve nüks grubu arasında ekspresyon açısından herhangi bir fark olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca yaş ve ekspresyon arasında da ilişki saptanmamıştır.

10.3.5. miR-19b1-5p Ekspresyonlarının Analizi

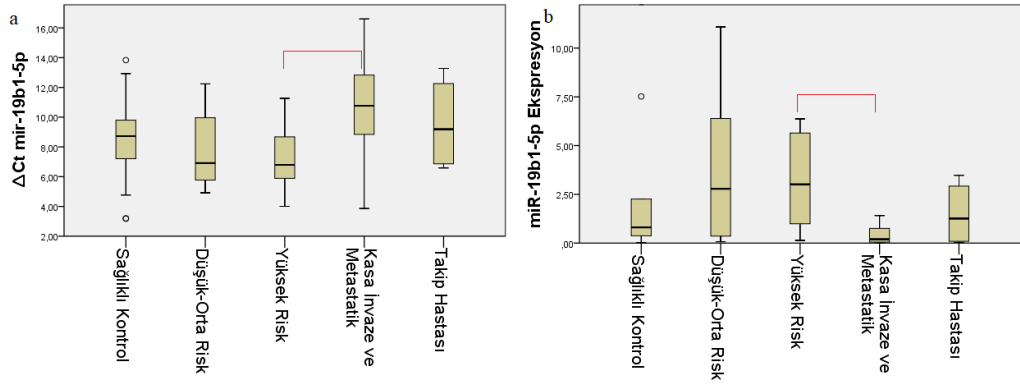
Örneklerin neredeyse yarısında miR-19b1-5p ekspresyonu saptanamamıştır (Tablo 24). Ekspresyon varlığı yokluğu açısından sağlıklı kontrollere, mesane kanseri hastaları ve takip örnekleri arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiş, primer tümör ve nüks hastaları ve yaş ile miR-19b1-5p varlığı arasında da herhangi bir anlamlı ilişki saptanamamıştır.

Tablo 24: Mesane kanseri hastaları, takip hastaları ve kontrol grubunda miR-139-5p eksprese eden ve etmeyen hasta sayıları, yüzdeleri, gözlenen ve beklenen değerleri.

Örnek	miR-19b1-5p Ekspresyonu						
	Var			Yok			
	Gözlenen		Beklenen	Gözlenen		Beklenen	Toplam
	Sayı	%		Sayı	%		
Sağlıklı Kontrol	18	52,9	17,8	16	47,1	16,2	34
Mesane Kanseri	33	55,9	30,9	26	44,1	28,1	59
Takip Hastası	4	33,3	6,3	8	66,7	5,7	12
Toplam	55			50			105

Ekspresyon seviyeleri arası farkın incelenmesi için öncelikle ΔCt değerleri incelenmiştir. Mesane kanseri hastaları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarının ΔCt değerleri normal dağılıma uygundur bu sebeple ΔCt değerlerindeki farkın anlamlılığı Annova testi ve 2'şerli gruplar halinde T testi ile incelenmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Mesane kanseri risk grupları değerlendirildiğinde yüksek riskli hasta grubu ile kasa invaze metastatik grubun ΔCt değerleri arasındaki farkın anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p=0,013$). Fark ekspresyon değeri açısından incelendiğinde, gruplar arası ekspresyon değerlerinin normal dağılıma uygun olarak dağılmadığı belirlenmiştir, bu sebeple grupların ortanca ekspresyon değerleri kıyaslanmıştır. Yüksek risk hasta grubunun miR-19b1-5p ekspresyonunun kasa invaze metastatik grubun ekspresyonunun yaklaşık 15 katı olduğu gözlenmiştir. Grupların ekspresyon ve ΔCt grafikleri şekil 23'te gösterilmiştir. Ekspresyonlara ilişkin istatistiksel değerler ise Tablo 25'te belirtilmiştir.



Şekil 23: Mesane kanseri risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında miR-19b1-5p Δ Ct (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.

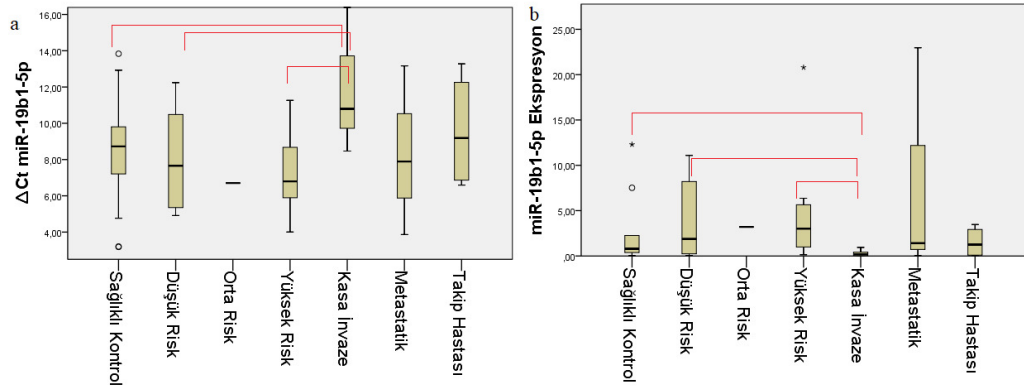
Tablo 25: Mesane kanseri risk gruplarında miR-19b1-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.

	miR-19b1-5p Ekspresyonu						
	Var		Yok		Ortanca	S.s	Ç.a
	Sayı	%	Sayı	%			
Sağlıklı Kontrol	18	52,9	16	47,1	0,802	11,64	3,21
Düşük-Orta Risk	11	57,9	8	42,1	2,781	3,94	7,97
Yüksek Risk	11	45,8	13	54,2	3,012	5,84	5,61
Kasa İnvaze ve Metastatik	11	68,8	5	31,3	0,191	6,82	0,91
Takip Hastası	4	33,3	8	66,7	1,255	1,70	3,14

Düşük orta risk hasta grubu ile kasa invaze metastatik grup arası p=0,05

Yüksek risk hasta grubu ile kasa invaze metastatik grup arası p=0,013

Mesane kanseri ana risk gruplarında gözlenen farklılıkların alt risk grupları açısından da incelenmesi için Δ Ct değerleri analiz edilmiştir. Değerlerin normal dağılıma uygun olduğu belirlenmiş, gruplar arası fark T testi ile incelenmiştir. Kasa invaze hasta grubunun Δ Ct değerinin sağlıklı kontrollerden, düşük risk hasta grubundan ve yüksek risk hasta grubundan farklı olduğu gözlenmiştir (sırasıyla p=0,013; p=0,016 ve p=0,002). Farkın ekspresyon cinsinden ifade edilmesi için ekspresyonlar incelenmiştir. Ekspresyon değerleri normal dağılıma uygun olmadığından ortancaları dikkate alınmıştır. Buna göre kas invazyonu olan hasta grubunda miR-19b1-5p ekspresyonu kontrolden yaklaşık 4 kat, düşük risk grubundan 10 kat ve yüksek risk grubundan 15 kat daha azdır. Grupların ekspresyon ve Δ Ct grafikleri şekil 24'te, ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler ise tablo 26'da özetlenmiştir.



Şekil 24: Mesane kanseri alt risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında miR-19b1-5p ΔCt (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.

Tablo 26: Mesane kanseri alt risk gruplarında, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında miR-19b1-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.

s.s:standart sapma, ç.a:çeyrekler aralığı

Örnek Grubu	miR-19b1-5p		Ekspresyona ilişkin İstatistiksel Değerler		
	Ekspresyonu				
	Var	Yok	Ortanca	s.s	Ç.a
Sağlıklı Kontrol	18	16	0,80	11,64	3,21
Düşük Risk	10	6	1,89	4,15	8,06
Orta Risk	1	2	3,21	-	-
Yüksek Risk	11	13	3,01	5,84	5,61
Kasa İnvaze	8	5	0,19	0,32	0,47
Metastatik	3	0	1,41	12,85	-
Takip Hastası	4	8	1,25	1,70	3,14

Sağlıklı kontroller ve kasa İnvaze grup arasında $p=0,013$

Düşük risk hasta grubu ve kasa invaze grup arasında $p=0,016$

Yüksek risk hasta grubu ve kasa invaze grup arasında $p=0,002$

Elde edilen veriler miR-19b1-5p'nin invazyon ile ilişkili olabileceğini işaret etmektedir. Bunu incelemek için kas invazyonu gözlenen hastalar ayrı bir grup olarak değerlendirilmiş ve bu hasta grubundaki ekspresyonun diğer gruplardan ne ölçüde farklılık gösterdiği incelenmiştir. miR-19b1-5p ekspresyonunun sağlıklı kontroller, takip hastaları ve kas invazyonu gözlenmeyen tüm mesane kanseri

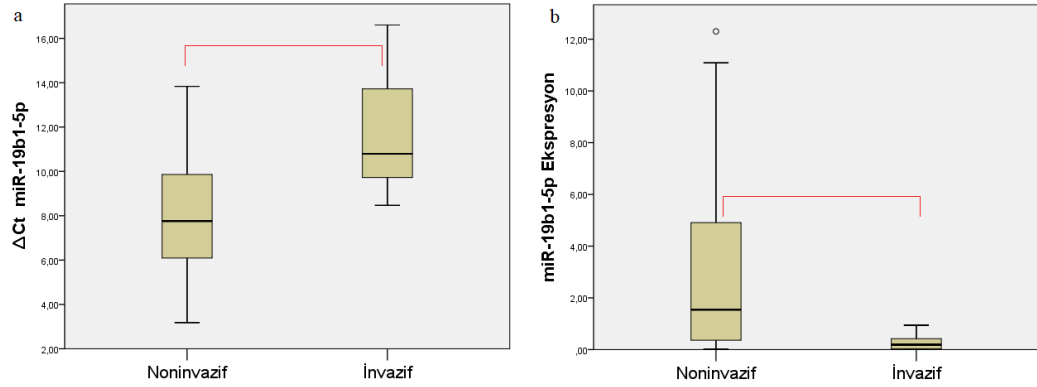
örneklerinden oluşturulan ana gruba göre kas invazyonu gözlenen grupta yaklaşık 8 kat az olduğu tespit edilmiştir ($p=0,002$, Tablo 27 ve Şekil 25).

Tablo 27: İnvazif ve non invazif örnek gruplarında miR-19b1-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.

s.s: standart sapma, ç.a: çeyrekler aralığı

Örnek	Sayı	Ortanca	s.s	ç.a
Noninvazif Grup	47	1,54	8,40	4,90
İnvazif	8	0,19	0,32	0,47

$p=0,002$



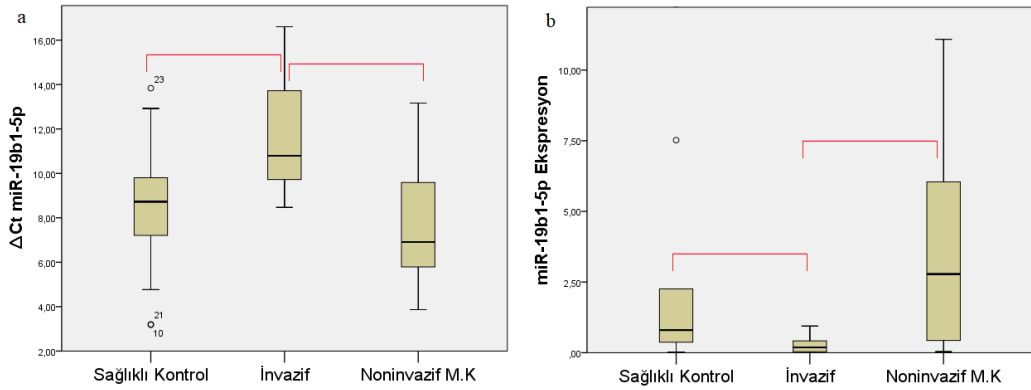
Şekil 25: İnvazif ve non invazif örnek grubunda miR-19b1-5p ΔCt (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.

Örnek grupları yeniden düzenlenmiş ve invazif grubun ΔCt değerinin invazif olmayan tüm mesane kanseri örnekleri ya da sağlıklı kontrollerden farkı incelenmiştir. Oluşturulan yeni gruplar; invazif mesane kanseri örnekleri, invazif olmayan mesane kanseri örnekleri ve sağlıklı kontroller olmak üzere 3 adettir. Bu gruplarda ΔCt değerlerinin normal dağılıma uygun olduğu belirlenmiş ve gruplar arası karşılaştırma T testi ile yapılmıştır. İnvazif mesane kanseri grubunun sağlıklı kontroller ve non invazif mesane kanseri grubundan anlamlı düzeyde farklı ΔCt değerine sahip olduğu gözlenmiştir (sırasıyla $p=0,013$ ve $p=0,001$). Bu fark ekspresyon açısından incelendiğinde ekspresyonların normal dağılıma uymadığı belirlenmiş bu nedenle ortancaları dikkate alınmıştır. Yapılan değerlendirmeye göre sağlıklı kontrollerin miR-19b1-5p ekspresyonu invazif hastaların yaklaşık 4,3 katı ve invazif olmayan mesane kanseri örneklerinin ekspresyonu invazif örneklerin yaklaşık 14,8 katıdır (Şekil 26 ve Tablo 28).

Tablo 28: Non invazif mesane kanserleri, invazif mesane kanserleri ve sağlıklı kontrollerde miR-19b1-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler.

s.s:Standart sapma, m:ortanca, ç.a: çeyrekler açıklığını ifade etmektedir.

miR-19b1-5p ekspresyonuna ilişkin istatistiksel değerler										
Örnek	Sayı	m	s.s	ç.a	Örnek	Sayı	m	s.s	ç.a	p
Noninvazif Mesane kanserleri	25	2,51	5,72	5,41	İnvazif Mesane kanserleri	8	0,19	0,32	0,45	0,001
Sağlıklı Kontroller	18	,80	11,64	3,21	İnvazif Mesane kanserleri	8	0,19	0,32	0,47	0,013



Şekil 26: İnvazif mesane kanserleri, non invazif mesane kanserleri ve sağlıklı kontrollerin miR-19b1-5p ΔCt (a) ve ekspresyon (b) grafikleri.

Nüks hastaları ve primer tümörü olan hastalar arasında miR-19b1-5p ekspresyonu açısından herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir benzer şekilde yaş ile de herhangi bir ilişki saptanmamıştır.

10.3.6. miR-16-5p Ekspresyonlarının Analizi

Örneklerin tümünde miR-16-5p ekspresyonu saptanmıştır. Sağlıklı kontrol, mesane kanseri ve takip örneklerinin ΔCt değerleri normal dağılıma uymaktadır bu sebeple farkın anlamlılık düzeyinin incelenmesinde T testi kullanılmış ve anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Mesane kanseri risk gruplarında ve alt risk gruplarında ΔCt değerlerinin normal dağılıma uygun olduğu belirlenmiş, gruplar arası ΔCt farkı T testi ile incelenmiş ve gruplar arasında fark olmadığı gözlenmiştir. Primer tümör ve nüks hastalarının ΔCt değerlerinde de anlamlı fark gözlenmemiştir.

10.3.7. miRNA Ekspresyonları arası ilişkiler

miRNAekspresyonları arası zayıf korelasyonlar gözlenmiştir. Korelasyonlara ilişkin veriler Tablo 29’da özetlenmiştir.

Tablo 29: miRNA ekspresyonları arası korelasyonlara ilişkin istatistiksel değerler.

Ekspresyonu incelenen miRNA Çifti	Korelasyon kat sayısı	p değeri
miR-136-3p ve miR-19	0,406	0,04
miR-136-3p ve miR-16-5p	0,382	0,016
miR-21-5p ve miR-16-5p	0,195	0,046

ELISA Sonuçları

Toplam 55 mesane kanseri hastası idrarı, 34 sağlıklı kontrole ait idrar ve 10 takip hastasının idrar örneği ELISA yöntemiyle incelenmiştir. ELISA testi sonucunda elde edilen fotometrik değerler 4 parametrelili lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Tüm proteinlere ait konsantrasyon değerleri Tablo 30’da belirtilmiştir.

Tablo 30’da idrar örneklerindeki protein miktarları görülmektedir. Ancak bu değerlerin anlam ifade edebilmesi için normalize edilmesi gerekmektedir. Bireyin dehidrasyon gibi fizyolojik değişimlerini ekarte etmek için kreatinine göre normalizasyon literatürde sıklıkla yer alan bir normalizasyon stratejisidir (Tang, Toh, ve Teo, 2015; H. Zhou ve ark., 2006). Bu çalışmada da normalizasyon için kreatinin kullanılmıştır. Kreatinine göre normalize edilmiş üriner protein konsantrasyonları Tablo 31’de belirtilmiştir.

Tablo 30: ELISA deneyleri sonucu elde edilen optik dansiteler kullanılarak hesaplanmış protein konsantrasyonları.

H: Mesane kanseri hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: takip hastalarını ifade etmektedir.

Örnek	Üriner Protein Konsantrasyonu (ng/mL)					
	APE1/REF1	BLCA4	CRK	NMP22	VIM	Cr
H1	1,647	9,693	1,264	8,183	5,714	0,121
H2	1,45	6,917	1,191	8,805	1,823	0,133
H3	1,608	7,212	1,376	6,772	4,812	0,278
H5	1,723	9,292	1,471	9,292	5,685	0,148
H7	2,137	10,644	1,060	12,225	6,506	0,123
H8	1,755	10,733	1,341	6,795	6,032	0,101
H9	1,886	7,178	1,459	9,324	5,067	0,111
H10	1,519	8,59	1,114	6,79	6,556	0,127
H12	1,937	8,015	1,259	8,065	5,771	0,121
H13	1,803	8,07	1,301	7,618	6,306	0,118
H14	1,694	9,632	1,229	5,681	7,100	0,098
H15	1,59	8,051	1,416	4,57	5,272	0,109
H16	1,672	8,927	1,737	12,163	4,400	0,151
H19	1,979	7,696	1,501	3,922	5,721	0,137
H20	1,763	6,86	1,507	4,689	6,049	0,127
H21	1,392	7,896	0,886	5,57	4,957	0,101
H23	0,856	5,589	1,348	6,954	4,541	0,113
H24	1,612	9,496	1,208	5,993	6,901	0,196
H25	1,566	8,729	1,331	5,469	6,920	0,149
H26	1,555	8,594	1,341	2,545	6,251	0,133
H28	1,463	7,873	1,465	2,458	6,901	0,130
H29	1,489	9,165	1,307	6,514	6,672	0,150
H30	1,768	10,522	1,774	9,479	6,800	0,170
H31	1,23	6,76	1,184	7,185	2,873	0,144
H32	1,713	9,077	1,353	10,437	8,194	0,108
H33	1,641	9,291	1,445	2,408	6,119	0,110
H34	1,562	9,793	1,823	8,699	5,443	0,170
H37	1,56	9,228	1,471	6,499	5,392	0,140
H38	1,454	7,827	1,512	9,322	4,843	0,137
H39	1,448	8,23	1,888	3,642	6,005	0,208
H40	1,754	9,676	1,422	5,483	6,384	0,155
H43	1,634	9,611	1,383	5,339	4,732	0,359
H44	1,206	6,774	1,643	9,808	4,893	0,163
H45	1,261	6,71	1,668	8,281	5,259	0,170
H46	1,405	8,05	1,517	6,619	4,716	0,162

Tablo 30: ELISA deneyleri sonucu elde edilen optik dansiteler ile kullanılarak hesaplanmış protein konsantrasyonları (devam)

Örnek	Üriner Protein Konsantrasyonu (ng/mL)					
	APE1/REF1	BLCA4	CRK	NMP22	VIM	Cr
H47	1,492	10,468	1,494	1,27	6,837	0,186
H48	1,224	7,873	1,438	0,711	5,988	0,285
H49	1,353	8,778	1,339	7,556	4,700	0,195
H50	1,837	11,336	1,192	10,098	7,256	0,170
H51	1,438	8,606	1,623	8,895	5,484	0,159
H52	1,377	9,611	1,425	9,059	4,557	0,205
H54	1,575	9,115	1,473	0,976	5,704	0,155
H55	1,208	6,939	1,460	9,333	5,079	0,290
H56	1,248	8,326	1,239	31,733	5,510	0,384
H57	1,622	9,19	1,410	6,052	6,393	0,179
H58	1,6	9,09	1,091	4,302	6,855	0,134
H59	1,569	10,068	1,397	0,582	5,893	0,240
H60	1,791	10,334	1,288	2,823	6,136	0,150
H61	1,558	11,577	1,138	10,702	6,509	0,162
H63	1,686	8,05	1,412	9,269	5,747	0,291
H64	0,252	0,876	0,065	0	0,000	0,036
H65	1,514	7,291	1,491	2,925	6,224	0,257
H66	1,472	6,849	1,215	9,076	5,585	0,211
H67	1,022	7,199	1,581	8,101	4,758	0,339
H68	0,850	6,084	1,309	8,01	3,542	0,393
H69	1,11	8,689	1,285	5,593	4,517	0,157
H70	1,336	9,453	1,604	8,142	4,212	0,247
H71	1,792	7,858	1,448	6,439	4,153	0,259
H72	0,932	8,792	1,816	9,364	5,501	0,296
H73	1	9,801	1,766	8,014	4,911	0,239
H74	0,965	33,875	3,551	11,341	7,043	0,540
S1	1,392	7,568	1,312	10,628	5,079	0,297
S2	1,45	6,648	1,405	9,217	6,402	0,211
S3	1,285	4,469	1,593	3,842	4,330	0,174
S4	1,308	7,177	1,348	2,925	4,820	0,182
S5	1,331	8,35	1,370	5,584	5,708	0,270
S6	1,343	6,069	1,458	0,571	7,232	0,226
S7	1,019	8,278	1,849	3,182	4,686	0,234
S8	1,037	9,205	1,358	13,412	4,790	0,284
S9	1,017	9,19	1,427	7,37	4,480	0,254

Tablo 30: ELISA deneyleri sonucu elde edilen optik dansiteler ile kullanılarak hesaplanmış protein konsantrasyonları (devam)

Örnek	Üriner Protein Konsantrasyonu (ng/mL)					
	APE1/REF1	BLCA4	CRK	NMP22	VIM	Cr
S10	0,936	9,573	1,290	8,476	4,333	0,198
S11	0,952	8,766	1,468	1,467	3,825	0,383
S12	0,959	9,266	1,179	2,124	4,000	0,292
S13	1,02	8,618	1,686	4,843	4,392	0,272
S14	1,008	9,56	1,458	10,014	5,271	0,204
S15	1,221	9,702	1,339	9,759	5,126	0,227
S16	0,866	8,062	1,840	7,723	3,991	0,179
S17	1,109	7,257	1,452	8,955	4,855	0,230
S18	1,046	5,629	1,224	7,754	4,298	0,201
S19	1,082	6,944	1,563	7,889	4,022	0,254
S20	0,563	3,579	0,761	4,367	2,117	0,180
S21	1,287	6,349	1,729	10,296	4,918	0,245
S22	0,946	6,915	1,444	7,785	3,584	0,233
S23	0,748	6,49	1,437	5,987	3,134	0,206
S24	1,176	8,237	1,499	9,318	4,192	0,266
S25	1,324	9,735	1,643	9,97	4,686	0,281
S26	0,706	4,871	1,237	6,594	3,642	0,164
S27	1,238	4,123	1,369	6,864	3,597	0,209
S28	1,724	6,85	1,925	9,016	5,367	0,274
S29	1,317	7,304	1,794	8,847	5,297	0,327
S30	0,756	9,453	1,610	7,948	5,246	0,363
S31	1,796	7,837	1,358	8,465	5,560	0,211
S34	1,245	8,692	1,794	8,296	5,155	0,245
S35	1,415	5,601	1,378	6,383	3,366	0,116
S36	1,699	7,383	1,852	14,911	5,850	0,119
T3	0,998	8,053	1,812	10,266	5,307	0,214
T4	1,276	6,39	1,574	8,728	5,044	0,223
T11	0,976	5,771	1,480	8,907	5,249	0,206
T12	1,140	7,554	1,406	7,611	4,489	0,287
T14	1,115	7,846	1,498	7,662	4,197	0,280
T15	1,004	8,87	1,801	7,878	4,629	0,276
T16	1,109	8,706	1,794	9,305	5,316	0,239
T17	0,832	7,957	1,384	7,608	3,852	0,211
T18	1,195	9,999	1,643	8,377	5,069	0,209
T19	1,82	8,619	1,766	6,52	6,474	0,172

Tablo 31: ELISA yöntemi sonucu elde edilen idrar protein konsantrasyonlarının Kreatinine göre normalize edilmesi sonucu elde edilen üriner protein konsantrasyonları.

H: Mesane kanseri hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: takip hastalarını ifade etmektedir

Örnek	Cr'ne göre normalize edilmiş üriner protein konsantrasyonu [Protein]/[uCr]				
	APE1/REF1	BLCA4	CRK	NMP22	VIM
H1	13,52	79,56	10,37	67,16	46,90
H2	10,85	51,74	8,91	65,87	13,64
H3	5,78	25,93	4,95	24,35	17,30
H5	11,64	62,75	9,93	62,75	38,39
H7	17,34	86,36	8,6	99,19	52,79
H8	17,27	105,61	13,2	66,86	59,35
H9	16,93	64,44	13,1	83,7	45,49
H10	11,89	67,23	8,72	53,14	51,31
H12	15,92	65,86	10,35	66,27	47,42
H13	15,25	68,26	11,01	64,44	53,34
H14	17,23	97,96	12,5	57,78	72,21
H16	11,02	58,82	11,44	80,14	28,99
H19	14,37	55,87	10,9	28,47	41,53
H20	13,79	53,64	11,78	36,67	47,3
H21	13,78	78,14	8,77	55,12	49,06
H23	7,57	49,44	11,93	61,52	40,17
H24	8,19	48,25	6,14	30,45	35,07
H25	10,48	58,4	8,9	36,59	46,3
H26	11,64	64,34	10,04	19,05	46,8
H28	11,18	60,14	11,19	18,78	52,72
H29	9,89	60,9	8,68	43,28	44,33
H31	8,5	46,72	8,18	49,65	19,85
H32	15,78	83,63	12,47	96,16	75,5
H33	14,8	83,79	13,03	21,72	55,19
H34	9,14	57,28	10,66	50,88	31,83
H37	11,09	65,58	10,45	46,18	38,32
H38	10,54	56,75	10,96	67,59	35,11
H39	6,94	39,42	9,04	17,45	28,77
H40	11,29	62,29	9,15	35,29	41,09
H43	4,55	26,74	3,85	14,86	13,17

Tablo 31: ELISA yöntemi sonucu elde edilen idrar protein konsantrasyonlarının kreatinine göre normalize edilmesi sonucu elde edilen üriner protein konsantrasyonları.(devam)

H: Mesane kanseri hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: takip hastalarını ifade etmektedir.

Ömek	Cr'ne göre normalize edilmiş üriner protein konsantrasyonu [Protein]/[uCr]				
	APE1/REF1	BLCA4	CRK	NMP22	VIM
H44	7,38	41,46	10,06	60,03	29,95
H45	7,4	39,38	9,79	48,59	30,86
H46	8,65	49,55	9,34	40,75	29,03
H47	7,98	56	7,99	6,79	36,58
H48	4,28	27,55	5,03	2,49	20,95
H49	6,94	45,01	6,87	38,74	24,1
H50	10,79	66,57	7	59,3	42,61
H51	9,02	53,97	10,18	55,79	34,39
H52	6,69	46,7	6,92	44,01	22,14
H54	10,15	58,76	9,5	6,29	36,77
H55	4,15	23,86	5,02	32,09	17,47
H56	3,25	21,65	3,22	82,53	14,33
H58	11,87	67,46	8,1	31,93	50,88
H59	6,53	41,93	5,82	2,42	24,54
H60	11,9	68,64	8,55	18,75	40,76
H61	9,57	71,09	6,99	65,71	39,97
H63	5,79	27,64	4,85	31,82	19,73
H64	6,91	24,01	1,78	0	0
H65	5,89	28,34	5,8	11,37	24,2
H66	6,96	32,4	5,75	42,93	26,42
H67	3,01	21,21	4,66	23,86	14,02
H68	2,16	15,46	3,33	20,36	9,00
H70	5,41	38,27	6,49	32,96	17,05
H72	3,14	29,66	6,13	31,59	18,56
H73	4,17	40,85	7,36	33,4	20,47
S1	1,79	62,71	6,57	20,99	13,04
S2	4,69	25,47	4,42	35,77	17,10
S3	6,84	31,38	6,63	43,5	30,21
S4	7,35	25,57	9,11	21,98	24,77
S5	7,16	39,3	7,38	16,02	26,4

Tablo 31: ELISA yöntemi sonucu elde edilen idrar protein konsantrasyonlarının kreatinine göre normalize edilmesi sonucu elde edilen üriner protein konsantrasyonları.(devam)

H: Mesane kanseri hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: takip hastalarını ifade etmektedir.

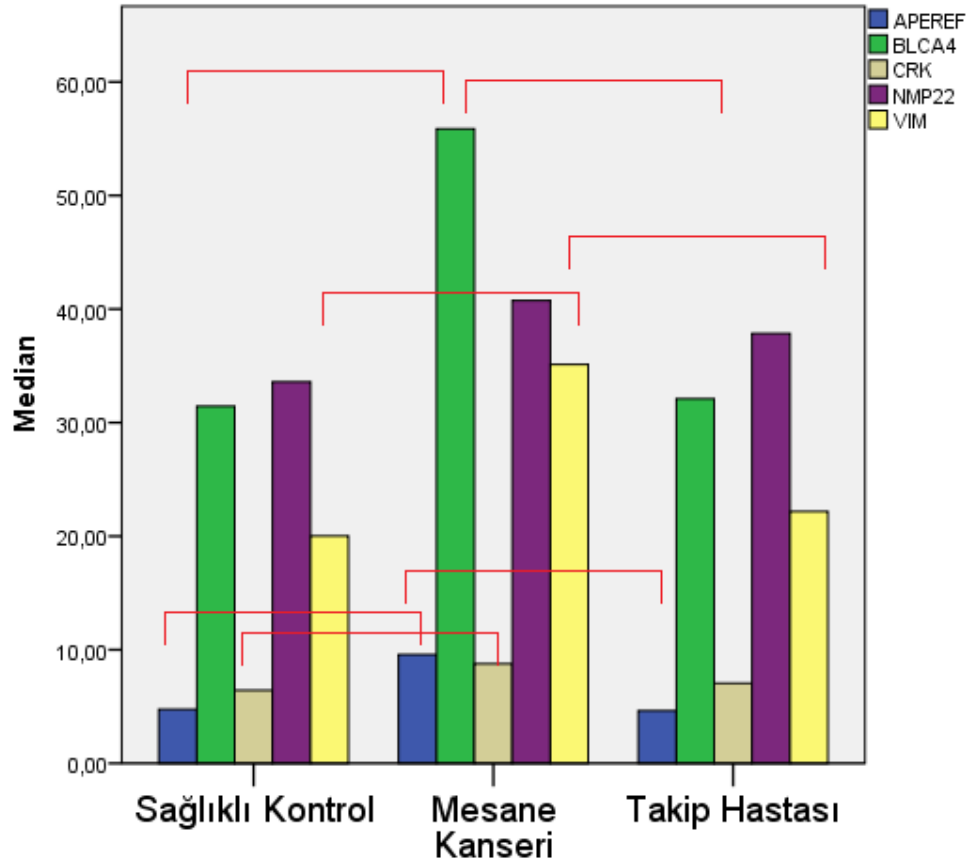
Ömek	Cr'ne göre normalize edilmiş üriner protein konsantrasyonu [Protein]/[uCr]				
	APE1/REF1	BLCA4	CRK	NMP22	VIM
S6	4,92	30,86	5,06	20,64	21,09
S7	5,93	26,8	6,44	2,52	31,94
S8	4,35	35,31	7,89	13,57	19,99
S9	3,64	32,35	4,77	47,14	16,83
S10	4	36,13	5,61	28,97	17,61
S11	4,71	48,15	6,49	42,63	21,79
S12	2,48	22,86	3,83	3,83	9,97
S13	3,28	31,65	4,03	7,26	13,66
S14	3,74	31,62	6,19	17,77	16,12
S15	4,92	46,66	7,12	48,88	25,73
S16	5,37	42,67	5,89	42,92	22,54
S17	4,83	44,94	10,26	43,05	22,25
S18	4,81	31,46	6,29	38,82	21,05
S19	5,2	27,98	6,09	38,55	21,37
S20	4,25	27,3	6,14	31,01	15,81
S21	3,12	19,85	4,22	24,22	11,74
S22	5,25	25,88	7,05	41,97	20,05
S23	4,06	29,67	6,2	33,41	15,38
S24	3,62	31,41	6,95	28,97	15,17
S25	4,41	30,92	5,63	34,98	15,74
S26	4,7	34,57	5,83	35,4	16,64
S27	4,3	29,7	7,54	40,2	22,21
S28	5,9	19,65	6,53	32,72	17,14
S29	6,27	24,91	7	32,79	19,52
S30	4,02	22,29	5,47	26,99	16,16
S31	8,5	37,07	6,42	40,04	26,30
S34	5,07	35,39	7,31	33,78	20,99
S35	12,17	48,17	11,85	54,89	28,95
S36	14,27	62,03	15,56	125,27	49,15
T3	2,08	25,99	4,43	21,85	14,43

Tablo 31: ELISA yöntemi sonucu elde edilen idrar protein konsantrasyonlarının kreatinine göre normalize edilmesi sonucu elde edilen üriner protein konsantrasyonları.(devam)

H: Mesane kanseri hastası, S: Sağlıklı Kontrol ve T: takip hastalarını ifade etmektedir.

Ömek	Cr'ne göre normalize edilmiş üriner protein konsantrasyonu [Protein]/[uCr]				
	APE1/REF1	BLCA4	CRK	NMP22	VIM
T4	4,66	37,58	8,46	47,9	24,76
T5	5,71	28,61	7,05	39,08	22,59
T11	4,72	27,93	7,16	43,11	25,41
T12	3,97	26,3	4,9	26,5	15,63
T14	3,97	27,95	5,34	27,3	14,95
T15	3,63	32,1	6,52	28,51	16,75
T16	4,63	36,33	7,49	38,82	22,18
T17	3,93	37,54	6,53	35,9	18,18
T18	5,7	47,66	7,83	39,93	24,16
T19	10,56	50,03	10,25	37,85	37,58

Protein konsantrasyonlarının sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarındaki dağılımı incelendiğinde verinin normal dağılıma uygun olmadığı belirlendiğinden istatistik anlam aranmasında non parametrik yöntemler kullanılmıştır. Kruskal Wallis testi ile çözümleme yapıldığında Ape1/Ref1, CRK, VIM, BLCA4 konsantrasyonlarının gruplar arasında anlamlı fark gösterdiği belirlenmiştir. Grupların birbiri arasında kıyaslanması ise Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Elde edilen protein konsantrasyonlarının ortanca değerlerinin gruplar arasındaki dağılımı Şekil 27'de görsel olarak ifade edilmiştir. Ekspresyonlara ilişkin istatistiksel değerler ise Tablo 32 ve Tablo 33'te özetlenmiştir.



Şekil 27: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarında üriner protein konsantrasyonları.

Tablo 32: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarının üriner protein konsantrasyonlarına ilişkin istatistiksel değerler.

Örnek	Sayı	Protein				
		APREF	BLCA4	CRK	NMP22	VIM
Sağlıklı Kontrol	34					
Ortanca		4,76	31,41	6,42	33,41	19,99
Standart sapma		2,45	10,59	2,28	20,91	7,35
Çeyrekler açıklığı		1,89	11,85	1,46	20,81	7,70
Mesane Kanseri	55					
Ortanca		9,57	55,87	8,77	40,75	35,11
Standart sapma		4,08	20,24	2,78	24,09	15,75
Çeyrekler açıklığı		5,20	26,49	4,32	37,66	25,85
Takip Hastası	11					
Ortanca		4,64	33,74	7,11	36,87	21,59
Standart sapma		2,04	7,99	1,59	7,66	6,43
Çeyrekler açıklığı		1,61	9,63	2,11	12,12	8,70

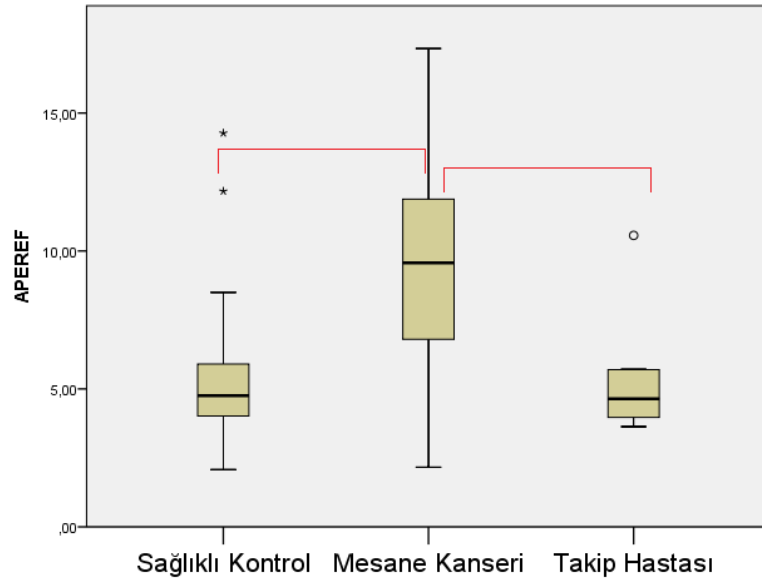
Tablo 33: Üriner konsantrasyonlarında anlamlı fark gözlenen gruplara ilişkin istatistiksel değerler.

Protein	Örnek	Ortanca	s.s	ç.a	Örnek	Ortanca	s.s	ç.a	p
APEREF	Sağlıklı Kontrol	4,76	2,45	1,89	Mesane Kanseri	9,57	4,08	5,2	0,0000001
	Takip Hastası	4,63	2,14	1,77	Mesane Kanseri	9,57	4,08	5,2	0,000148
BLCA4	Sağlıklı Kontrol	31,43	10,44	11,06	Mesane Kanseri	55,87	20,24	26,49	<0,0000017
	Takip Hastası	32,10	8,38	9,64	Mesane Kanseri	55,87	20,24	26,49	0,002
CRK	Sağlıklı Kontrol	6,43	2,25	1,54	Mesane Kanseri	8,77	2,78	4,32	0,002
VIM	Sağlıklı Kontrol	20,02	7,24	7,06	Mesane Kanseri	35,11	15,75	25,85	0,000013
	Takip Hastası	22,18	6,74	9,13	Mesane Kanseri	35,11	15,75	25,85	0,005

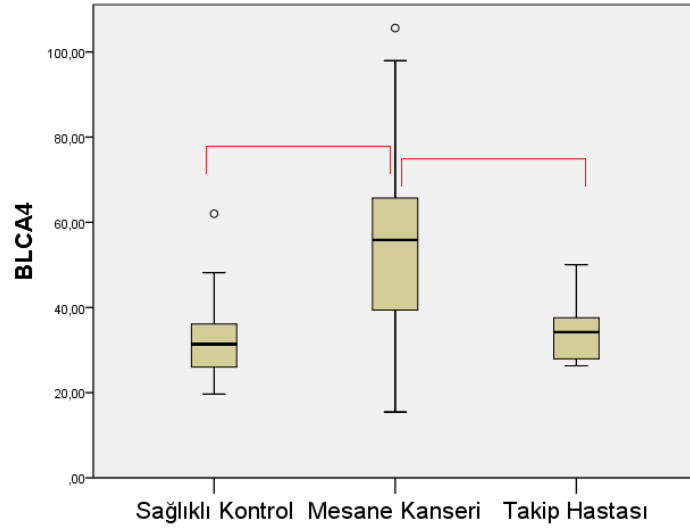
Non parametrik bir yöntem olan Mannwhitney U testi ile incelendiğinde Nmp22 dışındaki diğer tüm proteinlerin üriner konsantrasyon ortalamalarının gruplar arasında farklı dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Ape1/Ref1 konsantrasyonu mesane kanseri örneklerinde kontrol ve takip örneklerinin yaklaşık 2 katıdır ($p<0,00001$ ve $p=0,00148$) (Şekil 28, Tablo 33). Sağlıklı kontroller ile takip hastalarının üriner Ape1/Ref1 konsantrasyonları arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir.

BLCA4 konsantrasyonları mesane kanseri örneklerinde sağlıklı kontrollerin ve takip hastalarının yaklaşık 2 katı kadardır ($p<0,000009$ ve $p=0,002$) (Şekil 29, Tablo 33). Sağlıklı kontroller ile takip hastalarının üriner BLCA4 konsantrasyonları arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir.

CRK konsantrasyonları mesane kanseri örneklerinde sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde artmıştır ($p=0,002$) takip hastaları ile karşılaştırıldığında bu anlamlılık söz konusu değildir (Şekil 30, Tablo 33). Sağlıklı kontroller ile takip hastalarının üriner CRK konsantrasyonları arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir.



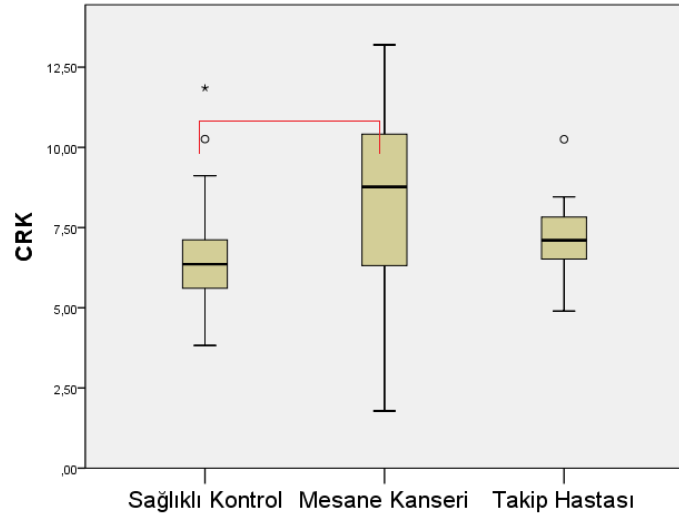
Şekil 28: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip örneklerindeki üriner Ape1/Ref1 konsantrasyonları.



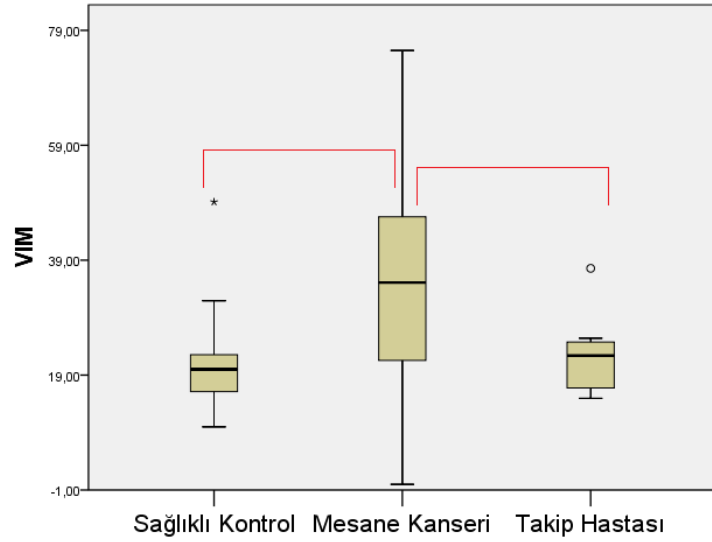
Şekil 29: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip örneklerindeki üriner BLCA4 konsantrasyonları.

VIM konsantrasyonları mesane kanseri örneklerinde sağlıklı kontroller ve takip hastalarının yaklaşık 2 katıdır ($p=0,000013$ ve $p=0,005$) (Şekil 31, Tablo 33). Sağlıklı kontroller ile takip hastalarının üriner VIM konsantrasyonları arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir.

Üriner NMP22 ekspresyonlarının dağılımında gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir.

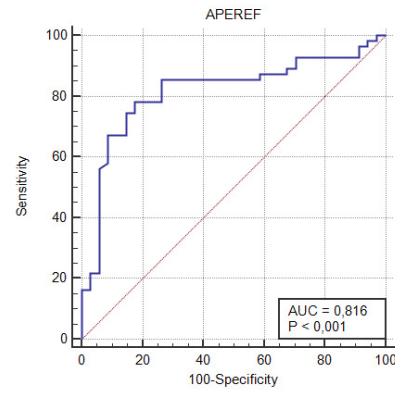


Şekil 30: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip örneklerindeki üriner CRK konsantrasyonları.



Şekil 31: Sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip örneklerindeki üriner VIM konsantrasyonları.

Üriner proteinlerin mesane kanseri için tanısal değerinin aranmasında mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollere ait konsantrasyon değerleri ROC eğrisi ile incelenmiştir (Şekil 32). Buna göre Ape1/Ref1 mesane kanseri tanısında tanı değeri en yüksek proteindir (AUC=0,816, $p<0,0001$, duyarlılık %78 ve özgüllük %82 Ape1/Ref1 >6,27 için).



Area under the ROC curve (AUC)

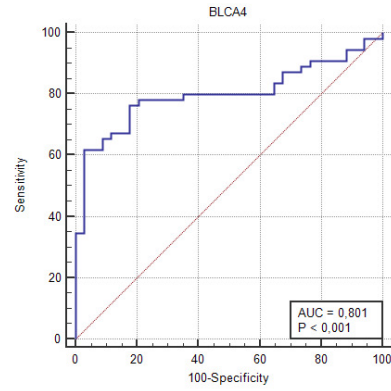
Area under the ROC curve (AUC)	0,816
Standard Error ^a	0,0481
95% Confidence interval ^b	0,720 to 0,890
z statistic	6,571
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,6053
Associated criterion	>6,27
Sensitivity	78,18
Specificity	82,35



Area under the ROC curve (AUC)

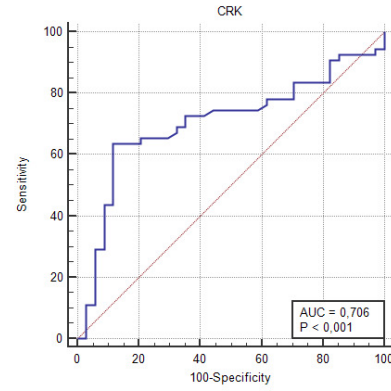
Area under the ROC curve (AUC)	0,801
Standard Error ^a	0,0476
95% Confidence interval ^b	0,702 to 0,878
z statistic	6,317
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,5888
Associated criterion	>48,17
Sensitivity	61,82
Specificity	97,06



Area under the ROC curve (AUC)

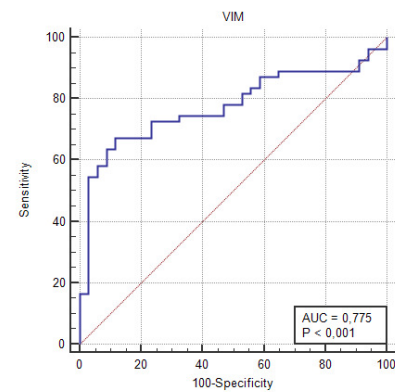
Area under the ROC curve (AUC)	0,706
Standard Error ^a	0,0574
95% Confidence interval ^b	0,600 to 0,798
z statistic	3,580
Significance level P (Area=0.5)	0,0003

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,5187
Associated criterion	>7,89
Sensitivity	63,64
Specificity	88,24



Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,775
Standard Error ^a	0,0502
95% Confidence interval ^b	0,675 to 0,857
z statistic	5,485
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong et al., 1988

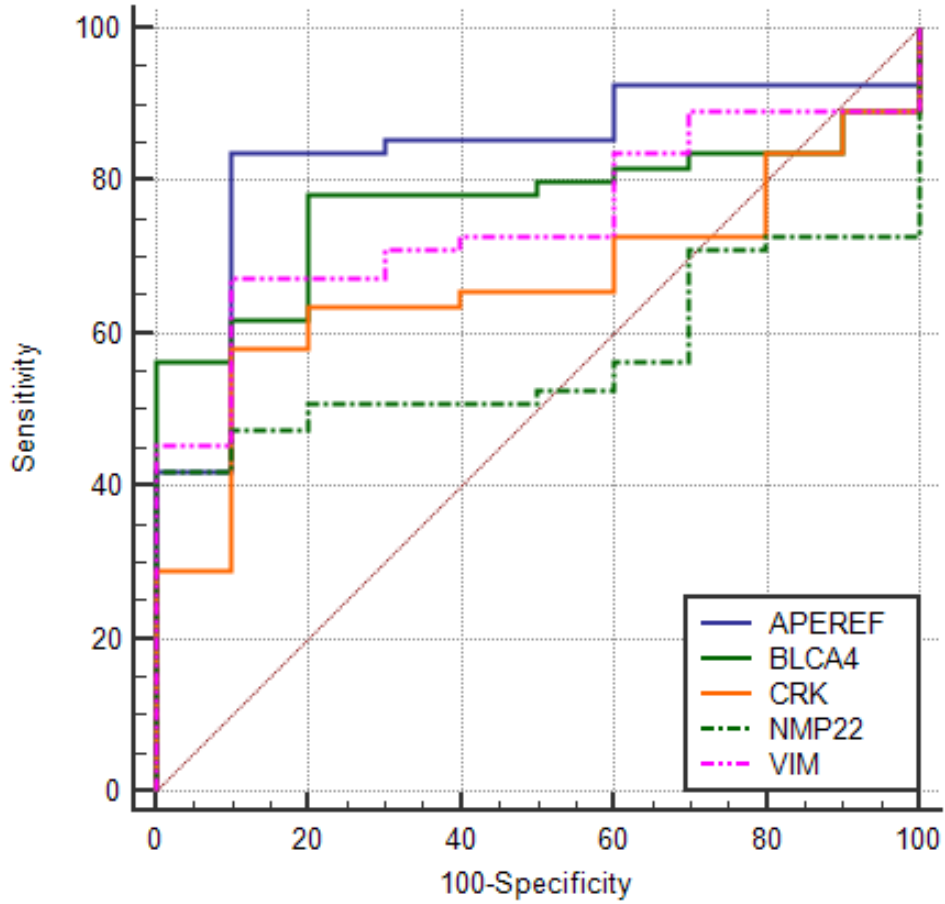
^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,5551
Associated criterion	>26,4
Sensitivity	67,27
Specificity	88,24

Şekil 32: Üriner proteinlerin tanısal değerinin araştırılmasında ROC eğrisi, kesim noktaları, duyarlılık ve özgülük değerleri.

Üriner protein ekspresyonlarının takip hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırma gücü de ROC eğrisi ile incelendi ve 0,5'e yakın AUC değerleri elde edildi. Bu durum takip hastalarının sağlıklı kontrollere büyük oranda benzerlik gösterdiğini belirtir. Takip hastalarının ekspresyon değerleri ve mesane kanseri hastalarının ekspresyon değerleri incelendiğinde Ape1/Ref1 (AUC=0,836), BLCA4 (AUC=0,771), VIM (AUC=0,747) ekspresyonlarının mesane kanseri hastalarını takip hastalarından ayırma gücüne sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 33).



Variable	AUC	SE ^a	95% CI ^b
APEREF	0,836	0,0614	0,724 to 0,917
BLCA4	0,771	0,0583	0,650 to 0,866
CRK	0,664	0,0728	0,536 to 0,776
NMP22	0,567	0,0689	0,438 to 0,690
VIM	0,747	0,0640	0,624 to 0,847

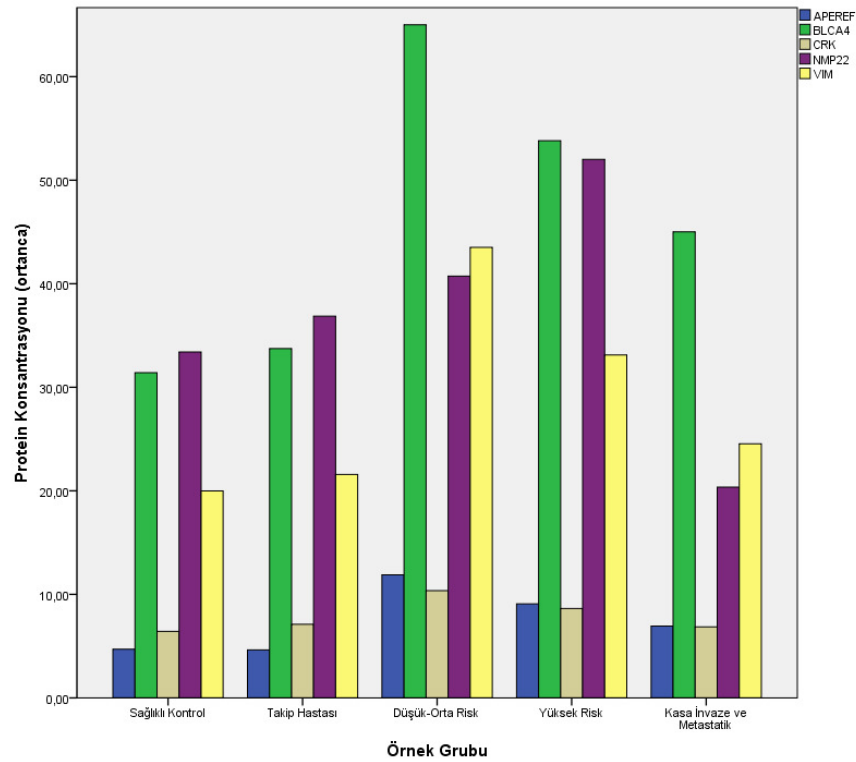
Şekil 33: Mesane kanseri hastaları ve takip hastalarının üriner protein konsantrasyonlarına ilişkin ROC eğrileri.

Hasta sayılarının mesane kanseri risk gruplarına göre dağılımı ve hasta gruplarındaki konsantrasyonların ortanca değerleri tabloda özetlenmiştir (Tablo 34

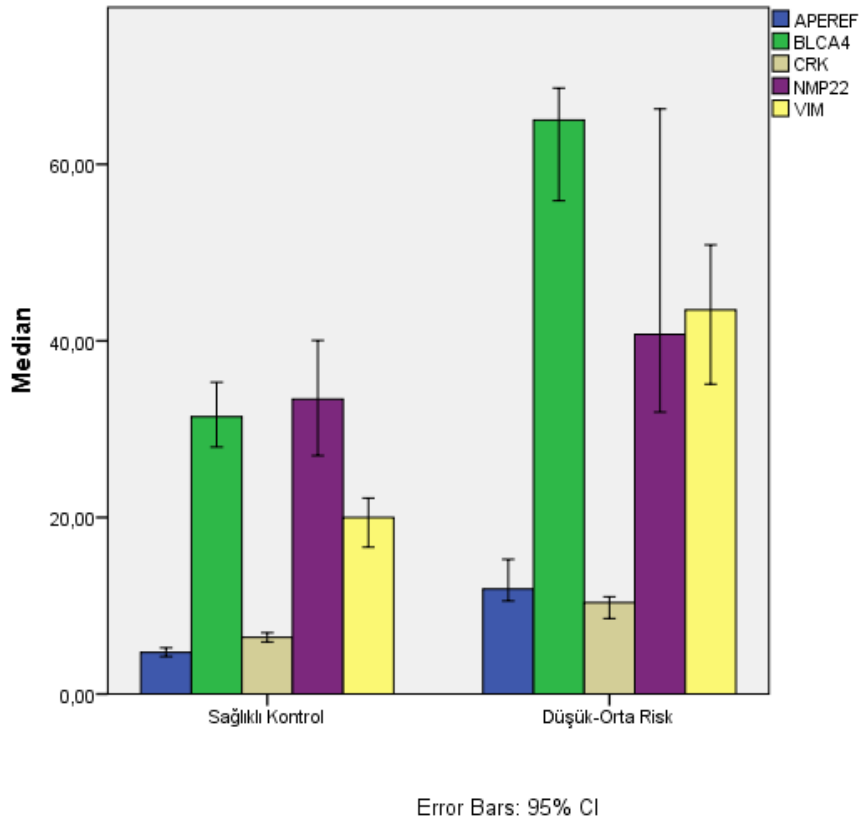
ve Şekil 34). Konsantrasyonlar mesane kanseri risk grupları açısından incelendiğinde değerlerin normal dağılıma uygun olarak dağılmadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple gruplar arası ortalamaların farkı Kruskal Wallis ve ikili gruplar arası fark Mann Whitney U testi ile incelenmiş sağlıklı kontroller ve düşük orta riskli hasta grubunda CRK, Ape1/Ref1, VIM ve BLCA4 konsantrasyonlarının anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$, Şekil 34, 35 ve Tablo 35).

Tablo 34: Üriner protein konsantrasyonu incelenen örneklerin risk gruplarına göre dağılımı

Hasta Grubu	Sayı
Sağlıklı kontrol	34
Düşük orta risk grubu	18
Yüksek risk grubu	22
Kasa invaze metastatik grup	15
Takip hastaları	11



Şekil 34: Mesane kanseri risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında protein konsantrasyonları.



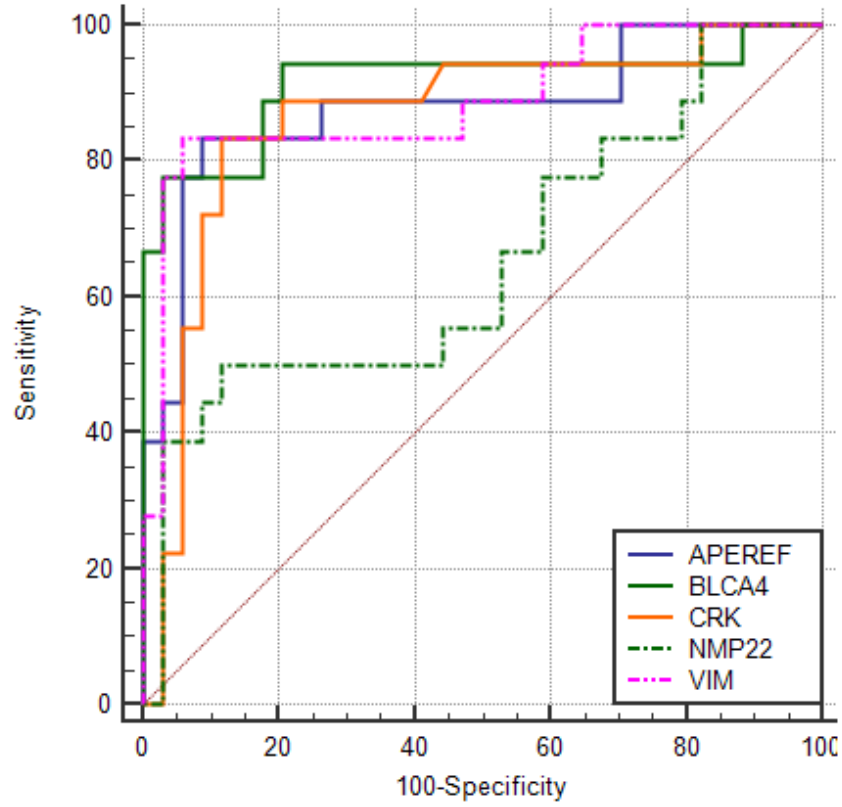
Şekil 35: Sağlıklı kontroller ve düşük orta risk grubunda protein konsantrasyonları.

Tablo 35: Sağlıklı kontroller ve düşük orta risk hasta grubu arasında konsantrasyon farkı gözlenen proteinlere ilişkin istatistiksel değerler.

		APE1/REF1	BLCA4	CRK	VIM
Sağlıklı Kontrol	Ortanca	4,76	31,43	6,43	20,02
	Standart sapma	2,45	10,44	2,25	7,24
	Çeyrekler Açıklığı	1,89	11,06	1,54	7,06
Düşük-Orta Risk	Ortanca	11,88	65,01	10,36	43,51
	Standart sapma	4,19	18,36	2,23	16,01
	Çeyrekler Açıklığı	5,63	19,26	2,93	17,44
p		0,000008	0,000002	0,000023	0,000005

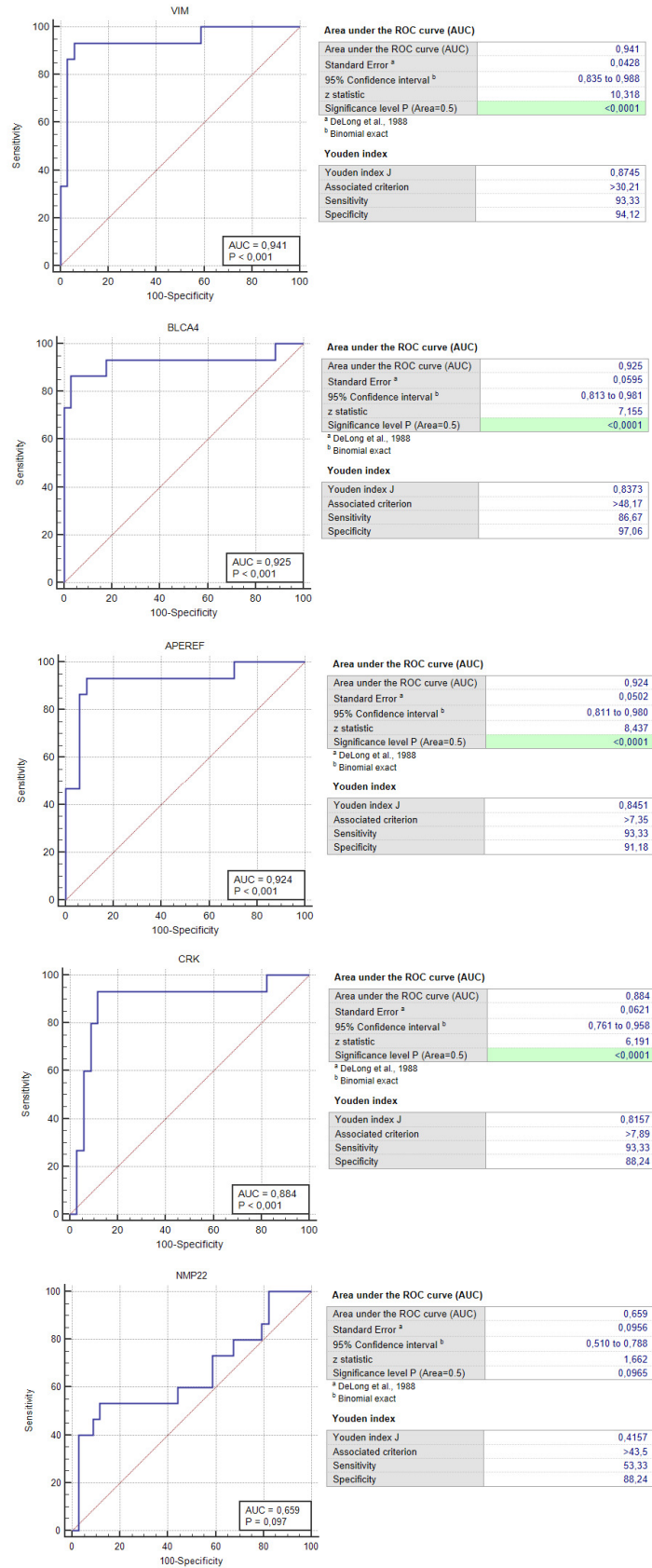
Üriner proteinlerin mesane kanseri risk grupları arasındaki tanısal değerinin incelenmesi için mesane kanseri alt gruplarının ROC eğrileri incelenmiş ve en yüksek özgüllük ve duyarlılığın; BLCA4 (AUC=0,917), VIM (AUC=0,887), APE1/REF1 (AUC=0,881) ve CRK (AUC=0,865) proteinleri ile düşük orta risk grubu hastaların sağlıklı kontrollerden ayrılmasında elde edildiği gözlenmiştir.

(Şekil 35). Sağlıklı kontroller ve düşük orta risk grubu hastalar arasında en iyi ayrımı sağlayan BLCA4, VIM, Ape1/Ref1 ve CRK konsantrasyonlarının ROC eğrileri, kesim değerleri, duyarlılık ve özgüllükleri Şekil 36 ve düşük risk grubunun sağlıklı kontrollerden ayrılmasına ilişkin veriler şekil 37’de gösterilmiştir.



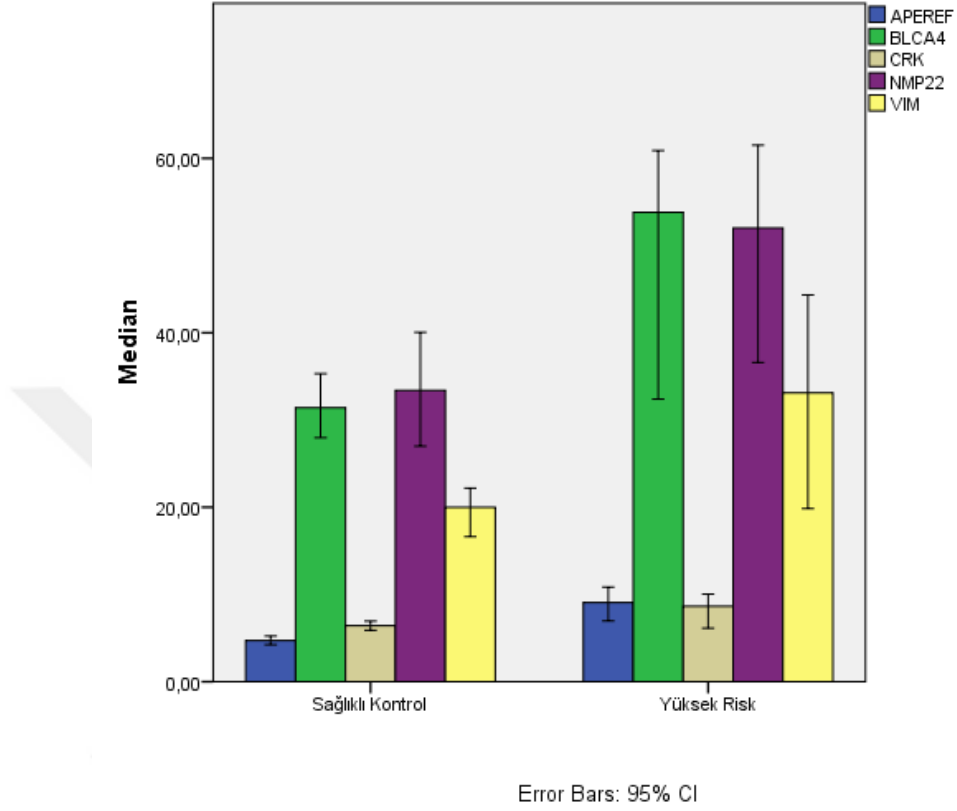
Variable	AUC	SE ^a	95% CI ^b
APEREF	0,881	0,0573	0,761 to 0,954
BLCA4	0,917	0,0516	0,806 to 0,975
CRK	0,865	0,0587	0,742 to 0,944
NMP22	0,655	0,0864	0,511 to 0,782
VIM	0,887	0,0551	0,769 to 0,958

Şekil 36: Sağlıklı kontroller ve düşük orta riskli mesane kanseri hastaları arasında üriner proteinlerin ROC eğrileri ve istatistiksel değerleri.



Şekil 37: Düşük risk grubu mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontroller arasında tanısal değeri en yüksek olan proteinlere ilişkin istatistiksel değerler.

Sağlıklı kontroller ve yüksek risk grubunda CRK, Ape1/Ref1, VIM ve BLCA4 konsantrasyonlarının anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 38 ve Tablo 36).

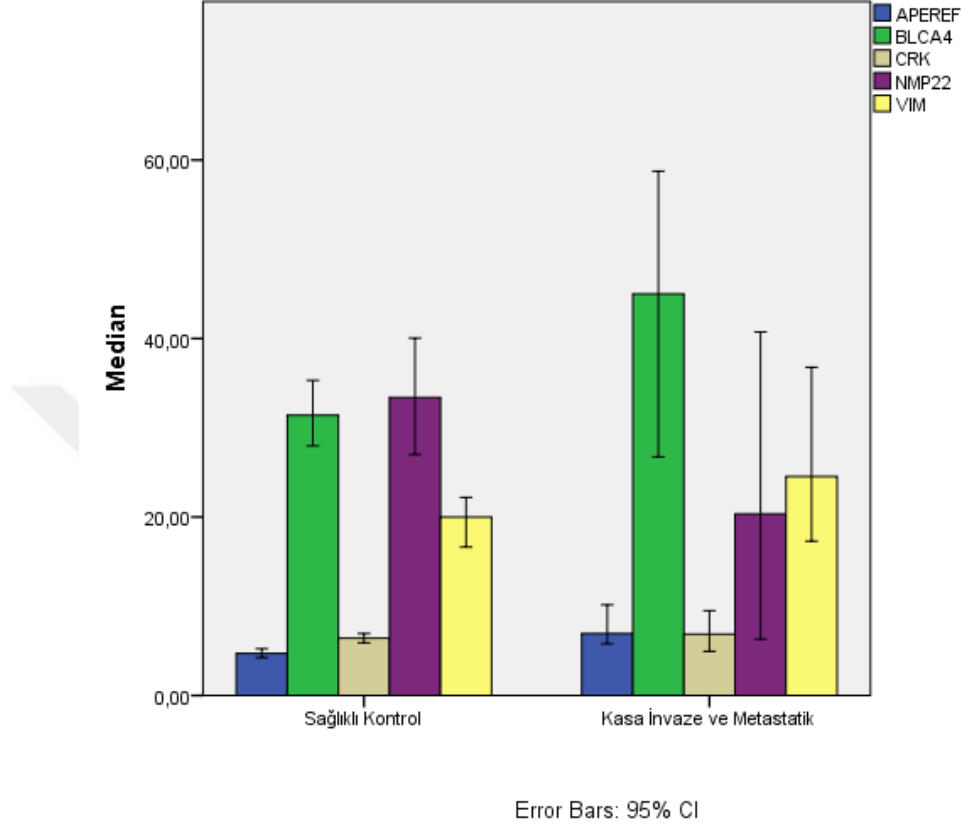


Şekil 38: Sağlıklı kontroller ve yüksek riskli mesane kanseri hasta grubunda üriner protein konsantrasyonları.

Tablo 36: Sağlıklı kontroller ve yüksek risk hasta grubu arasında konsantrasyon farkı gözlenen proteinlere ilişkin istatistiksel değerler.

		APE1/REF1	BLCA4	CRK	VIM
Sağlıklı Kontrol	Ortanca	4,7077	31,4082	6,4234	19,9874
	Standart sapma	2,48308	10,59561	2,28090	7,35537
Yüksek Risk	Ortanca	9,0772	53,8096	8,6423	33,1144
	Standart sapma	3,59181	18,14191	2,39256	12,89210
	p	0,00018	0,001	0,016	0,001

Sağlıklı kontroller ve kasa invaze metastatik hasta grubu arasındaki üriner protein konsantrasyonları incelendiğinde iki grup arasında yalnızca Ape1/Ref1 konsantrasyonunda fark olduğu gözlenmiştir ($p=0,005$). (Şekil 39 ve Tablo 37).



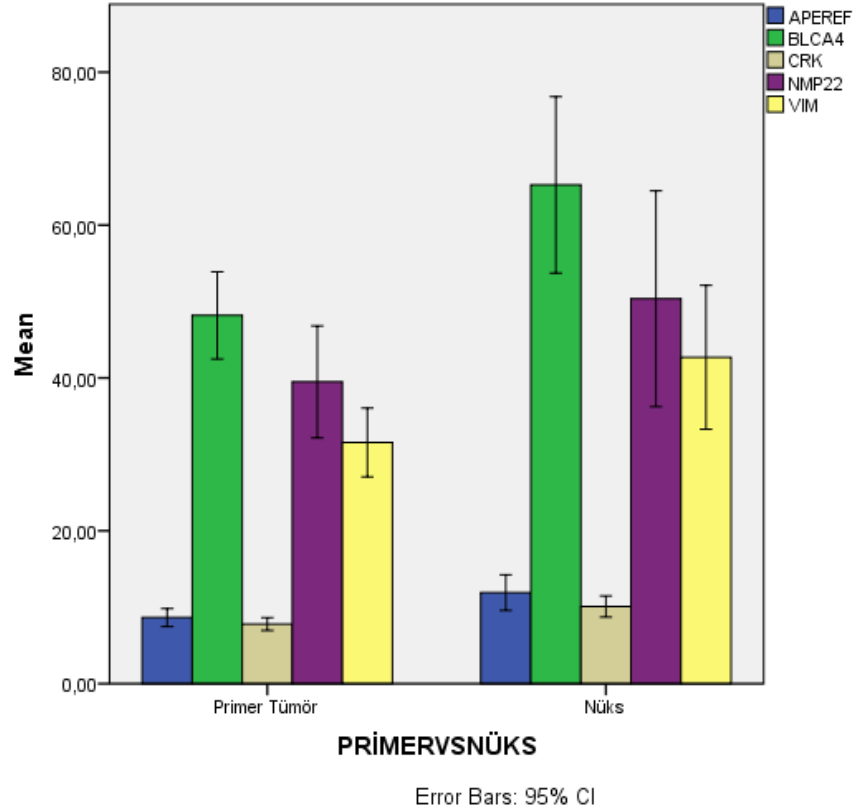
Şekil 39: Sağlıklı kontroller ve kasa invaze metastatik hasta grubunda üriner protein konsantrasyonları.

Tablo 37: Sağlıklı kontroller ve kasa invaze metastatik hasta grubu arasında konsantrasyon farkı gözlenen proteinlere ilişkin istatistiksel değerler.

APE1/REF1		
Sağlıklı Kontrol	Ortanca	4,7077
	Standart sapma	2,48308
Kasa invaze metastatik	Ortanca	6,9365
	Standart sapma	3,64585
$p=0,005$		

Sağlıklı kontroller ve takip hastaları arasında üriner protein konsantrasyonları açısından herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir.

Üriner protein konsantrasyonları primer ve nüks hastaları açısından incelendiğinde konsantrasyonların normal dağıldığı tespit edilmiştir. Bu sebeple gruplar arası fark T testi ile incelenmiştir. Şekil 40 primer tümörü olan hastaların ve nüks hastalarının üriner protein konsantrasyonlarını göstermektedir. CRK, VIM, Ape1/Ref1 ve BLCA4 konsantrasyonlarının iki grup arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 38).



Şekil 40: Primer tümör ve nüks hastalarında üriner protein konsantrasyonları.

Tablo 38: Primer tümör hastaları ve nüks hastaları arasında konsantrasyon farkı gözlenen proteinlere ilişkin istatistiksel değerler.

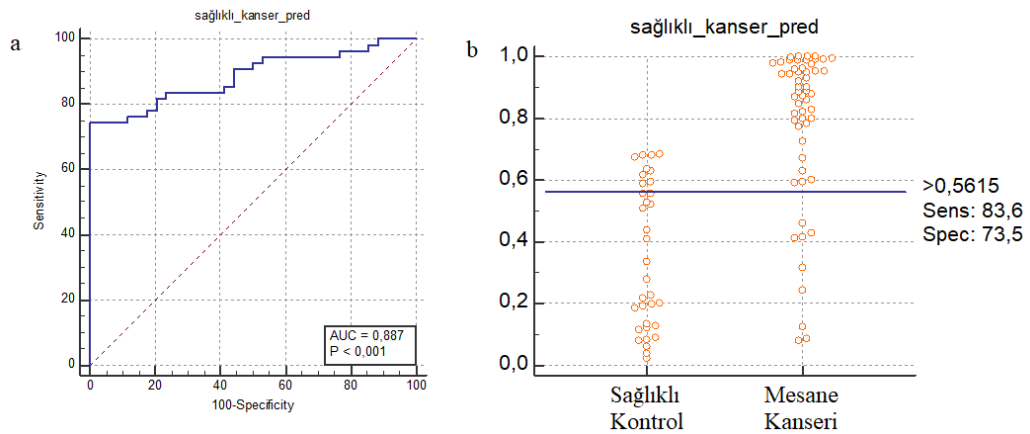
		APE1/REF1	BLCA4	CRK	VIM
Primer Tümör	Ortanca	8,1908	49,4436	8,5549	30,8605
	Standart sapma	3,60770	17,59129	2,59363	13,86756
Nüks	Ortanca	13,6469	58,7899	10,5184	44,2144
	Standart sapma	4,36414	21,67498	2,58622	17,66797
	p	0,011	0,02	0,004	0,030

10.4. Tanısal Model Geliştirilmesi

Mesane kanseri hastaları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarında ürün ekzozomal miRNA ekspresyonları ve üriner protein konsantrasyonları incelenmiş bunların tanısal ya da prognostik güçleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçların matematiğe yansıtılması ve bir olasılık oranı verilmesi için lojistik regresyon analizi yapılmıştır. Lojistik regresyon modelinin veriye uyumu Hosmer ve Lemeshow testi ile incelenmiştir ($p=0,1485$), sonucun 0,05 değerinden büyük olması model ve veri arası uyumun yeterli seviyede olduğunu göstermektedir (Çokluk, 2010). Elde edilen lojistik regresyon modeli aşağıda formülleştirilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{logit}(p = BC) = & -4,91506 + (miR - 139 - 5p. var. yok * 1,95971) \\ & + (miR - 136 - 3p. var. yok * 1,52176) - (miR - 19b1 - 5p. var. yok * 2,13905) \\ & + (BLCA4 * 0,11727) \end{aligned}$$

Lojistik regresyon sonuçları ROC eğrisi ile incelendiğinde elde edilen panelin AUC=0,887 değerine sahip olduğu, (%95 güven aralığı (CI), 0,802-0,944 ve Şekil 41) panelin >0,5615 eşik değeri için duyarlılık ve özgüllüğünün sırasıyla %83,6 ve %73,5 olduğu tespit edilmiştir. Şekil 39’da ROC eğrisi ve ROC eğrisine ilişkin nokta diyagramı verilmiştir. Diyagramın eşik değeri olan 0,5615 için mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollerin ayrımı izlenmektedir.



Şekil 41: Üriner miRNA’lar ve BLCA4 paneli ile mesane kanseri tanısının ROC eğrisi (a) ve nokta diyagramı (b).

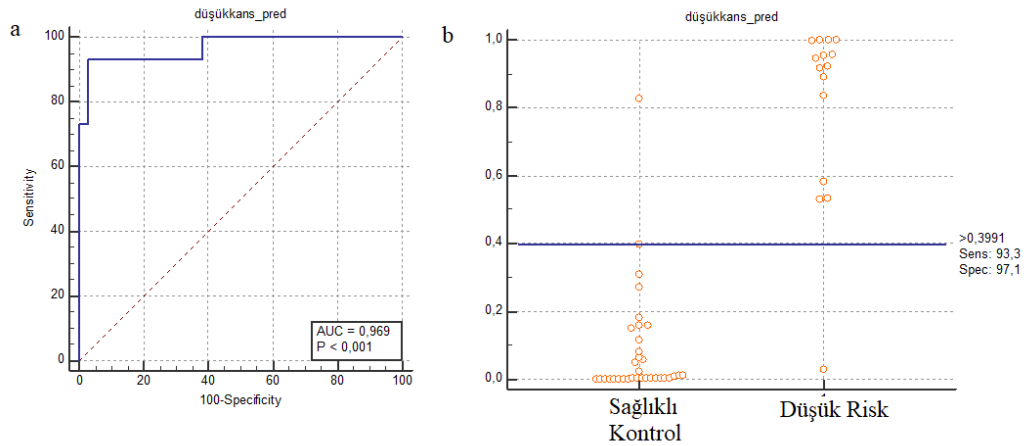
Tüm kanserlerde olduğu gibi mesane kanserlerinde de erken evrede teşhis büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple düşük risk grubundaki hastaların sağlıklı kontrollerden ayrımını sağlayacak bir lojistik regresyon modeli araştırılmıştır. Ürün

ekzozomal miRNA ve üriner protein konsantrasyonları kullanılarak aşağıdaki regresyon modeli elde edilmiştir.

$$\text{logit}(p = BC) = -12,93134 + (miR - 136 - 5pvar.yok * 3,8585) + (BLCA4 * 0,233371)$$

Lojistik regresyon modelinin veriye uyumu Hosmer ve Lemeshow testi ile incelenmiştir ($p=0,8042$), sonucun 0,05 değerinden büyük olması model ve veri arası uyumun yeterli seviyede olduğunu göstermektedir.

Lojistik regresyon sonuçları ROC eğrisi ile incelendiğinde ekzozomal miR-varlığı ve üriner BLCA4 konsantrasyonu kullanılarak düşük risk hasta grubunun sağlıklı kontrollerden ayrılması için elde edilen panelin AUC=0,969 değerine sahip olduğu, (%95 güven aralığı (CI), 0,874-0,998, Şekil 40) panelin duyarlılık ve özgüllüğünün sırasıyla %93,3 ve %97,1 olduğu tespit edilmiştir. Şekil 42’de ROC eğrisi ve ROC eğrisine ilişkin nokta diyagramı verilmiştir. Diyagramın eşik değeri olan 0,3991 için düşük risk mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollerin ayrımı izlenmektedir.



Şekil 42: Elde edilen panelin düşük risk hasta grubu ve sağlıklı kontrollerin ayrımı için ROC eğrisi ve nokta diyagramı.

11.TARTIŞMA ve SONUÇ

Mesane kanseri (BC), dünyada en sık gözlenen kanserler arasında 10'uncu sırada yer alan, tanı ve takibi pahalı girişimsel yöntemler gerektiren, dünya sağlık ekonomisinde büyük yer tutan bir kanserdir (Bray ve ark., 2018). Erken tanı diğer kanserlerde olduğu gibi mesane kanserinde de hayat kurtarıcıdır, olgular NMIBC evresinde tanı almakla birlikte MIBC'e geçiş oranı, 5 yıllık nüks oranı oldukça yüksektir (Tinay ve Mungan, 2017). Mesane kanseri hastalarının yaşam kalitesinin yükseltilmesi, hasta konforunun artırılması, ekonomik yükün azaltılması ve her ne kadar altın standart tanı yöntemi de olsa her zaman kesin sonuçlar vermeyen sistoskopi ve idrar sitolojisi çıkmazının aşılabilmesi için üriner biyomarkerlar mesane kanseri tanı ve takibi için büyük önem taşımaktadır (Andreu ve ark., 2017; X. Liu ve ark., 2017; Sapre ve ark., 2016; Schmidt ve ark., 2016; Soria ve ark., 2018; Tan ve ark., 2018). Bu sebeple mesane kanseri üriner biyobelirteçleri oldukça yoğun çalışılmaktadır. 23 Aralık 2018 itibari ile Pubmed'de "bladder cancer urinary biomarker" anahtar kelimeleri ile listelenen bilimsel yayın sayısı 6399'dur (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=bladder+cancer+urinary+biomarker>).

miRNA'lar hedef mRNA'nın ifadesini düzenleyerek onkogenik veya tümör supressör rol oynayabildiğinden farklı kanser tiplerinin gelişimi, tanı ve takibi açısından yoğun olarak incelenmektedir. Mesanede depolanması açısından mesane kanseri için idrar oldukça iyi bir inceleme materyalidir. 2010 yılında Hanke ve arkadaşları idrardaki miRNA'ların mesane kanseri tanısında kullanımına ilişkin çalışmalarını yayınladıktan sonra mesane kanserinde üriner miRNA'ların diyagnostik ve prognostik biyomarker potansiyelleri üzerine çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (Hanke ve ark., 2010). Farklı idrar fraksiyonlarında farklı miRNA'lar incelenmektedir. Bunların birbirine göre çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. Her ne kadar son zamanlarda yapılan bir değerlendirmede, miRNA biyomarker çalışmalarında idrar fraksiyon çeşidinden ziyade tek miRNA ya da bir grup miRNA kullanılması durumunda özgüllük ve duyarlılıkların değiştiği belirlenmiş olsa da bu konu henüz araştırılması bitmemiş tazelikte bir konudur (Kutwin ve ark., 2018).

Yakın gelecekte herhangi bir idrar fraksiyonunun tanısal anlamda diğerine avantajı belirlenebilir. Çalışmamızda miRNA kaynağı olarak üriner ekzozomları kullandık bunun 2 ana amacı vardı. Birincisi üriner ekzozomlarda miRNA'ların fizyolojik koşullara göre daha korunmuş olarak bulunması ve ikincisi ekzozomların rasgele hücrel veziküller olmayıp çeşitli hücrel olaylardan hem etkilenmesi hem de hücreler arası haberleşme gibi çeşitli hücrel süreçleri etkilemesi (Andreu ve ark., 2017; Crossland ve ark., 2016; X. Liu ve ark., 2017; Soung ve ark., 2016; H. Zhou ve ark., 2006).

81 mesane kanseri hastasının idrar miRNA profillerinin incelendiği bir çalışmanın ilk basamağında miR-16'nın da içinde bulunduğu bir grup miRNA'nın mesane kanseri tanısında kullanılabileceği tespit edilmiştir. Ancak araştırmanın ikinci basamağı olan doğrulama çalışmalarında miR-16, -21 ve 200c'nin sağlıklı kontroller ve mesane kanseri hastalarında benzer düzeylerde eksprese olduğu belirlenmiştir (Sapre ve ark., 2016). Ancak sağlıklı bireyler ve mesane kanseri hastalarının vücut sıvılarında miRNA ekspresyonlarının incelendiği başka bir çalışmada miR-16'nın 3 mesane kanseri hastasından yalnızca 1 tanesinin idrarında eksprese edildiği, miR-21'in ise mesane kanseri örneklerinde eksprese olmasına rağmen sağlıklı kontrollerde eksprese edilmediği tespit edilmiştir (Weber ve ark., 2010). İlerleyen zamanlarda yapılan bir çalışmada miR-16'nın mesane kanseri hastalarının doku, ekzozom, plazma ve beyaz kan hücrelerinde en fazla eksprese edilen miRNA'lar arasında yer aldığı belirlenmiştir (Armstrong ve ark., 2015). Son zamanlarda Lange ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise miR-16'nın üriner miRNA'ların analizinde kullanılabilecek en stabil kontrol miRNA'larından olduğu tespit edildiyse de bu çalışmada örnek grubu böbrek hastalarında oluşmaktadır bu sebeple çalışmamızda miR-16-5p'yı referans olarak kullanmadık ancak örnekler arası ekspresyonunu inceledik (Lange ve ark., 2017). Bizim çalışmamızda da referans miRNA olarak yaygın kullanılan RNU48 ve U6 kullanılmıştır.

Çalışmamızda toplam 105 idrar örneğinin 66'sında ekzozomal miR-136-3p ekspresyonu saptanamamıştır. Ekzozom izolasyonu veya ekspresyon deneylerinde sorun olabileceği düşünülerek deneyler tekrar edilmiş ancak 66 örnekte kontrol miRNA'ları Ct vermesine rağmen miR-136 için CT değeri elde edilememiştir. Yani örneklerin yaklaşık olarak % 37'si miR-136-3p eksprese etmiştir. Örnek grupları

açısından bakıldığında mesane kanseri örneklerinin %44'ü, sağlıklı kontrollerin %23'ü ve takip hastalarının %42'si miR-136-3p eksprese etmiştir. 34 sağlıklı kontrolün 8'inde miR-136-3p ekspresyonu saptanmıştır. Bu sonuç istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir ($p=0,134$). Takip hastaları ile mesane kanseri hastaları ya da sağlıklı kontroller arasında herhangi bir anlamlı fark bulunamamıştır. Kanserlerde miR-136-3p görece az çalışılmış bir miRNA'dır, üriner miR-136-3p ekspresyonun incelendiği tek çalışmada Weber ve arkadaşları miR-136-3p'nin kansere özgü bir karakter olduğunu, sağlıklı bireylerin idrar örneklerinde miR-136-3p ekspresyonu olmadığı tespit edildiyse de çalışmamız bu bulguyu çürütmüştür (Weber ve ark., 2010). Elde ettiğimiz sonuçlar mesane kanseri hastalarında miR-136-3p eksprese edenlerin sağlıklı kontrollere oranla daha fazla olduğunu işaret etse de miR-136-3p'nin yalnızca mesane kanseri hastalarında eksprese edildiğini söylemek yanlış olur.

Literatürde miR-136-3p'nin metastaz ve mesane kanseri ile ilişkisinin incelendiği bir çalışma yoktur ancak farklı kanserlerde metastaz ile ilişkisi incelenmiştir. Gastrik kanserlerde upregule olduğu, proliferasyon ve invazyonu tetiklediği (X. Chen, Huang, ve Chen, 2018), kolon kanserlerinde epitelyal mezankimal geçişi engelleyip metastazı baskıladığı ve tümör supressör miR-136-3p'nin kolon kanserlerinde down regule olduğu tespit edilmiştir (H. Ren, Qi, Yin, ve Gao, 2017). Melanoma hücrelerinde de miR-136-3p'nin invazyon, migrasyon ve proliferasyonu baskıladığı apoptozu tetiklediği gözlenmiştir. Yine melanoma hastalarında da down regülasyonu söz konusudur (J.-J. Wang ve ark., 2017). Çalışmamızda miR-136-3p eksprese eden örneklerin ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontroller ya da mesane kanseri hastaları ve takip hastalarının ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Ancak mesane kanseri risk grupları açısından ekspresyonlar incelendiğinde en yüksek miR-136-3p ekspresyonunun yüksek risk mesane kanseri grubunun idrar örneklerinde, en düşük ekspresyonun ise kasa invaze metastatik grupta olduğu gözlenmiştir. Düşük orta riskli hasta grubunun miR-136-3p ekspresyonu kasa invaze metastatik grubun yaklaşık 13 katı ve yüksek riskli hasta grubunun ekspresyonu kasa invaze metastatik hasta grubunun yaklaşık 30 katıdır (sırasıyla $p=0,023$ ve $0,002$). Bu bulgu literatürdeki kolon kanseri ve melanoma

hücrelerinde miR-136-3p'nin down regule olduğu ve upregule edilmesi durumunda metastaz ve invazonu baskıladığı bulgusu ile kısmen örtüşmektedir (H. Ren, Qi, Yin, ve Gao, 2017; J.-J. Wang ve ark., 2017) ancak bizim bulgularımız mesane kanserinde tam bir down regülasyonu işaret etmemektedir. Aksine her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında düşük orta risk, yüksek risk ve takip hastası gruplarının miR-136-3p ekspresyonları artmıştır.

Çalışmamızda mesane kanseri risk grupları, sağlıklı kontroller ve takip hastalarını miR-136-3p eksprese edip etmemelerine göre var/yok şeklinde değerlendirdiğimizde; kasa invaze metastatik grupta miR-136-3p eksprese eden örnek yüzdesinin (%62,5), sağlıklı kontrollerde (%23,5), düşük orta risk hasta grubunda (%31,6) ve yüksek risk hasta grubunda (%41,7) daha yüksek olduğunu ve sağlıklı kontroller ile kasa invaze metastatik grup arasındaki farkın anlamlı olduğunu gözlemledik ($p=0,017$). miR-136-3p eksprese eden ve etmeyen örnek yüzdelерinin bir trendi olup olmadığını incelediğimizde sağlıklı kontrolden, kasa invaze metastatiğe gidildikçe miR-136-3p eksprese etme yüzdesinin anlamlı düzeyde arttığını tespit ettik ($p=0,0073$). Elde edilen bulgular miR-136-3p ekspresyonunun kanserde artması ya da azalmasından ziyade invazyon ve metastaz açısından değerlendirilmesi gerektiğinin altını çizmektedir. İnvazif grupta bu denli baskılanması, ancak ekspresyon gözlenen örnek yüzdesinin sağlıklı kontrollerden fazla olması hatta bunun bir trendi olması miR-136-3p'nin invazyon ve metastaz ile güçlü bir ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir. miR-136-3p'nin AEG1 ve BCL2 genlerini hedeflediğine dair bulgular vardır (Yu ve ark., 2018). AEG1, H-Ras aracılı onkogeneze ve anjiyogeneze yer almaktadır, BCL2 ise apoptotik ölümü baskılayan mitokondriyal membran proteini kodlamaktadır (Emdad ve ark., 2009) ancak miR-136-3p'nin biyoinformatik yazılımları ile tespit edilen, kanser gelişimi, invazyon ve metastaz ile ilişkili yüzlerce olası hedefi vardır. Bunlar henüz doğrulanmamış olmakla birlikte miR-136-3p'nin tümörögenезin yanısıra invazyon ve metastaz ilişkili çok sayıda geni hedefleme olasılığı oldukça yüksektir.

Toplam 105 idrar örneğimizin 100'ünde miR-210-3p ekspresyonu ekspresyonu saptadık. Bu örneklerin ekspresyon seviyelerini kıyasladığımızda miR-210-3p ekspresyonunun mesane kanseri hastalarının üriner ekzozomlarında

kontrole göre yaklaşık 4 kat arttığını tespit ettik ($p=0,049$). Elde edilen bu bulgu literatürle kısmen tutarlılık göstermektedir. miR-210-3p ekspresyonunun mesane kanseri hastalarının idrarında kontrole göre arttığı hatta tanı koymada idrar sitolojisinden üstün olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Eissa, Matboli, Hegazy, ve ark., 2015). Ancak miR-210-3p'nin mesane kanseri hastalarının üriner ekzozomlarında incelendiği bir çalışma yoktur. Eissa ve arkadaşları idrar pelletinden RNA izole ettikten sonra miR-210-3p seviyesini RT-PCR ile incelemiş ve miR-210-3p ekspresyonunun mesane kanseri hastalarının idrar pelletinde sağlıklı kontrollerden daha fazla eksprese edildiğini saptamıştır (Eissa, ve ark., 2015). Farklı bir çalışmada renal hücre karsinomlarında ve sağlıklı kontrollerde üriner miR-210-3p ekspresyonları incelenmiş, hasta grubunda kontrole göre daha yüksek ekspresyon olduğu, hatta tümörün çıkarılmasını takiben takip hastalarında sağlıklı kontrollerden de düşük ekspresyon olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla üriner miR-210-3p ekspresyonunun renal hücre karsinomlarında sadece tanısal biyomarker değil aynı zamanda tedavi yanıtı ve tümörün tamamen çıkarılıp çıkarılmadığını öngörecektir bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. Petrozza ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada ekzozomal miRNA'lar incelenmemiş idrardan total RNA izolasyonu yapılmıştır (Petrozza ve ark., 2017). Mesane kanseri hastalarının üriner ekzozomlarında miR-210-3p ekspresyon seviyesinin arttığını belirledikten sonra tanısal gücünü incelemek ROC eğrisi analizi yaptık. Buna göre miR-210-3p ekspresyonu mesane kanseri tanısında yeterince duyarlı bir biyobelirteç değildir ($AUC=0,616$). Primer tümörler ve nüks hastaları ekzozomal miR-210-3p eksprese edip etmemelerine göre incelendiğinde primer tümörü olan 42 hastanın tümünde nüks hastalarının ise yaklaşık %76'sında (17 hastadan 13'ü) ekspresyon gözlemlendiği ve bu farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p=0,0052$). Literatürde miR-210-3p ekspresyonunun primer ve nüks hastalarının idrar örneklerinde incelendiği bir çalışma yoktur. Ancak prostat kanseri hücrelerinde onkogenik özellik taşıdığı, EMT ve kemik metastazını arttırdığı belirlenmiştir (D. Ren ve ark., 2017). Akciğer kanseri ve renal hücre karsinomlarında nüks ile ilişkisi araştırılmış ancak bir ilişki saptanamamıştır (Duncavage, Goodgame, Sezhiyan, Govindan, ve Pfeifer, 2010; Osanto ve ark., 2012). Primer tümörü olan hastalar ve nüks hastalarının miR-210-3p eksprese eden örnek yüzdeleri istatistiksel anlamda

farklılık gösterse de nüks hastaları yalnızca 17 kişiyken primer tümör hastalarının 42 kişi olması verinin güvenilirliğini azaltmaktadır. Daha kalabalık bir hasta grubunda incelenmesi farklı sonuçlar doğurabilir.

miR-21, mesane kanseri hastalarının tümör dokusu, beyaz kan hücreleri ve üriner ekzozomlarında eksprese edildiği belirlenmiş bir miRNA'dır (Armstrong ve ark., 2015). Tümör ile idrar ekzozomlarında aynı anda eksprese edilmesi idrarın non invazif likit biyopsi değerini artırır ancak çalışmamızda 105 idrar örneğinin tümünde miR-21-5p ekspresyonu saptanmasına rağmen sağlıklı kontroller ve mesane kanseri hastaları arasında, mesane kanseri risk grupları ve kontroller arasında ya da primer ve nüks hastaları arasında her hangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir.

Çeşitli çalışmalarda miR-139-5p'nin mesane kanseri dokularında down regule olduğu bildirilmiştir (Ratert ve ark., 2013; Yonemori ve ark., 2016). Mesane kanseri hücrelerinde hücre göçü ve invazyonu inhibe eden tümör supressör miRNA görevini üstlendiği, Bmi1 proteinini hedefleyerek kanser kök hücre yenilenmesini inhibe ettiği de diğer çalışmalarda elde edilen bulgular arasındadır (Luo ve ark., 2017). Ayrıca MMP11 geni, miR-139-5p'nin direkt hedefidir ve mesane kanseri hastalarında yüksek MMP11 ekspresyonunun daha kısa sağ kalımı öngörebildiği tespit edilmiştir (Yonemori ve ark., 2016). Dolayısıyla mesane kanserinde iyi bir prognostik marker olabileceği düşünülmektedir. Çalışma grubumuz miR-139-5p ekspresyonu açısından incelendiğinde sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip grubu arasında ekspresyon seviyesi açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Ekspresyon seviyelerini mesane kanseri risk gruplarına göre incelediğimizde kasa invaze ve metastatik hastalardan oluşan grupta miR-139-5p ekspresyonunun diğer hasta gruplarından düşük olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu ancak sağlıklı kontrollerden farklı olmadığını gözlemledik. Örneklerimiz arasında kasa invaze metastatik grup en düşük ekspresyon seviyesine sahiptir ve onu sağlıklı kontroller izlemektedir. İlginçtir ki takip hastaları en yüksek ekspresyon ortalamasına sahiptir. Düşük orta risk grubunda ve yüksek risk grubunda miR-139-5p ekspresyonu kasa invaze-metastatik gruba göre 2 kattan fazla artmıştır, bu bulgu miR-139-5p'un invazyon ve metastaz süreçlerinde yer alabileceğini desteklemektedir aynı zamanda literatürdeki; invazyonu inhibe ettiği bilgisi ile

örtüşmektedir (Ratert ve ark., 2013; Yonemori ve ark., 2016). Ancak mesane kanseri dokularında gözlenmiş down regülasyon bizim çalışmamızda ürün ekzozomal miR-139-5p açısından gözlenmemiştir.

Literatürde serum miR-139-5p ekspresyonunun kolorektal kanser ve glioblastomada nüks ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Bo ve ark., 2015; Miyoshi ve ark., 2017). Ayrıca NOTCH1 genini doğrudan hedefleyerek kanser kök hücre özelliklerini baskıladığı ve kolorektal kanserlerde çoklu ilaç direncinin önüne geçtiğine dair bulgular vardır (Xu et al., 2016). Çalışmamızda primer tümörü olan hastalar ve nüks hastalarında miR-139-5p ekspresyon yüzdeleri incelendiğinde primer tümörü olan hasta grubunda miR-139-5p eksprese edenlerin (%79) nüks (%47) ve kontrol örneklerine (%52) göre daha yüksek oranda bulunduğu ve bu farkın anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p=0,0281$ ve $p=0,0145$). Nüks örneklerinde, miR-139-5p eksprese eden örnek yüzdesinin primer tümörlerden düşük olması tümör baskılayıcı özelliğini destekler niteliktedir ancak sağlıklı kontroller ve nüks örnekleri arasında fark olmaması kafa karıştırıcıdır.

Çeşitli çalışmalarda, miR-19b1-5p'nin idrar süpernatantında eksprese olduğu (Pazourkova ve ark., 2016), mesane kanseri hastalarının doku örneklerinde kontrollere göre ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (Han ve ark., 2011). PTEN genini hedefleyen bir onkogenik miRNA olduğu da literatürdeki bulgular arasındadır (Enokida, Yoshino, Matsushita, ve Nakagawa, 2016). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, üriner total ekstrasellüler vezikül fraksiyonunun ve ekzozomların da dahil olduğu küçük ekstrasellüler vezikül fraksiyonunun miRNA ekspresyonları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Buna göre prostat kanseri hastalarının üriner ekstrasellüler veziküllerinde miR-19b ekspresyonu sağlıklı kontrollerden daha düşüktür ve idrardaki total ekstrasellüler veziküllerdeki miR-19b ekspresyonunun duyarlılık ve hassasiyeti; ekzozomlarında dahil olduğu küçük ekstrasellüler veziküllerdekinden az da olsa yüksek bulunmuştur (Bryzgunova ve ark., 2016). Çalışmamızda, örnek grupları miR-19b1-5p varlığı/yokluğu açısından ya da ekspresyon seviyesi açısından incelendiğinde sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastaları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Ancak ekspresyon seviyeleri mesane kanseri risk grupları açısından incelendiğinde, kasa invaze metastatik hasta grubunda; miR-19b1-5p ekspresyonunun düşük orta risk

grubundan ve yüksek risk grubundan daha düşük olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $p=0,05$ ve $p=0,013$). Mesane kanseri hastaları alt risk gruplarına ayırdığımızda kasa invaze grubun sağlıklı kontroller, düşük riskli hasta grubu ve yüksek riskli hasta grubundan daha düşük ekspresyona sahip olduğunu ve bu farkların anlamlı olduğunu saptadık (sırasıyla $p=0,013$; $p=0,016$ ve $p=0,002$). Bu bulgu miR-19b1-5p'nin invazyon ile ilişkisine işaret etmektedir. Kas invazyonu olan örnekler diğer tüm kanser örnekleri ile ya da sağlıklı kontrollerin de dahil olduğu tüm örnekler ile karşılaştırdığımızda; invazif grubun yine anlamlı düzeyde düşük ekspresyona sahip olduğunu gözlemledik. Yapılan değerlendirmeye göre, sağlıklı kontrollerin miR-19b1-5p ekspresyonu; invazif hastaların yaklaşık 4,3 katı ve invazif olmayan mesane kanseri örneklerinin ekspresyonu; invazif örneklerin yaklaşık 14,8 katıdır. Tüm bu bulgular miR-19'un mesane kanseri invazyonunda yer aldığını, prognostik bir belirteç olabileceğini ifade etmektedir. miR-19'un prostat kanseri hastalarının idrar örneklerinde biyokimyasal nüks açısından prognostik bir marker olabileceği daha önceki çalışmalarda da belirlenmiştir (Stuopelytė ve ark., 2016). miR-19, gliomalarda yoğunlukla incelenmiş bir miRNA'dır. Gerek miR-19a gerekse miR-19b'nin gliomalarda migrasyon, proliferasyon ve invazyonu arttırdığı, apoptozu baskıladığı literatürde yer alan bulgular arasındadır. miR-19 blokajının çoklu ilaç direncini tersine çevirebileceği de yine literatürde yer almaktadır (W. Wang ve ark., 2018).

Pazourkova ve arkadaşları miR-16-5p'nin kanda eksprese edilmesinin yanısıra idrarda da eksprese edildiği gözlemlemiştir (Pazourkova ve ark., 2016). Bir diğer çalışma, kronik böbrek hastalarının ürin ekzozomal miRNA normalizasyonunda referans miRNA olarak kullanılabileceğini önerdiyse de, bu çalışmaya 33 hasta ve 5 kontrol örneği dahil edilmiştir ve bu kadar kısıtlı bir grup ile elde edilen bu bulgu pek güvenilir olmayacaktır (Lange ve ark., 2017). Bu sebeple çalışmamızda miR-16-5p'yi referans gen olarak kullanmadık zira literatürde tümör baskılayıcı özellikleri sebebiyle çeşitli kanserlerde ekspresyonunun değiştiği de bildirilmektedir (Jiang ve ark., 2013). Çalışmamızda örneklerin tümünde miR-16-5p ekspresyonu saptanmış, ancak sağlıklı kontroller ve mesane kanseri hastaları arasında ya da mesane kanseri risk grupları arasında herhangi bir ekspresyon farkı görülmemiştir. Literatürde miR-16 ekspresyonunun, mesane kanseri hastalarının

tam idrarında kontrollere göre arttığı bulgusu vardır ancak normalizasyon idrar osmolalitesine göre yapılmıştır (Sapre ve ark., 2016).

Üriner Ape1/Ref1 konsantrasyonu mesane kanseri örneklerinde kontrol ve takip örneklerinin yaklaşık 2 katıdır ($p<0,00001$ ve $p=0,00148$). Ape1/Ref1'in mesane kanseri hastalarının serum örneklerinde arttığı ve bunun idrar için de geçerli olduğu daha önceki bir çalışmada doğrulanmıştır. Aynı çalışmada üriner Ape1/Ref1 seviyesinin nüks hastalarında daha yüksek olduğu da tespit edilmiştir. ROC eğrisine göre optimum hassasiyet ve özgüllük 0,376 ng/100 µl eşik değeri için sırasıyla %82 ve % 80 olarak bildirilmiştir (S. Choi ve ark., 2016b). Ancak bu çalışmada idrar protein konsantrasyonlarının normalizasyonuna ilişkin bir bilgi verilmemiştir. Ape1/Ref1'in mesane kanseri için serolojik bir marker olarak değerlendirildiği bir çalışmada, mesane kanseri hastalarının serumunda Ape1/Ref1 konsantrasyonunun kontrole göre arttığı ve %93 duyarlılık ve %59 özgüllük ile mesane kanseri hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırdığı belirlenmiştir (J. H. Shin ve ark., 2015). Bizim bulgularımıza göre Ape1/Ref1'in kreatinine göre normalize edilmiş eşik ekspresyon değeri 6,27 için duyarlılık %78,18 ve özgüllük %82,35 iken AUC=0,816 ve $p<0,0001$ 'dir. Bunun yanısıra düşük risk hasta grubu ile sağlıklı kontroller kıyaslandığında 7,35 ekspresyon değeri için AUC=0,924; duyarlılık %93,33 ve özgüllük %91,16 olarak hesaplanmıştır ($p<0,0001$).

Son günlerde yapılan bir çalışmada NMIBC, benign prostatik hiperplazi hastaları ve sağlıklı kontrollerin üriner ve serum BLCA-4 konsantrasyonları incelenmiş, üriner BLCA-4 seviyesinin NMIBC hastalarında diğer iki gruba göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada üriner protein konsantrasyonlarının normalizasyonuna ilişkin herhangi bir veri sunulmamıştır (Z.-Y. Wang ve ark., 2018). Normalizasyon yapılmamış olması bireylerin dehidrate olmuş olması gibi fizyolojik farklılıkların deney sonuçlarını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Çeşitli grupların çalışmalarında farklı sonuçlar elde edildiğinden bu farklılıkların gözden geçirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmaya, 1119 örneği içeren 9 yayın dahil edilmiş ve BLCA-4'ün bu çalışmalardaki kümülatif diyagnostik değeri belirlenmiştir. Buna göre mesane kanseri tanısında BLCA-4'ün hassasiyeti %93, özgüllüğü %97 ve AUC değeri 0,9607 olarak belirlenmiştir (Cai ve ark., 2015). Çalışmamızda mesane kanseri hastalarının idrar

örneklerinde BLCA-4 konsantrasyonunun sağlıklı kontrollerin ve takip hastalarının yaklaşık 2 katı kadar olduğunu tespit ettik ($p<0,000009$ ve $p=0,002$). Sağlıklı kontroller ile takip hastalarının üriner BLCA-4 konsantrasyonları arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmedi. Bu bulgular literatürle tutarlılık göstermekte ve BLCA-4'ün diyagnostik değerine işaret etmektedir, özellikle düşük riskli hasta grubunu sağlıklı kontrollerden ayırmakta oldukça duyarlı olması da diyagnostik değerine dikkat çeken bir diğer noktadır.

Literatürde mesane kanseri hastalarında CRK ekspresyonunun incelendiği herhangi bir çalışma yoktur. Ancak CRK'nın mesane kanseri hücrelerinde HGF/c-Met yolağı üzerinden EMT ve metastazı indüklediği gösterilmiştir (Matsumoto ve ark., 2015). CRK proteinini çalışmamıza dahil etmemizin altında da bu yatmaktadır. Çalışmamızda mesane kanseri EMT ve metastazında yer alan bir proteinin idrarda bulunup bulunmadığını incelemek, şayet bulunuyorsa diyagnostik açıdan ne kadar önemli olduğunu açıklığa kavuşturmak amaçlanmıştır. ELISA sonuçları CRK konsantrasyonunun mesane kanseri örneklerinde sağlıklı kontrollere ve takip hastalarına göre anlamlı düzeyde arttığını gösterdi ($p=0,002$ ve $p=0,046$). Ancak dikkat çeken önemli bir nokta elde edilen p değerlerinin, özellikle de mesane kanseri hastaları ve takip hastaları arasındaki farkın p değerinin, farkı raslantısal kılmaya çok yakın olmasıdır. Bilim dünyasının istatistiksel değerlendirmelerde $p=0,05$ yerine $p=0,01$ ve hatta $p=0,001$ değerinin kullanılmasını tartıştığı bir ortamda bu p değerleri ile CRK'nın diyagnostik değerini tartışmak yanlış olur. ROC eğrisi analizleri de bunu doğrular niteliktedir. Mesane kanseri hastaları ile sağlıklı kontrollerin CRK ekspresyonları için çizilen ROC eğrisinin $AUC=0,706$ 'dır ve bu değer oldukça düşüktür. CRK'nın, EMT ve metastaz ilişkisi sebebiyle, kasa invaze metastatik hasta grubunda üriner CRK konsantrasyonunun diğer örnek gruplarına göre daha yüksek olması beklenirdi ancak böyle bir sonuç elde edilmedi. Sağlıklı kontroller ve kasa invaze metastatik hasta grubunun idrarları arasında yalnızca APE1/REF1 konsantrasyonu açısından anlamlı fark gözlemlendi. Bu durum CRK'nın mesane kanserinde hücresel anlamda rol oynadığını ancak idrara salınımının kanserle yeterince yakın ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Düşük riskli hasta grubunun sağlıklı kontrollerden ayrılmasında üriner CRK konsantrasyonunun daha hassas ve duyarlı olduğunu gözlemledik.

ROC analizine göre AUC=0,884 ve 7,89 eşik değeri için düşük riskli hastaları sağlıklı kontrollerden %93 duyarlılık, %88 özgüllük ile ayırdığını belirledik.

VIM ve fibronektin upregulasyonu MIBC, tedaviye direnç ve kötü gidişat ile ilişkilendirilmiştir (Knowles ve Hurst, 2015). Çeşitli çalışmalarda mesane kanseri hastalarının idrar örneklerinde metilasyon seviyesi incelenmiş, metilasyonun nüks belirteci olabileceği saptanmış (Reinert ve ark., 2012), GDF15, TMEFF2, ve VIM genlerinin idrardaki metilasyon profillerinin mesane kanseri hastalarını %94 duyarlılık ve %90 özgüllük ile sağlıklı kontroller, renal kanser ve prostat kanseri hastalarından ayrılabilirdiği belirlenmiştir (Costa ve ark., 2010). Literatürde, mesane kanseri hastalarında üriner VIM konsantrasyonunun değerlendirildiği bir çalışma yoktur ancak idrar sitolojisi vimentin boyaması ile incelenmiştir (Ohsaki ve ark., 2011). Çalışmamızda mesane kanseri hastalarının üriner VIM konsantrasyonunun sağlıklı kontroller ve takip hastalarının neredeyse iki katı olduğunu; 26,4 eşik konsantrasyon değeri için üriner VIM konsantrasyonunun mesane kanseri hastalarını sağlıklı kontrollerden %67,27 duyarlılık ve %88,24 özgüllük ile ayırdığını, 0,95 güven aralığı için AUC=0,775 ve $p<0,0001$ olduğunu tespit ettik. Aynı zamanda üriner VIM konsantrasyonunun düşük orta risk grubu hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde fazla olduğunu belirledik. Üriner VIM konsantrasyonunun düşük riskli hasta grubunu sağlıklı kontrollerden ayırmakta oldukça duyarlı olduğunu belirledik, 0,95 güven aralığında AUC=0,941 ve 30,21 eşik değeri için üriner VIM konsantrasyonunun %93 duyarlılık ve %94 özgüllük ile sağlıklı kontrol ve düşük riskli hasta ayırımı yapmaktadır.

Üriner NMP22 ekspresyonunun mesane kanseri tanısında önemli yeri olduğu düşünülmektedir. Mesane kanseri hastalarının idrarlarında çokça çalışılmış ve FDA onaylı 2 adet test geliştirilmiş bir proteindir, ancak literatürdeki sonuçlar birbirinden oldukça farklıdır (Mbeutcha ve ark. 2016; Tan ve ark., 2018). Toplam 4384 hastanın kullanıldığı 7 bağımsız çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde NMP22'nin ortalama %69 özgüllük ve %81 duyarlılığa sahip olduğu belirlenmiştir (Mowatt ve ark., 2010). Mesane kanseri riski taşıyan 1300 kişinin değerlendirildiği bir çalışmada NMP22 BladderCheck testinin (%56), idrar sitolojisine (%16) göre daha duyarlı olduğu ancak idrar sitolojisi kadar özgül olmadığı belirlenmiştir (Grossman ve ark., 2005). Yaş, sigara kullanımı gibi durumlardan fazlaca etkilenen

bir test olması da dezavantajdır. Çalışmamızda sağlıklı kontroller, mesane kanseri hastaları ve takip hastalarının üriner NMP22 konsantrasyonları arasında veya mesane kanseri risk grupları ile sağlıklı kontrollerin üriner NMP22 konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Bu çalışmada mesane kanseri tanısı açısından en anlamlı farklılıkların gözlemlendiği üriner protein ve ekzozomal miRNA'lar lojistik regresyon ile incelendiğinde, üriner miR-139-5p, 136-3p ve 19b1-5p varlığı ve üriner BLCA4 konsantrasyonu ile oluşturulmuş lojistik regresyon modelinin %83,6 duyarlılık ve %73,5 özgüllük ile mesane kanseri tanısı koyabildiği belirlenmiştir. Erken tanıya imkan sağlayacak olması sebebiyle düşük risk hasta grubunun sağlıklı kontrollerden ayrılmasına ayrı bir önem verilmiştir ve yine lojistik regresyon ile ürün ekzozomal miR-136-3p varlığı ve üriner BLCA4 konsantrasyonunun düşük risk hasta grubunu sağlıklı kontrollerden % 93,3 duyarlılık ve % 97,1 özgüllük ile ayırdığı belirlenmiştir.

Mesane kanseri tanısında kullanılmak üzere üriner protein ve ekzozomal miRNA'ları incelediğimiz bu çalışmada; mesane kanseri hastaları ve sağlıklı kontroller arasında, kimi ilk defa incelenmiş, kimi literatürle tutarlılık gösteren çeşitli ekspresyon ve konsantrasyon farklılıkları gözlemledik. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda bunlardan ekzozomal miR-139-5p, 136-3p ve 19b1-5p varlığı ve üriner BLCA4 konsantrasyonunun yüksek duyarlılıkla tanı koydurucu olduğunu belirledik. Ortak moleküler belirteçler kullanılarak hem düşük risk grubu hastaları sağlıklı kontrollerden ayırmaya, hem de mesane kanseri hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırmaya imkân vermesi emek, zaman ve maliyet açısından oldukça avantajlıdır. Ayrıca modele dâhil olan miRNA'ların ekspresyon seviyesi açısından değil ekspresyon varlığı ya da yokluğuna göre dahil olması ekspresyon deneylerinin normalizasyon, kantitasyon basamaklarını deveden çıkaracağı için bireysel hataları da minimize edecektir. Geliştirilen panelin duyarlılık ve özgüllüğü, çeşitli çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %30 ve %86 ile %83 ve 43 aralığında değişen idrar sitolojisinden hayli üstündür. Dolayısıyla geliştirilen modelin; duyarlılık ve özgüllük açısından halen klinik pratikte kullanımı devam eden idrar sitolojisinden üstün olması; sağlıklı kontrol- mesane kanseri hastalarının ayrımı için ve düşük risk hasta grubu- sağlıklı kontrol ayrımının sağlanması için ortak

moleküller kullanması; FDA onaylı idrar biyobelirteçlerinden daha yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olması klinik pratikte kullanılabilecek bir panel olabileceğini işaret etmektedir. Yüksek sayıda hasta grubu ile bu panelin analiz edilmesi halen klinik pratikte aktif olarak kullanılan idrar sitolojisine bir alternatif sunabilir.



12.KAYNAKLAR

- Abd El-Latif, A., Watts, K. E., Elson, P., Fergany, A., & Hansel, D. E. (2013). The sensitivity of initial transurethral resection or biopsy of bladder tumor(s) for detecting bladder cancer variants on radical cystectomy. *Journal of Urology*, 189(4), 1263–1267. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.10.054>
- Aine, M., Eriksson, P., Liedberg, F., Sjö Dahl, G., & Höglund, M. (2015). Biological determinants of bladder cancer gene expression subtypes. *Scientific Reports*, 5(1), 10957. <https://doi.org/10.1038/srep10957>
- Allory, Y., Beukers, W., Sagrera, A., Flández, M., Marqués, M., Márquez, M., ... Real, F. X. (2014). Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: High frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *European Urology*, 65(2), 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.08.052>
- Alvarez, A., & Lokeshwar, V. B. (2007, September). Bladder cancer biomarkers: Current developments and future implementation. *Current Opinion in Urology*. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e3282c8c72b>
- American Urological Association. (n.d.). Treatment of Non-Metastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline 2017. Retrieved November 27, 2018, from [https://www.auanet.org/guidelines/bladder-cancer-non-metastatic-muscle-invasive-\(2017\)](https://www.auanet.org/guidelines/bladder-cancer-non-metastatic-muscle-invasive-(2017))
- Amin, M. B., Smith, S. C., Reuter, V. E., Epstein, J. I., Grignon, D. J., Hansel, D. E., ... Soloway, M. S. (2015). Update for the practicing pathologist: The International Consultation On Urologic Disease-European association of urology consultation on bladder cancer. *Modern Pathology*, 28(5), 612–630. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.158>
- Andreu, Z., Ota Oshiro, R., Redruello, A., Lázpez-Martín, S., Gutiérrez-Vázquez, C., Morato, E., ... Yáñez-Mó, M. (2017). Extracellular vesicles as a source for non-invasive biomarkers in bladder cancer progression.

European Journal of Pharmaceutical Sciences, 98, 70–79.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.008>

Antoni, S., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Znaor, A., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *European Urology*, 71(1), 96–108.
<https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2016.06.010>

Armstrong, D. A., Green, B. B., Seigne, J. D., Schned, A. R., & Marsit, C. J. (2015). MicroRNA molecular profiling from matched tumor and bio-fluids in bladder cancer. *Molecular Cancer*, 14(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0466-2>

Balbás-Martínez, C., Sagra, A., Carrillo-De-Santa-Pau, E., Earl, J., Márquez, M., Vazquez, M., ... Real, F. X. (2013). Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nature Genetics*, 45(12), 1464–1469. <https://doi.org/10.1038/ng.2799>

Beltran, A. L., Cheng, L., Montironi, R., Blanca, A., Leva, M., Rouprêt, M., ... Comperat, E. (2014). Clinicopathological characteristics and outcome of nested carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Archiv*, 465(2), 199–205. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1601-y>

Berrondo, C., Flax, J., Kuchеров, V., Siebert, A., Osinski, T., Rosenberg, A., ... Beckham, C. J. (2016). Expression of the long non-coding RNA HOTAIR correlates with disease progression in bladder cancer and is contained in bladder cancer patient urinary exosomes. *PLoS ONE*, 11(1), e0147236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147236>

Black, P. C., Brown, G. A., & Dinney, C. P. N. (2009, January). The impact of variant histology on the outcome of bladder cancer treated with curative intent. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2007.07.010>

Bo, L.-J., Wei, B., Li, Z.-H., Wang, Z.-F., Gao, Z., & Miao, Z. (2015). Bioinformatics analysis of miRNA expression profile between primary and recurrent glioblastoma. *European Review for Medical and Pharmacological*

Sciences, 19(19), 3579–3586. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26502847>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Bryzgunova, O. E., Zaripov, M. M., Skvortsova, T. E., Lekchnov, E. A., Grigor'eva, A. E., Zaporozhchenko, I. A., ... Laktionov, P. P. (2016). Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients. *PloS One*, 11(6), e0157566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157566>

Burger, M., Catto, J. W. F., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Herr, H., Karakiewicz, P., ... Lotan, Y. (2013). Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European Urology*, 63(2), 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.07.033>

Burger, M., Grossman, H. B., Droller, M., Schmidbauer, J., Hermann, G., Drăgoescu, O., ... Jocham, D. (2013). Photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer with hexaminolevulinate cystoscopy: A meta-analysis of detection and recurrence based on raw data. *European Urology*, 64(5), 846–854. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.03.059>

Cai, Q., Wu, Y., Guo, Z., Gong, R., Tang, Y., Yang, K., ... Zhao, Y. (2015). Urine BLCA-4 exerts potential role in detecting patients with bladder cancers: a pooled analysis of individual studies. *Oncotarget*, 6(35), 37500–37510. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6061>

Cha, E. K., Tirsar, L.-A., Schwentner, C., Christos, P. J., Mian, C., Hennenlotter, J., ... Schmitz-Dräger, B. J. (2012). Immunocytology Is a Strong Predictor of Bladder Cancer Presence in Patients With Painless Hematuria: A Multicentre Study. *European Urology*, 61(1), 185–192. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2011.08.073>

Chen, X., Huang, Z., & Chen, R. (2018). Microrna-136 promotes proliferation and

- invasion ingastric cancer cells through Pten/Akt/P-Akt signaling pathway. *Oncology Letters*, 15(4), 4683–4689. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7848>
- Chen, Y.-T., Chen, C.-L. C.-D., Chen, H.-W., Chung, T., Wu, C.-C., Chen, C.-L. C.-D., ... Yu, J.-S. (2010). Discovery of novel bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics using iTRAQ technology. *Journal of Proteome Research*, 9(11), 5803–5815. <https://doi.org/10.1021/pr100576x>
- Choi, S., Shin, J. H., Lee, Y. R., Joo, H. K., Song, K. H., Na, Y. G., ... Jeon, B. H. (2016). Urinary APE1/Ref-1: A Potential Bladder Cancer Biomarker. *Disease Markers*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/7276502>
- Choi, W., Porten, S., Kim, S., Willis, D., Plimack, E. R., Hoffman-Censits, J., ... McConkey, D. J. (2014). Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell*, 25(2), 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.009>
- Çokluk, Ö. (2010). Lojistik Regresyon Analizi: Kavram ve Uygulama. *Kuram ve Uygulamada Eğitim Bilimleri*.
- Compérat, E., Roupret, M., Yaxley, J., Reynolds, J., Varinot, J., Ouzad, I., ... Samaratunga, H. (2010). Micropapillary urothelial carcinoma of the urinary bladder: A clinicopathological analysis of 72 cases. *Pathology*, 42(7), 650–654. <https://doi.org/10.3109/00313025.2010.522173>
- Comploj, E., Mian, C., Ambrosini-Spaltro, A., Dechet, C., Palermo, S., Trenti, E., ... Pycha, A. (2013). uCyt+/ImmunoCyt and cytology in the detection of urothelial carcinoma. *Cancer Cytopathology*, 121(7), 392–397. <https://doi.org/10.1002/cncy.21287>
- Costa, V. L., Henrique, R., Danielsen, S. A., Duarte-Pereira, S., Eknaes, M., Skotheim, R. I., ... Lind, G. E. (2010). Three epigenetic biomarkers, GDF15, TMEFF2, and VIM, accurately predict bladder cancer from DNA-based analyses of urine samples. *Clinical Cancer Research*, 16(23), 5842–5851. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1312>
- Crossland, R. E., Norden, J., Bibby, L. A., Davis, J., & Dickinson, A. M. (2016).

- Evaluation of optimal extracellular vesicle small RNA isolation and qRT-PCR normalisation for serum and urine. *Journal of Immunological Methods*, 429, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.12.011>
- Damrauer, J. S., Hoadley, K. A., Chism, D. D., Fan, C., Tiganelli, C. J., Wobker, S. E., ... Kim, W. Y. (2014). Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(8), 3110–3115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318376111>
- Dayyani, F., Czerniak, B. A., Sircar, K., Munsell, M. F., Millikan, R. E., Dinney, C. P., & Siefker-Radtke, A. O. (2013). Plasmacytoid urothelial carcinoma, a chemosensitive cancer with poor prognosis, and peritoneal carcinomatosis. *Journal of Urology*, 189(5), 1656–1660. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.11.084>
- De Long, J., Sullivan, T. B., Humphrey, J., Logvinenko, T., Summerhayes, K. A., Kozinn, S., ... Rieger-Christ, K. M. (2015). A non-invasive miRNA based assay to detect bladder cancer in cell-free urine. *American Journal of Translational Research*, 7(11), 2500–2509. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26807194>
- Deininger, S., Hennenlotter, J., Rausch, S., Docktor, K., Neumann, E., da Costa, I. A., ... Todenhöfer, T. (2018). No influence of smoking status on the performance of urine markers for the detection of bladder cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(7), 1367–1373. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2639-z>
- Down, C. J., Nair, R., & Thurai Raja, R. (2016, October 1). Bladder cancer. *Surgery (United Kingdom)*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2016.08.001>
- Du, L., Duan, W., Jiang, X., Zhao, L., Li, J., Wang, R., ... Wang, C. (2018). Cell-free lncRNA expression signatures in urine serve as novel non-invasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(5), 2838–2845. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13578>

- Du, L., Jiang, X., Duan, W., Wang, R., Wang, L., Zheng, G., ... Wang, C. (2017). Cell-free microRNA expression signatures in urine serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *Oncotarget*, 8(25), 40832–40842. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16586>
- Duncavage, E., Goodgame, B., Sezhiyan, A., Govindan, R., & Pfeifer, J. (2010). Use of MicroRNA Expression Levels to Predict Outcomes in Resected Stage I Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(11), 1755–1763. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181f3909d>
- Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010, June 24). The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4>
- Eissa, S., Habib, H., Ali, E., & Kotb, Y. (2015). Evaluation of urinary miRNA-96 as a potential biomarker for bladder cancer diagnosis. *Medical Oncology*, 32(1), 413. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0413-x>
- Eissa, S., Matboli, M., Essawy, N. O. E., & Kotb, Y. M. (2015). Integrative functional genetic-epigenetic approach for selecting genes as urine biomarkers for bladder cancer diagnosis. *Tumor Biology*, 36(12), 9545–9552. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3722-6>
- Eissa, S., Matboli, M., Hegazy, M. G. A., Kotb, Y. M., & Essawy, N. O. E. (2015). Evaluation of urinary microRNA panel in bladder cancer diagnosis: Relation to bilharziasis. *Translational Research*, 165(6), 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.12.008>
- Emdad, L., Lee, S.-G., Su, Z. Z., Jeon, H. Y., Boukerche, H., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2009). Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21300–21305. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910936106>
- Enokida, H., Yoshino, H., Matsushita, R., & Nakagawa, M. (2016). The role of microRNAs in bladder cancer. *Investigative and Clinical Urology*, 57(Suppl

- 1), S60. <https://doi.org/10.4111/icu.2016.57.S1.S60>
- Faiena, I., Rosser, C. J., Chamie, K., & Furuya, H. (2018). Diagnostic biomarkers in non-muscle invasive bladder cancer. *World Journal of Urology*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2567-1>
- Feller, S., & Lewitzky, M. (2006). Potential Disease Targets for Drugs that Disrupt Protein - Protein Interactions of Grb2 and Crk Family Adaptors. *Current Pharmaceutical Design*, 12(5), 529–548. <https://doi.org/10.2174/138161206775474369>
- Feller, S. M. (2001, October 1). CrK family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204779>
- Fendler, A., Stephan, C., Yousef, G. M., Kristiansen, G., & Jung, K. (2016). The translational potential of microRNAs as biofluid markers of urological tumours. *Nature Reviews Urology*, 13(12), 734–752. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.193>
- Ferlay, J., Parkin, D. M., & Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*, 46(4), 765–781. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.12.014>
- Ferrís, J., Garcia, J., Berbel, O., & Ortega, J. A. (2013). Factores de riesgo constitucionales y ocupacionales asociados al cáncer vesical. *Actas Urológicas Espanolas*, 37(8), 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2013.01.001>
- Fletcher, O., Easton, D., Anderson, K., Gilham, C., Jay, M., & Peto, J. (2004). Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(5), 357–363. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996857>
- Franzen, C. A., Simms, P. E., Van Huis, A. F., Foreman, K. E., Kuo, P. C., & Gupta, G. N. (2014). Characterization of Uptake and Internalization of Exosomes by Bladder Cancer Cells. *BioMed Research International*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/619829>
- Friedman, J. M., Liang, G., Liu, C. C., Wolff, E. M., Tsai, Y. C., Ye, W., ... Jones,

- P. A. (2009). The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Research*, 69(6), 2623–2629. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3114>
- Furge, K. A., Zhang, Y. W., & Vande Woude, G. F. (2000, November 20). Met receptor tyrosine kinase: Enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203859>
- Gandini, S., Botteri, E., Iodice, S., Boniol, M., Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., & Boyle, P. (2008). Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 122(1), 155–164. <https://doi.org/10.1002/ijc.23033>
- Gangwar, R., Mandhani, A., & Mittal, R. D. (2011). Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and risk for urinary bladder cancer in North India. *Surgery*, 149(1), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2010.04.004>
- Getzenberg, R. H., Konety, B. R., Oeler, T. A., Quigley, M. M., Hakam, A., Becich, M. J., & Bahnson, R. R. (1996). *Bladder Cancer-associated Nuclear Matrix Proteins1. ICANCER RESEARCH* (Vol. 56). Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/56/7/1690.full.pdf>
- Gonzalzo, M., Darwiche, F., & Parekh, D. (2015). Biomarkers for non-muscle invasive bladder cancer: Current tests and future promise. *Indian Journal of Urology*, 31(4), 273. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.166448>
- Gopalakrishna, A., Longo, T. A., Fantony, J. J., Owusu, R., Foo, W.-C., Dash, R., & Inman, B. A. (2016). The diagnostic accuracy of urine-based tests for bladder cancer varies greatly by patient. *BMC Urology*, 16(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12894-016-0147-5>
- Gripp, K. W. (2005, August 15). Tumor predisposition in Costello syndrome. *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30065>
- Grossman, H. B., Messing, E., Soloway, M., Tomera, K., Katz, G., Berger, Y., & Shen, Y. (2005). Detection of Bladder Cancer Using a Point-of-Care

- Proteomic Assay. *JAMA*, 293(7), 810. <https://doi.org/10.1001/jama.293.7.810>
- Gui, Y., Guo, G., Huang, Y., Hu, X., Tang, A., Gao, S., ... Cai, Z. (2011). Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nature Genetics*, 43(9), 875–878. <https://doi.org/10.1038/ng.907>
- Guo, B., Che, T., Shi, B., Guo, L., Yin, Y., Li, L., ... Chen, Y. (2011). Screening and identification of specific markers for bladder transitional cell carcinoma from urine urothelial cells with suppressive subtractive hybridization and cDNA microarray. *Canadian Urological Association Journal*, 5(6), e129–e137. <https://doi.org/10.5489/cuaj.09118>
- Gupta, M., VandenBussche, C. J., & Bivalacqua, T. J. (2018). Urinary cytology and the Paris system for reporting urinary cytology: Implications for urological management. *Cytopathology*, 29(4), 368–370. <https://doi.org/10.1111/cyt.12538>
- Han, Y., Chen, J., Zhao, X., Liang, C., Wang, Y., Sun, L., ... Cai, Z. (2011). MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing. *PLoS ONE*, 6(3), e18286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018286>
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A. C., Kausch, I., Jocham, D., ... Sczakiel, G. (2010). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urologic Oncology*, 28(6). <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2009.01.027>
- Hansel, D. E., Amin, M. B., Comperat, E., Cote, R. J., Knüchel, R., Montironi, R., ... Van Der Kwast, T. H. (2013, February). A contemporary update on pathology standards for bladder cancer: Transurethral resection and radical cystectomy specimens. *European Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.10.008>
- Hemminki, K., Bermejo, J. L., Ji, J., & Kumar, R. (2011). Familial bladder cancer and the related genes. *Current Opinion in Urology*, 21(5), 386–392. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e32834958ff>
- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis

- and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193–208.
<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- Hickling, D. R., Sun, T.-T., & Wu, X.-R. (2015). Anatomy and Physiology of the Urinary Tract: Relation to Host Defense and Microbial Infection. *Microbiology Spectrum*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0016-2012>
- Homami, A., & Ghazi, F. (2016). MicroRNAs as biomarkers associated with bladder cancer. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28491850>
- Hurst, C. D., Platt, F. M., & Knowles, M. A. (2014, February). Comprehensive mutation analysis of the TERT promoter in bladder cancer and detection of mutations in voided urine. *European Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.08.057>
- Irlam-Jones, J. J., Eustace, A., Denley, H., Choudhury, A., Harris, A. L., Hoskin, P. J., & West, C. M. L. (2016). Expression of miR-210 in relation to other measures of hypoxia and prediction of benefit from hypoxia modification in patients with bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 115(5), 571–578. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.218>
- Jiang, Q.-Q., Liu, B., & Yuan, T. (2013). MicroRNA-16 inhibits bladder cancer proliferation by targeting Cyclin D1. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 14(7), 4127–4130. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991964>
- Juracek, J., Peltanova, B., Dolezel, J., Fedorko, M., Pacik, D., Radova, L., ... Stanik, M. (2018). Genome-wide identification of urinary cell-free microRNAs for non-invasive detection of bladder cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(3), 2033–2038. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13487>
- Kamat, A. M., Dinney, C. P. N., Gee, J. R., Grossman, H. B., Siefker-Radtke, A. O., Tamboli, P., ... Pisters, L. L. (2007). Micropapillary bladder cancer: A review of the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center experience

- with 100 consecutive patients. *Cancer*, 110(1), 62–67. <https://doi.org/10.1002/cncr.22756>
- Kamat, A. M., Hahn, N. M., Efstathiou, J. A., Lerner, S. P., Malmström, P. U., Choi, W., ... Kassouf, W. (2016, December 3). Bladder cancer. *The Lancet*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30512-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30512-8)
- Kehinde, E. O., Al-Mulla, F., Kapila, K., & Anim, J. T. (2011). Comparison of the sensitivity and specificity of urine cytology, urinary nuclear matrix protein-22 and multitarget fluorescence in situ hybridization assay in the detection of bladder cancer. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 45(2), 113–121. <https://doi.org/10.3109/00365599.2010.533694>
- Kiemeny, L. A. L. M. (2008). Hereditary bladder cancer. In *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* (Vol. 42, pp. 110–115). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/03008880802283755>
- Kim, J., Akbani, R., Creighton, C. J., Lerner, S. P., Weinstein, J. N., Getz, G., & Kwiatkowski, D. J. (2015, October 15). Invasive bladder cancer: Genomic insights and therapeutic promise. *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1215>
- Kim, S. M., Kang, H. W., Kim, W. T., Kim, Y. J., Yun, S. J., Lee, S. C., & Kim, W. J. (2013). Cell-free microRNA-214 from urine as a biomarker for non-muscle-invasive bladder cancer. *Korean Journal of Urology*, 54(11), 791–796. <https://doi.org/10.4111/kju.2013.54.11.791>
- Knowles, M. A., & Hurst, C. D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: New insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews Cancer*, 15(1), 25–41. <https://doi.org/10.1038/nrc3817>
- Konety, B. R., Nguyen, T. S., Dhir, R., Day, R. S., Becich, M. J., Stadler, W. M., & Getzenberg, R. H. (2000). Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(7), 2618–2625. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10914702>

- Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 116–125. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2014.05.004>
- Kutwin, P., Konecki, T., Borkowska Edyta Marta, Traczyk-Borszyńska, M., & Jabłonowski, Z. (2018). Urine miRNA as a potential biomarker for bladder cancer detection - a meta-analysis. *Central European Journal of Urology*, 71(2), 177–185. <https://doi.org/10.5173/cej.2018.1605>
- Lange, T., Stracke, S., Rettig, R., Lendeckel, U., Kuhn, J., Schlüter, R., ... Endlich, N. (2017). Identification of miR-16 as an endogenous reference gene for the normalization of urinary exosomal miRNA expression data from CKD patients. *PLOS ONE*, 12(8), e0183435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183435>
- Li, H.-X., Li, M., Li, C.-L., Ma, J.-H., Wang, M.-R., Rao, J., & Pan, Q.-J. (2010). ImmunoCyt and cytokeratin 20 immunocytochemistry as adjunct markers for urine cytologic detection of bladder cancer: a prospective study. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 32(1), 45–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701087>
- Li, H., Li, C., Wu, H., Zhang, T., Wang, J., Wang, S., & Chang, J. (2011). Identification of Apo-A1 as a biomarker for early diagnosis of bladder transitional cell carcinoma. *Proteome Science*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-21>
- Linder, B. J., Frank, I., Cheville, J. C., Thompson, R. H., Thapa, P., Tarrell, R. F., & Boorjian, S. A. (2013). Outcomes following radical cystectomy for nested variant of urothelial carcinoma: A matched cohort analysis. *Journal of Urology*, 189(5), 1670–1675. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.11.006>
- Lindor, N. M., McMaster, M. L., Lindor, C. J., & Greene, M. H. (2008). Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes: Second edition. *Journal of the National Cancer Institute - Monographs*, 2008(38), 1–93. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgn001>
- LIU, L. Y., Wang, W., Zhao, L. Y., GUO, B., Yang, J., ZHAO, X. G., ... XU, J. R.

- (2014). miR-126 inhibits growth of SGC-7901 cells by synergistically targeting the oncogenes PI3KR2 and Crk, and the tumor suppressor PLK2. *International Journal of Oncology*, 45(3), 1257–1265. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2516>
- Liu, W., Qi, L., Lv, H., Zu, X., Chen, M., Wang, J., ... Li, Y. (2015). MiRNA-141 and miRNA-200b are closely related to invasive ability and considered as decision-making biomarkers for the extent of PLND during cystectomy. *BMC Cancer*, 15(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1110-7>
- Liu, X., Liu, X., Wu, Y., Wu, Q., Wang, Q., Yang, Z., & Li, L. (2017). MicroRNAs in biofluids are novel tools for bladder cancer screening. *Oncotarget*, 8(19), 32370–32379. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16026>
- Luo, H., Yang, R., Li, C., Tong, Y., Fan, L., Liu, X., & Xu, C. (2017). MicroRNA-139-5p inhibits bladder cancer proliferation and self-renewal by targeting the Bmi1 oncogene. *Tumor Biology*, 39(7), 101042831771841. <https://doi.org/10.1177/1010428317718414>
- Lynch, S. P., Shen, Y., Kamat, A., Grossman, H. B., Shah, J. B., Millikan, R. E., ... Siefker-Radtke, A. (2013). Neoadjuvant chemotherapy in small cell urothelial cancer improves pathologic downstaging and long-term outcomes: Results from a retrospective study at the md anderson cancer center. *European Urology*, 64(2), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.020>
- Matsumoto, R., Tsuda, M., Wang, L., Maishi, N., Abe, T., Kimura, T., ... Tanaka, S. (2015). Adaptor protein CRK induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells through HGF/c-Met feedback loop. *Cancer Science*, 106(6), 709–717. <https://doi.org/10.1111/cas.12662>
- Matulay, J. T., & Kamat, A. M. (2018). Advances in risk stratification of bladder cancer to guide personalized medicine. *F1000Research*, 7, 1137. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14903.1>
- Matullo, G., Naccarati, A., & Pardini, B. (2016, May 15). MicroRNA expression profiling in bladder cancer: The challenge of next-generation sequencing in tissues and biofluids. *International Journal of Cancer*.

<https://doi.org/10.1002/ijc.29895>

- Mbeutcha, A., Lucca, I., Mathieu, R., Lotan, Y., & Shariat, S. F. (2016, February). Current Status of Urinary Biomarkers for Detection and Surveillance of Bladder Cancer. *Urologic Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2015.08.005>
- Mengual, L., Lozano, J. J., Ingelmo-Torres, M., Gazquez, C., Ribal, M. J., & Alcaraz, A. (2013). Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer. *International Journal of Cancer*, 133(11), 2631–2641. <https://doi.org/10.1002/ijc.28274>
- Miah, S., Dudziec, E., Drayton, R. M., Zlotta, A. R., Morgan, S. L., Rosario, D. J., ... Catto, J. W. F. (2012). An evaluation of urinary microRNA reveals a high sensitivity for bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 107(1), 123–128. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.221>
- Miyamoto, H., Sharma, R. B., Illei, P. B., & Epstein, J. I. (2010). Pitfalls in the use of smoothelin to identify muscularis propria invasion by urothelial carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 34(3), 418–422. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181ce5066>
- Miyoshi, J., Toden, S., Yoshida, K., Toiyama, Y., Alberts, S. R., Kusunoki, M., ... Goel, A. (2017). MiR-139-5p as a novel serum biomarker for recurrence and metastasis in colorectal cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 43393. <https://doi.org/10.1038/srep43393>
- Moore, L. E., Baris, D. R., Figueroa, J. D., Garcia-Closas, M., Karagas, M. R., Schwenn, M. R., ... Rothman, N. (2011). GSTM1 null and NAT2 slow acetylation genotypes, smoking intensity and bladder cancer risk: Results from the New England bladder cancer study and NAT2 meta-analysis. *Carcinogenesis*, 32(2), 182–189. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq223>
- Mowatt, G., Zhu, S., Kilonzo, M., Boachie, C., Fraser, C., Griffiths, T. R. L., ... Vale, L. (2010, January). Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder

- cancer. *Health Technology Assessment*. <https://doi.org/10.3310/hta14040>
- Mueller, C. M., Caporaso, N., & Greene, M. H. (2008). Familial and genetic risk of transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Urologic Oncology*, 26(5), 451–464. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2008.02.016>
- NICE. (2017). Bladder cancer: diagnosis and management of bladder cancer. *BJU International*, 120(6), 755–765. <https://doi.org/10.1111/bju.14045>
- Ohsaki, H., Hirakawa, E., Nakamura, M., Norimatsu, Y., Kiyomoto, H., & Haba, R. (2011). Expression of vimentin and high-molecular-weight cytokeratin (clone 34βE12) in differentiating reactive renal tubular cells from low-grade urothelial carcinoma cells in voided urine. *Cytopathology*, 22(4), 247–252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2010.00791.x>
- Osanto, S., Qin, Y., Buermans, H. P., Berkers, J., Lerut, E., Goeman, J. J., & van Poppel, H. (2012). Genome-Wide MicroRNA Expression Analysis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Next Generation Deep Sequencing. *PLoS ONE*, 7(6), e38298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038298>
- Paner, G. P., Brown, J. G., Lapetino, S., Nese, N., Gupta, R., Shen, S. S., ... Amin, M. B. (2010). Diagnostic use of antibody to smoothelin in the recognition of muscularis propria in transurethral resection of urinary bladder tumor (TURBT) specimens. *American Journal of Surgical Pathology*, 34(6), 792–799. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181da7650>
- Pannek, J., Rademacher, F., & Wöllner, J. (2017). Clinical usefulness of urine cytology in the detection of bladder tumors in patients with neurogenic lower urinary tract dysfunction. *Research and Reports in Urology*, 9, 219–223. <https://doi.org/10.2147/RRU.S148429>
- Pazourkova, E., Pospisilova, S., Svobodova, I., Horinek, A., Brisuda, A., Soukup, V., ... Korabecna, M. (2016). Comparison of microRNA content in plasma and urine indicates the existence of a transrenal passage of selected microRNAs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 924, 97–100. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42044-8_18
- PDQ Adult Treatment Editorial Board, P. A. T. E. (2002). *Bladder Cancer*

Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. National Cancer Institute (US). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389399>

Petrozza, V., Pastore, A. L., Palleschi, G., Tito, C., Porta, N., Ricci, S., ... Fazi, F. (2017). Secreted miR-210-3p as non-invasive biomarker in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(41), 69551–69558. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18449>

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>

Pfaffl, M. W., & Pfaffl Michael. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Planz, B., Jochims, E., Deix, T., Caspers, H. P., Jakse, G., & Boecking, A. (2005). The role of urinary cytology for detection of bladder cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 31(3), 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2004.12.008>

Pospisilova, S., Pazzourkova, E., Horinek, A., Brisuda, A., Svobodova, I., Soukup, V., ... Babjuk, M. (2016). MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection. *Neoplasma*, 63(5), 799–808. https://doi.org/10.4149/neo_2016_518

Powles, T., Eder, J. P., Fine, G. D., Braiteh, F. S., Loriaut, Y., Cruz, C., ... Vogelzang, N. J. (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, 515(7528), 558–562. <https://doi.org/10.1038/nature13904>

Pritchard, C. C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J. D., Dougherty, K. J., Miyaji, M. M., ... Tewari, M. (2012). Blood cell origin of circulating microRNAs: A cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prevention Research*, 5(3), 492–497. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370>

Puerta-Gil, P., Garca-Baquero, R., Jia, A. Y., Ocaa, S., Alvarez-Mgica, M.,

- Alvarez-Ossorio, J. L., ... Snchez-Carbayo, M. (2012). MiR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer. *American Journal of Pathology*, 180(5), 1808–1815. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.034>
- Ratert, N., Meyer, H. A., Jung, M., Lioudmer, P., Mollenkopf, H. J., Wagner, I., ... Jung, K. (2013). MiRNA profiling identifies candidate mirnas for bladder cancer diagnosis and clinical outcome. *Journal of Molecular Diagnostics*, 15(5), 695–705. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.05.008>
- Reinert, T., Borre, M., Christiansen, A., Hermann, G. G., Ørntoft, T. F., & Dyrskjøt, L. (2012). Diagnosis of Bladder Cancer Recurrence Based on Urinary Levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 Hypermethylation. *PLoS ONE*, 7(10), e46297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046297>
- Ren, D., Yang, Q., Dai, Y., Guo, W., Du, H., Song, L., & Peng, X. (2017). Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis via NF-κB signaling pathway. *Molecular Cancer*, 16(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0688-6>
- Ren, H., Qi, Y., Yin, X., & Gao, J. (2017). miR-136 targets MIEN1 and involves the metastasis of colon cancer by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition. *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, 67–74. <https://doi.org/10.2147/OTT.S113359>
- Reuter, V. E., Eble, J., Sauter, G., Epstein, J., Al., E., Reuter, V. E., ... Ro, J. Y. (2006). The pathology of bladder cancer. *Urology*, 67(3), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.01.037>
- Ricardo-Gonzalez, R. R., Nguyen, M., Gokden, N., Sangoi, A. R., Presti, J. C., & McKenney, J. K. (2012). Plasmacytoid carcinoma of the bladder: A urothelial carcinoma variant with a predilection for intraperitoneal spread. *Journal of Urology*, 187(3), 852–855. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.10.145>
- Rosenberg, J. E., Hoffman-Censits, J., Powles, T., Van Der Heijden, M. S., Balar, A. V., Necchi, A., ... Dreicer, R. (2016). Atezolizumab in patients with locally

advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*, 387(10031), 1909–1920. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00561-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00561-4)

Samaratunga, H., Makarov, D. V., & Epstein, J. I. (2002). Comparison of WHO/ISUP and WHO classification of noninvasive papillary urothelial neoplasms for risk of progression. *Urology*, 60(2), 315–319. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(02\)01705-3](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(02)01705-3)

Sapre, N., Macintyre, G., Clarkson, M., Naeem, H., Cmero, M., Kowalczyk, A., ... Hovens, C. M. (2016). A urinary microRNA signature can predict the presence of bladder urothelial carcinoma in patients undergoing surveillance. *British Journal of Cancer*, 114(4), 454–462. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.472>

Sasaki, H., Yoshiike, M., Nozawa, S., Usuba, W., Katsuoka, Y., Aida, K., ... Chikaraishi, T. (2016). Expression Level of Urinary MicroRNA-146a-5p Is Increased in Patients With Bladder Cancer and Decreased in Those After Transurethral Resection. *Clinical Genitourinary Cancer*, 14(5), e493–e499. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2016.04.002>

Schmidt, J., Propping, C., Siow, W. Y., Lohse-Fischer, A., Toma, M., Baldauf-Twelker, A., ... Fuessel, S. (2016). Diagnostic and prognostic value of bladder cancer-related transcript markers in urine. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142(2), 401–414. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-2037-8>

Shin, J. H., Choi, S., Lee, Y. R., Park, M. S., Na, Y. G., Irani, K., ... Jeon, B. H. (2015). APE1/Ref-1 as a Serological Biomarker for the Detection of Bladder Cancer. *Cancer Research and Treatment*, 47(4), 823–833. <https://doi.org/10.4143/crt.2014.074>

Shin, K., Lim, A., Odegaard, J. I., Honeycutt, J. D., Kawano, S., Hsieh, M. H., & Beachy, P. A. (2014). Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. *Nature Cell Biology*, 16(5), 469–478. <https://doi.org/10.1038/ncb2956>

- Sjödahl, G., Lauss, M., Lövgren, K., Chebil, G., Gudjonsson, S., Veerla, S., ... Höglund, M. (2012). A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 18(12), 3377–3386. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T>
- Snowdon, J., Boag, S., Feilotter, H., Izard, J., & Siemens, D. R. (2013). A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer. *Journal of the Canadian Urological Association*, 7(2), 28–32. <https://doi.org/10.5489/cuaj.11115>
- Solomon, D. A., Kim, J. S., Bondaruk, J., Shariat, S. F., Wang, Z. F., Elkahloun, A. G., ... Waldman, T. (2013). Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer. *Nature Genetics*, 45(12), 1428–1430. <https://doi.org/10.1038/ng.2800>
- Soria, F., Droller, M. J., Lotan, Y., Gontero, P., D'Andrea, D., Gust, K. M., ... Shariat, S. F. (2018). An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *World Journal of Urology*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2380-x>
- Soung, Y. H., Nguyen, T., Cao, H., Lee, J., & Chung, J. (2016). Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. *BMB Reports*, 49(1), 18–25. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.1.239>
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), 513–525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
- Street, J. M., Koritzinsky, E. H., Glispie, D. M., Star, R. A., & Yuen, P. S. T. (2017). Urine Exosomes: An Emerging Trove of Biomarkers. *Advances in Clinical Chemistry*, 78, 103–122. <https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2016.07.003>
- Stuopelytė, K., Daniūnaitė, K., Jankevičius, F., & Jarmalaitė, S. (2016). Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 52(2), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.medici.2016.02.007>
- Tan, W. S., Tan, W. P., Tan, M. Y., Khetrapal, P., Dong, L., DeWinter, P., ... Kelly, J. D. (2018). Novel urinary biomarkers for the detection of bladder cancer: A

- systematic review. *Cancer Treatment Reviews*, 69, 39–52.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.05.012>
- Tang, K. W. A., Toh, Q. C., & Teo, B. W. (2015, January). Normalisation of urinary biomarkers to creatinine for clinical practice and research – When and why. *Singapore Medical Journal*. Singapore Medical Association.
<https://doi.org/10.11622/smedj.2015003>
- Thakur, S., Sarkar, B., Cholia, R. P., Gautam, N., Dhiman, M., & Mantha, A. K. (2014). APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: phytochemical modulation of its functions. *Experimental & Molecular Medicine*, 46(7), e106–e106. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.42>
- Tinay, I., & Mungan, N. A. (2017). Management of Non-muscle-Invasive and Muscle-Invasive Bladder Cancers. In *Principles and Practice of Urooncology* (pp. 59–74). Cham: Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-56114-1_2
- Tinay İlker, T. L. (2012). *Moleküler Üroloji*. (N. F. Türkeri Levent, Özer Ayşe, Ed.) (1st ed.). İstanbul.
- Tölle, A., Jung, M., Rabenhorst, S., Kilic, E., Jung, K., & Weikert, S. (2013). Identification of microRNAs in blood and urine as tumour markers for the detection of urinary bladder cancer. *Oncology Reports*, 30(4), 1949–1956.
<https://doi.org/10.3892/or.2013.2621>
- Urquidi, V., Netherton, M., Gomes-Giacoia, E., Serie, D. J., Eckel-Passow, J., Rosser, C. J., ... Goodison, S. (2016). A microRNA biomarker panel for the non-invasive detection of bladder cancer. *Oncotarget*, 5(0).
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.13382>
- Van Batavia, J., Yamany, T., Molotkov, A., Dan, H., Mansukhani, M., Batourina, E., ... Mendelsohn, C. (2014). Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. *Nature Cell Biology*, 16(10), 982–991.
<https://doi.org/10.1038/ncb3038>
- Volanis, D., Kadiyska, T., Galanis, A., Delakas, D., Logotheti, S., & Zoumpourlis, V. (2010). Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary

- bladder cancer. *Toxicology Letters*, 193(2), 131–137.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.12.018>
- Wang, G., Chan, E. S. Y., Kwan, B. C. H., Li, P. K. T., Yip, S. K. H., Szeto, C. C., & Ng, C. F. (2012). Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*, 10(2), 106–113.
<https://doi.org/10.1016/j.clgc.2012.01.001>
- Wang, J.-J., Li, Z.-F., Li, X.-J., Han, Z., Zhang, L., & Liu, Z.-J. (2017). Effects of microRNA-136 on melanoma cell proliferation, apoptosis, and epithelial–mesenchymal transition by targeting PMEL through the Wnt signaling pathway. *Bioscience Reports*, 37(5), BSR20170743.
<https://doi.org/10.1042/BSR20170743>
- Wang, J., Zhang, X., Wang, L., Dong, Z., Du, L., Yang, Y., ... Wang, C. (2015). Downregulation of urinary cell-free microRNA-214 as a diagnostic and prognostic biomarker in bladder cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 111(8), 992–999. <https://doi.org/10.1002/jso.23937>
- Wang, W., Zhang, A., Hao, Y., Wang, G., & Jia, Z. (2018). The emerging role of miR-19 in glioma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(10), 4611–4616. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13788>
- Wang, Z.-Y., Li, H.-Y., Wang, H., Chi, Q., Liu, Y., & Li, X.-M. (2018). Bladder Cancer-Specific Nuclear Matrix Proteins-4 May Be a Potential Biomarker for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Detection. *Disease Markers*, 2018, 5609395. <https://doi.org/10.1155/2018/5609395>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., Jen Lee, M., ... Wang, K. (2010). The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733–1741.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Weinstein, J. N., Akbani, R., Broom, B. M., Wang, W., Verhaak, R. G. W., McConkey, D., ... Eley, G. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507(7492), 315–322.
<https://doi.org/10.1038/nature12965>

- Wieczorek, E., & Reszka, E. (2018, February). mRNA, microRNA and lncRNA as novel bladder tumor markers. *Clinica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.12.009>
- Willis, D., & Kamat, A. M. (2015, April). Nonurothelial Bladder Cancer and Rare Variant Histologies. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2014.10.011>
- Xu, K., Shen, K., Liang, X., Li, Y., Nagao, N., Li, J., ... Yin, P. (2016). MiR-139-5p reverses CD44+/CD133+-associated multidrug resistance by downregulating NOTCH1 in colorectal carcinoma cells. *Oncotarget*, 7(46), 75118–75129. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12611>
- Yafi, F. A., Brimo, F., Steinberg, J., Aprikian, A. G., Tanguay, S., & Kassouf, W. (2015). Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 33(2), 66.e25-66.e31. <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2014.06.008>
- Yamada, Y., Enokida, H., Kojima, S., Kawakami, K., Chiyomaru, T., Tatarano, S., ... Nakagawa, M. (2011). MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: Correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Science*, 102(3), 522–529. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01816.x>
- Yang, L., Wu, X. H., Wang, D., Luo, C. L., & Chen, L. X. (2013). Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 8(4), 1272–1278. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1634>
- Yonemori, M., Seki, N., Yoshino, H., Matsushita, R., Miyamoto, K., Nakagawa, M., & Enokida, H. (2016). Dual tumor-suppressors miR-139-5p and miR-139-3p targeting matrix metalloprotease 11 in bladder cancer. *Cancer Science*, 107(9), 1233–1242. <https://doi.org/10.1111/cas.13002>
- Yu, L., Zhou, G.-Q., & Li, D.-C. (2018). MiR-136 triggers apoptosis in human gastric cancer cells by targeting AEG-1 and BCL2. *European Review for*

Medical and Pharmacological Sciences, 22(21), 7251–7256. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30468468>

Yun, S. J., Jeong, P., Kim, W. T., Kim, T. H., Lee, Y. S., Song, P. H., ... Kim, W. J. (2012). Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer. *International Journal of Oncology*, 41(5), 1871–1878. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1622>

Zaravinos, A., Radojicic, J., Lambrou, G. I., Volanis, D., Delakas, D., Stathopoulos, E. N., & Spandidos, D. A. (2012). Expression of miRNAs involved in angiogenesis, tumor cell proliferation, tumor suppressor inhibition, epithelial-mesenchymal transition and activation of metastasis in bladder cancer. *Journal of Urology*, 188(2), 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.03.122>

Zhang, D. Z., Lau, K. M., Chan, E. S. Y., Wang, G., Szeto, C. C., Wong, K., ... Ng, C. F. (2014). Cell-free urinary MicroRNA-99a and MicroRNA-125b are diagnostic markers for the non-invasive screening of bladder cancer. *PLoS ONE*, 9(7), e100793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100793>

Zhou, H., Yuen, P. S. T., Pisitkun, T., Gonzales, P. A., Yasuda, H., Dear, J. W., ... Star, R. A. (2006). Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney International*, 69(8), 1471–1476. <https://doi.org/10.1016/j.polyimdegadstab.2005.10.005>

Zhou, X., Zhang, X., Yang, Y., Li, Z., Du, L., Dong, Z., ... Wang, C. (2014). Urinary cell-free microRNA-106b as a novel biomarker for detection of bladder cancer. *Medical Oncology*, 31(10), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0197-z>

Zylbersztejn, K., & Galli, T. (2011). Vesicular traffic in cell navigation. *FEBS Journal*, 278(23), 4497–4505. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08168.x>

13.EKLER



**Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu**

<i>BAŞVURU BİLGİLERİ</i>	PROTOKOL KODU	09.2016.416
	PROJE ADI	Mesane kanseri tanısında kullanılmak üzere üriner protein ve ekzozomal mikro RNA belirteci saptanması.
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Doç.Dr. Mustafa AKKİPRİK

<i>KARAR BİLGİLERİ</i>	Tarih 15.07.2016 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.
------------------------	---

<i>ÜYELER</i>					
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeligi	Onaylanan Proje ile ilişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİREKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Prof.Dr. Atilla KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	☐ EVET ☒ HAYIR	
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Doç.Dr. Tülay GÜRAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Doç.Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Doç.Dr. Tolga GÜVEN	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Yrd.Doç.Dr: Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	
Gözde Aynur MİRZA	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var Yok	☐ Evet ☒ Hayır	

14.ÖZGEÇMİŞ

Adı	Gökçe	Soyadı	GÜLLÜ AMURAN
Doğum Yeri	SÖKE	Doğum Tarihi	04.11.1984
Uyruğu	T.C	Tel	5457285010
E-mail	gokcegullu@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	MezunOlduğuKurumunAdı	MezuniyetYılı
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi-Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Planlanan 2018
YüksekLisans	Marmara Üniversitesi-Tıbbi Biyoloji ve Genetik	2012
Lisans	Haliç Üniversitesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik	2007
Lise	Atakent Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1	Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi	20015-Halen

YabancıDilleri	OkuduğunuAnlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi
Rusça	Orta	Orta	Başlangıç

YabancıDilSınavNotu#		
YDS	ÜDS	YÖKDİL
83,75	82,5	96,25

	Sayısal	EşitAğırlık	Sözel
ALES Puanı	86,903	84,518	66,972
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanılabecerisi
Microsoft Office	Çok iyi

*Çokiyi, iyi, orta, zayıfolarakdeğerlendiriniz.

Bilimsel Yayınlar

- New Insights in Bladder Cancer Diagnosis: Urinary miRNAs and Proteins. Amuran GG, Eyuboglu IP, Tinay I, Akkiprik M. Med Sci (Basel). 2018 Dec 7;6(4).
- "Exploring the role of miRNAs in the diagnosis of MODY3". Baltaci, OF, Çolakoğlu Ş, Güllü Amuran G., Aydın N., Karabay A., Berber E, 2018. Turkish Journal of Medical Sciences, 48(3),620-627.
- "Kanserde Genetik Üstü (Epigenetik) Mekanizmalar", M AKKİPRİK, E DİRİCAN, GG AMURAN, A ÖZER, Türk Nöroşirürji Dergisi, 2017;27;2,13.Mart.2017
- "Comparison of telomere length and insulin-like growth factor-binding protein 7 promoter methylation between breast cancer tissues and adjacent normal tissues in Turkish women." Kaya Z, Akkiprik M, Karabulut S, Peker I, **Gullu Amuran G**, Ozmen T, Gulluoglu BM, Kaya H, Ozer A. J Clin Lab Anal. 2016 Oct 24. doi: 10.1002/jcla.22083
- "Correlation between the DNA methylation and gene expression of IGFBP5 in breast cancer."Karabulut S, Kaya Z, **Gullu G**, Peker I, Özmen T, Gulluoglu BM, Kaya H, Erzik C, Ozer A, Akkiprik M. Breast Dis. 2016 Aug 11
- "Identification of Differentially Expressed IGFBP5-Related Genes in Breast Cancer Tumor Tissues Using cDNA Microarray Experiments." Akkiprik M, Peker İ, Özmen T, **Amuran GG**, Güllüoğlu BM, Kaya H, Özer A. Genes (Basel). 2015 Nov 10;6(4):1201-14. doi: 10.3390/genes6041201.
- "Clinical significance of miR-140-5p and miR-193b expression in patients with breast cancer and relationship to IGFBP5." **Güllü G**, Peker I, Haholu A, Eren F, Küçükodaci Z, Güleç B, Baloglu H, Erzik C, Özer A, Akkiprik M. Genet Mol Biol. 2015 Mar;38(1):21-9. doi: 10.1590/S1415-475738120140167. Epub 2014 Mar 17.
- "Detection of PIK3CA gene mutations with HRM analysis and association with IGFBP-5 expression levels in breast cancer." Dirican E, Kaya Z, **Gullu G**, Peker I, Ozmen T, Gulluoglu BM, Kaya H, Ozer A, Akkiprik M. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(21):9327-33.
- "Functional roles and clinical values of insulin-like growth factor-binding protein-5 in different types of cancers." **Güllü G**, Karabulut S, Akkiprik M. Chin J Cancer. 2012 Jun;31(6):266-80. doi: 10.5732/cjc.011.10405. Epub 2012 Feb 7. Review.

Kitap Bölümleri

- Moleküler Üroloji, Ürolojik Hastalıkların Moleküler Temeli, 1. Basım, Editörler: Levent TÜRKERİ, Ayşe ÖZER, Fehmi NARTER, Sayfa 135 – 147, 2012
Sözlü Bildiriler ve Poster Bildirileri
- 18-19 Mayıs 2015 – Zehra Kaya, Mustafa Akkiprik, Sevgi Karabulut, İrem Peker, **Gökçe Güllü**, Tolga Özmen, Ayşe Özer, 'Association of telomere

length variation and IGFBP7 promoter methylation with breast cancer' 3rd Anticancer Agent Development Congress

- 15 Aralık 2012 – 'Meme kanserinde miR-140 ve IGFBP5 Ekspresyon Düzeylerinin Klinopatolojik Faktörlerle İlişkisi', Sözlü Bildiri, IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, Bursa
- 2006-2007 – 'Şizofreni ve Moleküler Temelleri', Bitirme Projesi, Haliç Üniversitesi, İstanbul
- 20-23 Eylül 2006 – 'Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler' 13. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi – Ege Üniversitesi, İzmir
- 22 Eylül 2006 – 'Gıda Mikrobiyolojisi', Poster Sunumu, 13. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi – Ege Üniversitesi, İzmir
- 15 Aralık 2012 – 'Meme kanserinde miR-140 ve IGFBP5 Ekspresyon Düzeylerinin Klinopatolojik Faktörlerle İlişkisi', Sözlü Bildiri, IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, Bursa

Mesleki Sertifikalar

- 13 Eylül 2012 – **Klinik Araştırma Metodları Kursu**, Gelişimsel Pediatri Derneği, Yale Üniversitesi ve Marmara Üniversitesi, İstanbul
- 8-9 Aralık 2012 – **Araştırma Tekniklerine Giriş ve Biyoistatistik Kursu**, Marmara Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü ve Psikofarmakoloji Derneği, İstanbul
- 24-25 Mayıs 2005 – **Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Sertifikası**, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu, İstanbul

Ödüller

- 2015 – **Marmara Tıbbi Hizmetleri Geliştirme ve Yardım Derneği Bilimsel Araştırma Ödülü Yarışması Üçüncülük Ödülü**, İstanbul
- 18 Nisan 2012 – **Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi 7. Araştırma Günleri İkincilik Ödülü**, İstanbul
- 2003 – 2007 - **Haliç Üniversitesi Tam Öğrenim Bursu**, Türkiye Yüksek Öğrenim Kurulu