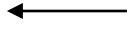


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra eğer basılacak ise yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

MESANE KANSERLİ HASTALARDA UZUN
KODLAMAYAN RNA PVT1 VE MİR-128
EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

TAGHI AHMADI RENDİ

DANIŞMAN
PROF. DR. SEMRA DOĞRU ABBASOĞLU

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2024

İTHAF

Bilim yolunda emek veren herkese, sevgi ve ilgilerini benden esirgemeyen saygıdeğer hocalarıma ve günümüzde ismi her yerde geçen ancak izi görülmeven medeniyette ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda geçirdiğim zaman boyunca desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve yönlendiren saygıdeğer hocalarım anabilim dalı başkanlarımız Prof. Dr. Beşaret Necla Toker ve Prof. Dr. Seldağ Bekpınar'a,

Doktora eğitimim süresince, hem ders hem de uzun bir süreç olan tez döneminde bilgi, birikim ve tecrübelerinden faydalandığım, desteğini bilimsel ve ahlaki olarak hiçbir zaman esirgemeyen, mütevazılığı ve güler yüzüyle her konuda yanımda olan saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Semra Doğru Abbasoğlu'na,

Tezimin gerek laboratuvar çalışmaları aşamasında gerekse yazımında her türlü konuda büyük bir sabırla yardımcı olan, deneyimlerini paylaşan ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen hocam Prof. Dr. Canan Küçükgergin'e,

Ders döneminde bilgi ve birikimlerinden faydalandığım ve deneyimlerinden istifade ettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Evin Ademoğlu, Prof. Dr. Şule Seçkin, Prof. Dr. Yıldız İyidoğan, Prof. Dr. Pervin Vural, Doç. Dr. İlknur Genç, Doç. Dr. Fatih Aydın'a,

İlgi ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve çalışanlarına en içten teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, güzel anılar biriktirip, kalıcı dostluklar oluşturduğumuz, çalışmalarında yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen başta Dr. Murat Kaytaç olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda çalışan personel, asistan veya öğrenci olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın ilk gününden bu yana bana maddi ve manevi destek olan babama, dualarını ve desteklerini eksik etmeyen fedakar anneme, varlıklarıyla hayatıma renk katan beni her zaman güçlü hissettiren kardeşlerime sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

TAGHI AHMADI RENDİ

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2022-38685.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER.....	İ
V	
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Vİİİ
ÖZET.....	Vİİİ
X	
ABSTRACT.....	İ
X	
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
4. BULGULAR.....	36
5. TARTIŞMA.....	48
KAYNAKLAR.....	53
HAM VERİLER.....	67
FORMLAR.....	68
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	69

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Mesane kanserli hastaların demografik ve tümör dokularının özellikleri

Tablo 2: Mesane kanserli hastaların tümör ve tümöre bitişik normal (kontrol) dokulardaki PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeyleri

Tablo 3: Mesane kanserli hastaların tümör ve tümöre bitişik normal (kontrol) dokulardaki miR-128 ekspresyonunun dağılımları

Tablo 4: Tümörün histopatolojik derecesine (düşük veya yüksek) göre PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeyleri

Tablo 5: PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeylerinin patolojik evresi Ta olan grupta tümör derecelerine (düşük, yüksek) göre ilişkisi

Tablo 6: PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeylerinin CIS varlığı ile ilişkisi

Tablo 7: PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeylerinin eşlik eden varyant patoloji ile ilişkisi

Tablo 8: PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeylerinin sigara kullanımı ile ilişkisi

Tablo 9: PVT1 ROC analizi sonucu *cut-off* ve *AUC* değerleri

Tablo 10: MiR-128 ROC analizi sonucu *cut-off* ve *AUC* değerleri

Tablo 11: MiR-128 dereceler (düşük ve yüksek) arası ROC analizi sonucu *cut-off* ve *AUC* değerleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1:** Mesane kanserinin dünya genelinde insidans dağılımları
- Şekil 2:** Mesane kanserinin dünya genelinde mortalite dağılımları
- Şekil 3:** Mesane kanseri tümör evreleri
- Şekil 4:** Protein kodlayan (mRNA) ve kodlamayan RNA'lar (noncoding RNA; ncRNA)
- Şekil 5:** LncRNA'ların rol aldığı epigenetik mekanizmaların şematik gösterimi
- Şekil 6:** LncRNA'ların A) protein, B) DNA ve C) RNA ile etkileşimlerinin şematik gösterimi
- Şekil 7:** LncRNA'ların fonksiyonlarını gerçekleştirirken kullandıkları mekanizmalar
- Şekil 8:** LncRNA'ların protein kodlayan genlerle ilgili konumlarına göre sınıflandırmaları ve yönelimleri
- Şekil 9:** MikroRNA (miRNA) biyogenezi
- Şekil 10:** LncRNA ve miRNA ilişkilerinin şematik göstergesi
- Şekil 11:** LncRNA, miRNA ve protein ilişkisi
- Şekil 12:** Mesane kanserli hastaların tümör ve tümöre bitişik normal (Kontrol) dokulardaki PVT1 ekspresyonunun dağılımları
- Şekil 13:** Mesane kanserli hastaların tümör ve tümöre bitişik normal (Kontrol) dokulardaki miR-128 ekspresyonunun dağılımları
- Şekil 14:** Mesane kanserli hastaların histopatolojik derecelerine (Düşük, yüksek) göre tümörlü dokudaki PVT1 ekspresyon düzeyleri
- Şekil 15:** Mesane kanserli hastaların histopatolojik derecelerine (Düşük, yüksek) göre tümörlü dokudaki miR-128 ekspresyon düzeyleri
- Şekil 16:** PVT1 ekspresyon histopatolojik Ta evresinde derecelere göre düzeyleri
- Şekil 17:** MiR-128 ekspresyon histopatolojik Ta evresinde derecelere göre düzeyleri
- Şekil 18:** PVT1 ve miR-128 gen ekspresyonları arası korelasyon dağılımı
- Şekil 19:** PVT1 ROC analizi sonucu *cut-off* ve *AUC* değeri
- Şekil 20:** MiR-128 ROC analizi sonucu *cut-off* ve *AUC* değeri
- Şekil 21:** MiR-128 dereceler (düşük ve yüksek) arası ROC analizi sonucu *cut-off* ve *AUC* değerleri

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

MK: Mesane kanseri

NcRNA: Kodlamayan RNA (*Noncoding RNA*)

MiRNA: MikroRNA

LncRNA: Uzun kodlamayan RNA (*Long noncoding RNA*)

UTR: Translasyona uğramayan bölge (*Untranslated Region*)

EMT: Epitelyal-mezenkimal geçiş

CIS: Karsinoma in situ (*Carcinoma In Situ*)

TNM: Tümör, lenf nodu ve metastaz

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

UICC: *Union for International Cancer Control*

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ISUP: Uluslararası Ürolojik Patologlar Derneği

AOÇ: Açık Okuma Çerçevesi (*Open reading frame*)

ceRNA: Rekabetçi endojen RNA (*Competing endogenous RNA*)

miRISC: MiRNA ile indüklenen susturma kompleksi

MRE: miRNA yanıt elemanları (*miRNA Responsive Elements*)

AGO: *Argonaute* protein

VEGF: Vasküler endotel büyüme faktörü

TUR-MT: Transüretral mesane tümörü rezeksiyonu

TUR-BT: *Transurethral resection of bladder tumor*

cDNA: Komplementer DNA (*Complementary DNA*)

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu (*Polymerase Chain Reaction*)

ROC: *Receiver Operating Curve*

CT: Eşik değeri (*Cycle Threshold*)

EAA: Eğri Altında Kalan Alan

qRT-PCR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

AÜSS: Alt Üriner Sistem Semptomları

KİOMK: Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanseri

PVT1: *Plasmacytoma Variant Translocation 1*

ÖZET

AHMADI RENDİ, T. (2024). Mesane Kanseri Hastalarda Uzun Kodlamayan RNA PVT1 ve MiR-128 Ekspresyonlarının İncelenmesi.

İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya AD. Doktora Tezi, İstanbul.

Anahtar Kelimeler: Mesane kanseri, NcRNA, LncRNA, MiRNA, PVT1, MiR-128.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2022-38685.

Mesane kanseri (MK) dünya genelinde yaygın bir sağlık sorunudur. Tütün kullanımı, çevresel maruziyetler, diyetel ve genetik faktörlerin yanısıra epigenetik faktörlerin de MK oluşumu ve gelişmesinde rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Son yıllarda, insan genomunun çok sayıda kodlamayan RNA (Non-coding RNA; ncRNA) içerdiği ve bunların çok sayıda transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzenleyici işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir. NcRNA'ların iki ana üyesi olan uzun kodlamayan RNA (lncRNA) ve mikroRNA'ların (miRNA) organizmadaki fizyolojik rollerinin yanısıra çeşitli malignitelerin oluşumunda etkili olabileceği rapor edilmektedir. MK etyopatogenizde birçok lncRNA ve miRNA türü araştırılmış olmakla birlikte, lncRNA PVT1 (*Plasmacytoma Variant Translocation 1; PVT1*), ve miRNA-128 ile MK ilişkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda MK'lı hastalarının tümörlü ve bitişik normal dokularında PVT1 ve miR-128'in ekspresyonlarını inceleyerek, bu ncRNA'lar ile hastaların histopatolojik ve klinik özellikleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesini amaçladık. Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Ürolojik Onkoloji Bilim Dalı'na Mayıs 2022 ve Nisan 2023 tarihleri arasında başvurarak MK tanısı alan 50 hasta dahil edildi. Kasa invaziv olmayan tümörlü doku ve bitişik normal dokuları transüretal mesane tümörü rezeksiyonu (TUR-MT) işlemi sırasında elde edildi. Doku örneklerinden kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile PVT1 ve miR-128 ekspresyonları saptandı. Bulgular Wilcoxon, Mann-Whitney U, Spearman testleri ve ROC (*Receiver Operating Characteristic*) analizi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. MK'lı hastaların tümör dokularındaki PVT1 ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. Yüksek tümör derecesine sahip dokularda, düşük dereceli dokulara göre PVT1 daha yüksek olarak bulundu. Tümör dokularındaki MiR-128 ekspresyonunda bitişik normal dokulara kıyasla artış olmakla birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. PVT1'in aksine, yüksek dereceli tümörlerdeki miR-128 ekspresyonları düşük derecelilerle kıyaslandığında anlamlı bir azalma saptandı. Tümörlü dokuyu normal dokudan ayırt etmek için yapılan ROC analizinde PVT1'in %69 duyarlılık ve %80 özgüllüğe, miR-128'in ise %58 duyarlılık ve %60 özgüllüğe sahip olduğu bulundu. Buna ek olarak, tümörlü dokularda, yüksek dereceli tümörleri düşük dereceli olanlardan ayırmak için yapılan miR-128 ROC analizi ise %55 duyarlılık ve %95 özgüllük gösterdi. Çalışmamız kasa invaziv olmayan MK hastaları için PVT1 ve miR-128'in erken bir biyobeliteç olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, her iki parametrenin duyarlılık ve özgüllüklerinin nispeten düşük olması nedeniyle hasta sayısı arttırılarak, kasa invaziv, yakın ve uzak metastazlı hastaların da dahil edildiği daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

ABSTRACT

AHMADI RENDI, T. (2024). Investigation of Long Non-Coding RNA PVT1 and MiR-128 Expressions in Bladder Cancer Patients.

Istanbul University, Institute of Health Science, Biochemistry. Phd. Thesis, Istanbul.

Key Words: Bladder cancer, NcRNA, LncRNA, MiRNA, PVT1, MiR-128.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2022-38685.

Bladder cancer (BC) is a prevalent global health issue. Alongside tobacco use, environmental exposures, dietary factors, and genetic elements, epigenetic factors have been implicated in the onset and progression of BC. Recent research has revealed that the human genome harbors a substantial number of non-coding RNAs (ncRNAs) with diverse transcriptional and posttranscriptional regulatory functions. Among these ncRNAs, long non-coding RNA (lncRNA) and microRNA (miRNA) play pivotal roles in both malignancy development and physiological processes. While numerous lncRNA and miRNA species have been investigated in the etiopathogenesis of BC, limited studies have explored the association between lncRNA PVT1 (Plasmacytoma Variant Translocation 1; PVT1) and miRNA-128 in BC. Therefore, in our study, we aimed to evaluate the expression of PVT1 and miR-128 in tumorous and adjacent normal tissues of patients with BC, and to assess their correlation with the histopathological and clinical characteristics. Our research encompassed a cohort of 50 individuals who were treated at the Urological Oncology division of the Department of Urology, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul University, from May 2022 to April 2023, all of whom were confirmed to have BC. Tissues from non-muscle invasive tumors, as well as surrounding healthy tissues, were collected through the process of transurethral resection of bladder tumors (TUR-BT). PVT1 and miR-128 levels were assessed through quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The obtained data were statistically analyzed using Wilcoxon, Mann-Whitney U, Spearman tests, and Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis. In patients with BC, PVT1 expression exhibited a statistically significant increase in tumor tissues. Specifically, PVT1 levels were higher in tissues with high tumor grade compared to those with low grade. Although miR-128 expression was elevated in tumor tissues relative to adjacent normal tissues, this increase did not reach statistical significance. Unlike PVT1, miR-128 showed a notable reduction in expression levels in high-grade tumors when contrasted with low-grade ones. In the ROC analysis performed to distinguish tumorous tissue from normal tissue, PVT1 was found to have 69% sensitivity and 80% specificity, while miR-128 had 58% sensitivity and 60% specificity. In addition, miR-128 ROC analysis to distinguish high-grade tumours from low-grade tumours in tumorous tissues showed a sensitivity of 55% and a specificity of 95%. Our study suggests that PVT1 and miR-128 may be an early biomarker for non-muscle invasive BC patients. However, given the relatively low sensitivity and specificity of both parameters, further comprehensive studies involving patients with muscle-invasive, near, and distant metastases are necessary.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri (MK), dünya genelinde en sık görülen 10. kanser türüdür (1). Yaş ilerledikçe MK görülme oranı artmakta olup, erkeklerde kadınlara kıyasla dört kat daha fazla görülür (2). MK olgularının % 90'ı ürotelyal hücrelerden kaynaklanmakta olup (ürotelyal karsinom) (3); çoğunlukla mesanede, nadiren de idrar yollarında meydana gelmektedir (4). Tütün kullanımı ve çevresel maruziyetler, işlenmiş et tüketimi, şistosomiyazis gibi enfeksiyonların yanısıra genetik ve epigenetik faktörlerin de MK oluşumu ve gelişmesinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (5).

İnsan genomunun %98'inin protein kodlamayan (Non-coding; nc) bölgelerden oluştuğu ve bu bölgelerin büyük bir kısmının transkripsiyona uğradığı gösterilmiştir (6). Transkribe edilen non-coding RNA'lar (ncRNA'lar), ribozomal RNA (rRNA) ve transfer RNA (tRNA)'yı içeren yapısal RNA'lar ve düzenleyici RNA'lardan oluşmaktadır (7). Düzenleyici ncRNA'lardan uzun kodlamayan (long noncoding; lnc) RNA'lar (lncRNA) 200 nükleotidden daha uzun iken; kısa kodlamayan RNA'ların (small non-coding RNA; sncRNA) uzunluğu 200 nükleotidin altında, genellikle de 15-40 nükleotid arasında değişiklik göstermektedir (8, 9). LncRNA'ların hücrelerin gelişim, farklılaşma gibi çeşitli hücresel süreçlerde ifade edildiği, genlerin transkripsiyonel (bazal ve gen spesifik), post-transkripsiyonel (alternatif kırılma, translasyonel düzenleme, siRNA aracılı düzenleme), diğer epigenetik düzenlemeler (genomik imprinting, telomerik ncRNA'lar, X kromozom inaktivasyonu) gibi bir dizi işleve sahip olduğu gösterilmiştir (10). MikroRNA (miRNA)'lar ise sncRNA'ların önemli bir alt grubu olup, posttranskripsiyonel gen susturma ile ilişkilendirilen son derece korunmuş bir RNA sınıfıdır (11). MiRNA'lar insan genlerinin yaklaşık %3'ü tarafından kodlanmasına rağmen, insan protein kodlayan genlerinin yaklaşık %30'unu düzenleyebilmektedir. Bir miRNA'nın sahip olabileceği çoklu hedefler, insanlarda pek çok önemli metabolik yolun düzenleyebilmesini açıklamaktadır . Bu da metabolizma, büyüme, gelişme, bağışıklık ve diğer hücre mekanizmaları dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlevleri düzenlediğini ifade etmektedir (12). Yapılan çalışmalar lncRNA ve miRNA'ların çeşitli kanserlerin yanısıra kardiyovasküler, nörodejeneratif ve pek çok diğer hastalığın etyopatogenezinde rol oynadığını göstermiştir (13). LncRNA ve miRNA'ların ekspresyon profillerinin dokulara spesifik olması, farklı patolojik

durumlarda değişim gösterebilmeleri ve bu değişikliklerin seruma da yansıyabilmesi onları potansiyel “biyobelirteç adayları” konumuna getirmektedir (14).

PVT1 (Plasmacytoma Variant Translocation 1), insan PVT1 geninde kodlanan uzun bir intergenik lncRNA'dır. PVT1 ekspresyonlarının meme ve over kanseri, pankreatik duktal adenokarsinom, kolanjiyokarsinom, tiroid karsinomu, malign plevral mezotelyoma, pediatrik malign astrositom ve akut miyeloid lösemi gibi çeşitli kanserlerde tümör dokusunda normal dokulara kıyasla arttığı gösterilmiştir (15). MiR-128 ise normal dokulardaki fizyolojik rollerinin yanı sıra, tümör hücrelerinde önemli bir düzenleyici olarak rol oynamaktadır (16). MiR-128 ile yapılan çalışmalar, tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduğunu kanıtlanmıştır (17). miR-128'in tümör hücrelerinde bölünme, EMT, tümör büyümesi, anjiyogenez ve invazyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (18, 19). Son zamanlarda ise miR-128'in çeşitli kanser türlerinde; göğüs, kolon, over ve pankreas kanseri ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (16). MK etyopatogenizde birçok lncRNA ve miRNA türü araştırılmış olmakla birlikte, yaptığımız literatür taramasında lncRNA PVT1 ve miRNA-128 ile MK ilişkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır (20, 21). Cui ve ark. tarafından in vitro olarak mesane hücre kültürlerinde yapılan bir çalışma PVT1 ve miR-128'in MK'da önemli fonksiyonlara sahip ve ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (20). Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda kasa invaze olmayan MK'lı hastalarda klinik ve histopatolojik parametreler ile tümör ve tümöre komşu normal dokudaki PVT1 ve miR-128 ekspresyonlarının ilişkisini aydınlatmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane kanseri epidemiyolojisi

2.1.1. İnsidans

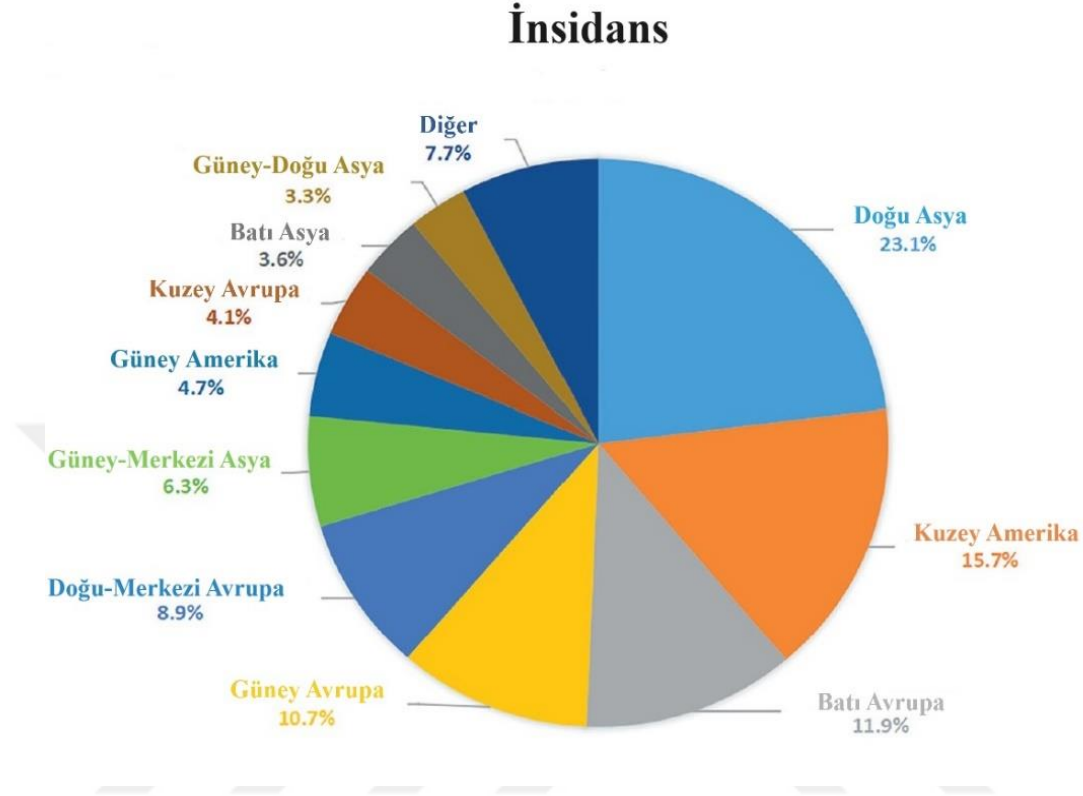
Mesane kanseri (MK) dünya genelinde en yaygın tanı konulan 10. kanser türüdür (22). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı IARC (*International agency for research on cancer*) tarafından GLOBOCAN 2020 adı ile dünya genelindeki kanser yüküne ilişkin sunulan raporlar, MK erkek kanser olguları içinde insidans bakımından 6. sırada yer aldığını ve idrar yolu sisteminin en yaygın malign tümörlerinden biri olduğunu göstermiştir (23).

MK insidansının coğrafi bölgelere göre değişiklik gösterdiği, insidansın en yüksek olduğu ülkelerin büyük ölçüde doğu asya, güney ve batı avrupa ile kuzey amerika'da bulunduğu bildirilmiştir (24, 25). Yaşa göre standardize edilmiş insidans oranları (her iki cinsiyet dahil, yılda 100,000 kişi başına) Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da 11, Kuzey Afrika'da 8.9, Batı Asya'da 8.6, Batı Afrika'da 2.0, Orta Afrika'da 1.6, Orta Amerika'da 2,2 ve Güney-Orta Asya 1,9'dur (25).

Ülkelerdeki sıklığına bakıldığında ise, ABD'de MK insidansı 1975 yılında 100,000 kişide 19.3'den, 1987 yılında 21.6'ya ulaşarak zirve yapmış ve o tarihten itibaren geçen on yılda sürekli olarak azalarak 2016 yılında 18.1'e düşmüştür. Almanya ve Bulgaristan gibi birçok Avrupa ülkesinde MK insidansı artarken; Yeni Zelanda, son 10 yıl içinde neredeyse %11 oranında insidansta azalış sağlayarak önemli bir gelişme kaydetmiştir (25).

MK, dünya genelinde kadınlara kıyasla erkeklerde dört kat daha yaygındır. Yaşa göre düzeltilmiş MK insidansı (100,000 kişi başına yılda) dünya genelinde erkeklerde 9.5, kadınlarda 2.4 olup; Avrupa'da bu oran sırasıyla 20 ve 4.6 olarak rapor edilmiştir (22). Erkekler arasında en yüksek MK insidansına sahip ülke Yunanistan'dır (25). Türkiye Sağlık Bakanlığı'nın 2018 yılında yayınladığı Kanser İstatistikleri raporuna göre, MK insidansı erkeklerde tüm yaş kategorilerinde %8 olarak belirtilmiştir (26). Kadınlar arasında insidansın en yüksek olduğu ülke Lübnan, bölge ise Güney Avrupa'dır. Güney Avrupa'da yaklaşık her yıl 26.5/100,000 erkek ve 5.5/100,000 kadının hastalığa yakalandığı rapor edilmiştir (25).

Yaşam boyu tüm dünyada MK'ya yakalanma riski erkeklerde yaklaşık %1.1 iken, kadınlarda %0.27 olarak bildirilmiştir (25).

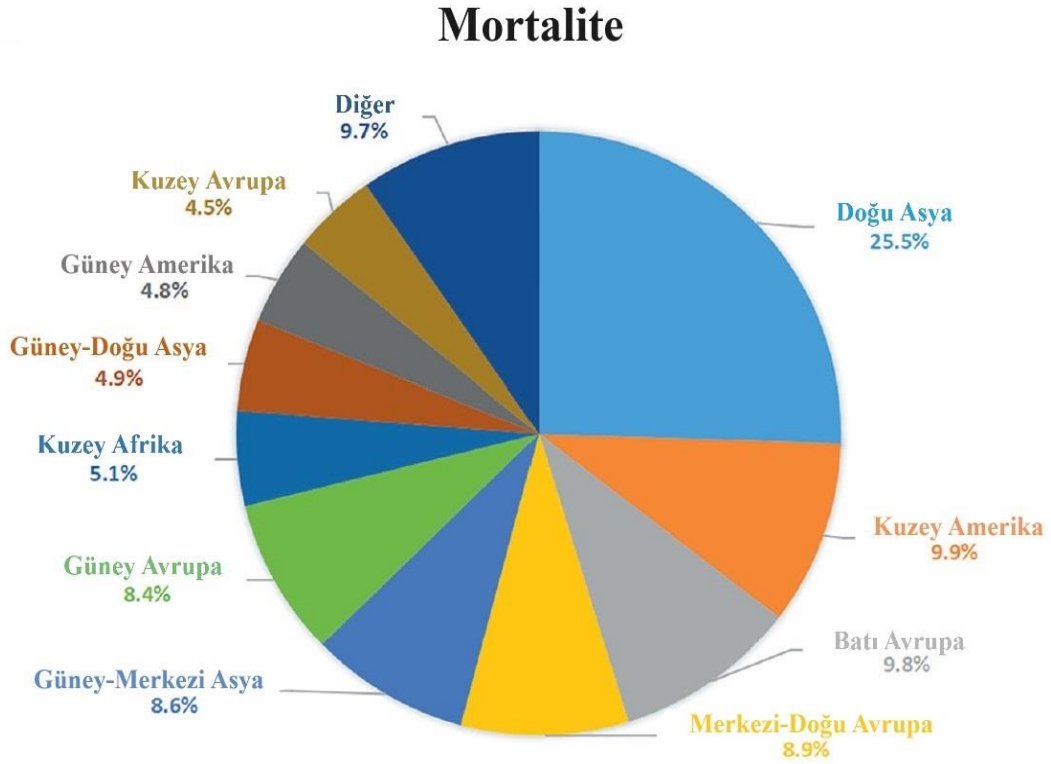


Şekil 1: Mesane kanserinin dünya genelinde insidans dağılımları (24).

2.1.2. Mortalite

MK mortalite açısından 10. Sırada yer almakta olup; GLOBOCAN raporuna göre 2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 573,000 yeni MK olgusu ve 213,000 ölüm kaydedilmiştir (23) . Bu rakam, tüm kanserlerden ölümlerin %2.1'ini oluşturmaktadır. 2021 yılında sunulan bir raporda yaşa göre düzeltilmiş mortalite hızı, dünya genelinde (100,000 kişi başına yılda) erkeklerde 3.3, kadınlarda ise 0.86 olarak belirtilmiştir (22). Doğumdan 74 yaşına kadar MK'dan ölme riski dünya genelinde erkeklerde %0.29, kadınlarda ise %0.08'dir (25). Mortalite oranı yüksek olan bölgeler Kuzey ve Doğu Afrika ile Orta Doğu'dur. En yüksek mortalite oranı Mısır'da saptanmıştır (6.6/100,000) (22). Buna ek olarak, İzlanda, Ekvador ve Filipinler gibi birkaç ülkede mortalite oranlarında eskiye oranla artış olduğu rapor edilmiştir (25). ABD'de her yıl 80,000' den fazla yeni olgu saptanmakta olup, 2020 yılında yaklaşık 17,000 ölüm bildirilmiştir (27). Bu sayı tüm kanser ölümlerinin %2.9'unu oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bu oranın diğer kanserlere (%4.6) oranla düşük olması MK'nın sağkalım oranının daha fazla

olduğunu göstermektedir. Erken tanı, rezeksiyon ve hedefli tedavi tekniklerinin geliştirilmesi mortalitedeki azalmanın nedenleri olarak gösterilmektedir (25).



Şekil 2: Mesane kanserinin dünya genelinde mortalite dağılımları (24).

2.1.3. Sağkalım

ABD’de MK için 5 yıllık sağkalım oranı %77.1’dir (28). Tanı alanların %51’i karsinoma in situ olup; 5 yıllık sağkalım oranı %95.8 olarak rapor edilmiştir. Hastalığın yalnızca lokal (perivezikal) olarak yayıldığı olgularda (tüm olguların %34’ü) bu oran %69.5’e düşmektedir. Bölgesel (ekstravezikal komşu organlara) yayılmış olgularda (tüm olguların %7’si) bu oran %36.3’e düşerken, metastatik hastalıkta (tüm olguların %5’i) sağkalım %4.6’dır. Bu istatistik, erken teşhisin başarısını açıkça göstermektedir. ABD’de 5 yıllık sağkalım oranı 1975 yılında %71.9 iken, 2011 yılında %79.3’e yükselmiştir. 10 yıllık sağkalım oranı %70, 15 yıllık sağkalım oranı ise %65 olarak rapor edilmiştir (25, 28).

2.2. MK tipleri, etiyolojisi ve sınıflandırılması

Temel amacı böbreklerden üreter yoluyla alınan idrarı miksiyona kadar depolamak olan mesane, idrar hacmindeki değişikliklere uyum sağlamak için özelleşmiş

hücreler içerir. Transizyonel epitelyal (ürotelyal) hücreler, idrar hacmindeki artışa düzleşerek yanıt verirler (29). Mesaneyi kaplayan düz kas hücreleri ise gevşeyerek daha büyük hacimler için yer açarken; idrarı üretradan dışarı atmak için istemli veya refleks kontrol altında kasılarak sıkıştırabilmektedir. Mesane ve idrar yollarını kaplayan ürotelyal hücreler, böbrekler tarafından idrara filtre edilen potansiyel mutajenik maddelere sıklıkla maruz kalmaktadırlar (30).

Dünya genelinde (özellikle de gelişmiş ülkelerde) MK olgularının %90'ı ürotelyal hücrelerden kaynaklanmakta olup (Ürotelyal karsinom); çoğunlukla mesanede, nadiren de idrar yollarında meydana gelmektedir. MK olgularının %5'i skuamöz hücrelerden, kalan %5'i ise, adenokarsinom, sarkom ve sekonder mesane metastazları gibi nadir alt tiplerden oluşmaktadır (31).

MK tanısı konulan hastaların yaklaşık %75'inde hastalık mukoza (Evre Ta veya CIS) veya submukoza (Evre T1) ile sınırlı olup (kasa invaziv olmayan; non-muscle invasive MK; NMIBC) daha genç hastalarda (<40 yaş) NMIBC oranı daha da yüksektir (25, 32).

2.2.1. Tümör, nod ve metastaz sınıflaması (TNM)

MK'da yaygın kabul edilen Tümör, nod ve metastaz (TNM) sınıflandırma sistemi AJCC (*American joint committee on cancer*) 8. baskısına göre en son 2016 güncellenmiştir (33). Bu klasifikasyona göre:

T- Primer Tümör

Tx- Primer tümör değerlendirilememiştir

T0- Primer tümöre ait kanıt bulunmamaktadır

Ta- İnvaziv olmayan papiller karsinom

Tis- Karsinoma in situ (CIS: *Carcinoma in situ*)

T1- Subepitelyal bağ doku invazyonu

T2- Kas invazyonu

T2a- Yüzeyel kas dokusu invazyonu

T2b- Derin kas dokusu invazyonu

T3- Perivezikal doku invazyonu

T3a- Mikroskobik

T3b- Makroskobik (Ekstravezikal kitle mevcut)

T4- Ekstravezikal komşu organ tutulumu

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

T4b- Pelvik duvar veya karın duvarı invazyonu

N- Bölgesel Lenf Düğümleri

Nx- Lenf düğümü değerlendirilememiştir

N0- Bölgesel lenf düğümü metastazı bulunmamaktadır

N1- Gerçek pelviste tek lenf nodu metastazı

N2- Gerçek pelviste multipl lenf nodu metastazı

N3- Ana iliak lenf nodu metastazı

M- Uzak Metastaz

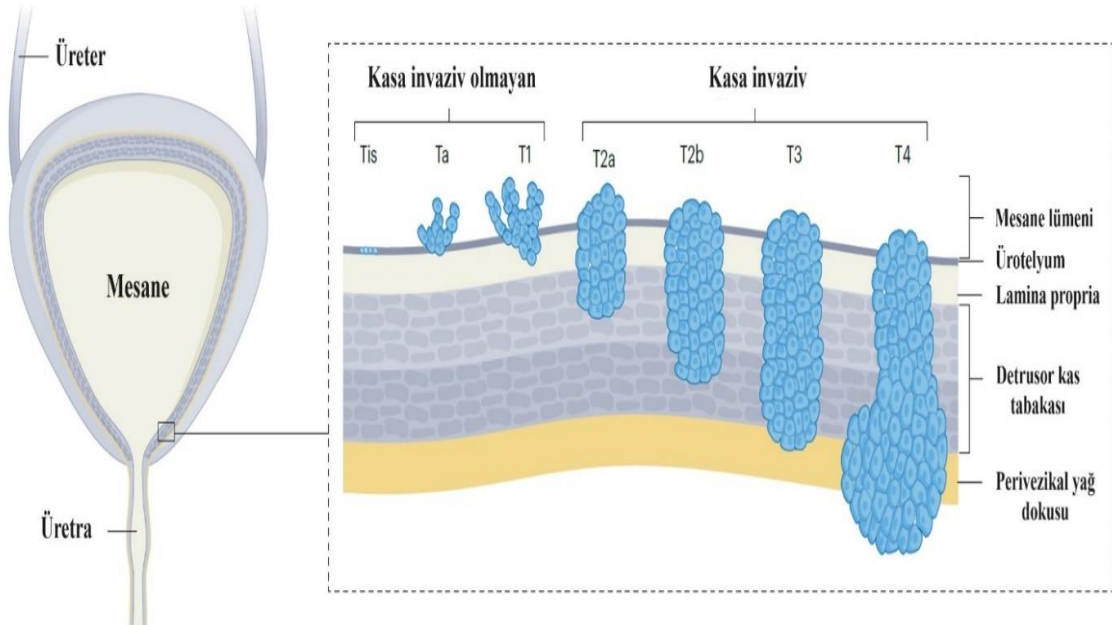
M0- Uzak metastaz bulunmamaktadır

M1- Uzak metastaz var

M1a- Bölgesel lenf düğümleri dışında lenf düğümlerine metastaz

M1b- Diğer uzak metastazlar'dan oluşmaktadır.

TNM sınıflandırmasına göre, mukozaya sınırlı tümörler Ta evresi olarak adlandırılırken, lamina propriayı tutan tümörler T1 evresi olarak tanımlanır. Mukoza ile sınırlı intraepitelyal yüksek dereceli tümörler ise CIS evresi olarak kabul edilir. Bu evreler, kasa invaziv olmayan MK (KİOMK) olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 3) (34).



Şekil 3: Mesane kanseri tümör evreleri (34).

2.2.2. Mesane Tümörlerinin histolojik derecelendirilmesi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (ISUP: *International Society of Urological Pathology*) tarafından histolojik dereceye göre sınıflandırma eski sınıflamalara kıyasla 2004 yılında yeniden düzenlenmiş ve 2016 yılında güncellenmiştir (35). Bu derecelendirme sistemine göre:

1. Ürotelyal papilloma
2. Düşük malign potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm
3. Düşük dereceli karsinom (*Low Grade*)
4. Yüksek dereceli karsinom (*High Grade*) olarak sınıflandırılmıştır (35).

2.3. MK'yı etkileyen risk faktörleri

2.3.1. Yaş

MK riskinin yaş ilerledikçe arttığı gösterilmiştir. ABD'de olguların %90'ı 55 yaş, %80'i 65 yaş üzerindedir (36). MK tanısı için ortalama yaşın 70 olduğu rapor edilmiştir (2). Bu rakam, herhangi bir kanser teşhisi için ortalama yaşın (65-70 yaş arası) üzerindedir ve hücrel tümör baskılayıcı mekanizmaları aşarak kanser oluşumuna yol açan mutajenlere maruziyetten sonra onlarca yıl gerektiren bir hastalık seyrini göstermektedir (36).

Son derece nadir olmasına rağmen, MK çocuklarda ve genç yetişkinlerde de görülebilir (37). Bu dönemde genellikle düşük dereceli, invaziv olmayan bir hastalıkla ortaya çıkar (25, 36).

2.3.2. Cinsiyet

Dünya genelinde MK insidansı, erkeklerde kadınlara kıyasla yaklaşık dört kat daha fazladır. Benzer şekilde, mortalite de erkeklerde yaklaşık dört kat daha yüksektir (38). MK erkekler arasında en yaygın 6. ve en ölümcül 9. kanser türü olarak bilinmektedir. Erkekler arasında MK insidansının yüksekliğini açıklamak için birkaç teori öne sürülmüştür. MK'nın en bilinen risk faktörü olan sigara içimi, dünya genelinde erkekler arasında kadınlardan çok daha yaygındır (5, 39). Kadınlarda da sigaranın yaygın olduğu Lübnan gibi bazı ülkelerde, MK insidansı bu cinsiyetteki en yüksek düzeydedir (25). Bununla birlikte, tüm sigara içenler arasında MK mortalitesi karşılaştırıldığında, bu oran erkeklerde yüksek kalmaya devam etmektedir. Ayrıca, MK

başlangıç yaşının da sigara içenlerde içmeyenlere kıyasla yaklaşık 6 yıl daha erken olduğu gösterilmiştir (36).

Karsinojenlerin metabolizmasında da cinsiyetler arasında farklılıklar olabilmektedir. Aromatik aminlerin katabolizmasında ve ksenobiyotik detoksifikasyonunda rol oynayan enzimlerin erkeklerde ve kadınlarda farklı şekilde ifade edildiği gösterilmiştir (40). Ayrıca, cinsiyet steroidlerinin sentezi ve reseptör ifadesindeki varyasyonlar cinsiyet farklarının temelini oluşturmaktadır. Menarş yaşı, doğurganlık ve östrojen/progestin içeren ilaçların kullanımı cinsiyet steroidi maruziyetini etkilediğinden MK riski ile ilişkilendirilmiştir. Menarş yaşının 15'in üzerinde olması, doğurganlık sayısının fazla olması (nulliparlara kıyasla), östrojen veya progestin preparatlarının kullanımı MK riskini azaltmaktadır (41).

Tümör biyolojisi açısından, androjen reseptörlerinin (AR) varlığı da MK oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. MK' lı hasta örneklerinin immünohistokimyal incelemelerinde AR ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir ve bu azalış tümör evresi ve derecesi arttıkça daha da belirginleşmektedir (36, 41).

2.3.3. Tütün, mesleki ve çevresel maruziyetler

İnsani gelişme indeksi (HDI: *Human Development Index*) ortalamanın altında olan ülkelerde MK insidansının en düşük olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni muhtemelen endüstriyel kaynaklı kimyasal madde maruziyetinin daha az olması ve sınırlı tütün erişimidir. Başka bir deyişle, MK insidansı, HDI ile pozitif yönde ve daha az ölçüde de kişi başına düşen gayri safi yurtiçi hasıla ile ilişkili olduğu söylenebilir (42).

Tütün, MK' nın en bilinen nedenidir. Tüm ürotelyal karsinom olgularının %30-40'ının ve tüm MK olgularının yaklaşık %50'sinin tütün kullanımından kaynaklandığı bildirilmektedir (43). Dünya genelinde bir milyardan fazla aktif sigara içicisi bulunmakta olup; sigara içenlerde MK gelişme olasılığı 2-3 kat daha fazladır (36). Tütün dumanı, beta-naftilamin ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar da dahil olmak üzere çeşitli kanserojenleri içerir. Bu karsinojenler DNA hasarı oluşturarak kalıcı genetik mutasyona neden olur. Bu mutasyonlar, onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu sonucu kanser gelişimine yol açmaktadır. Detoksifikasyon enzimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların da, sigara içenlerde

kanser eğilimini artırdığı gösterilmiştir (44). Yan ve ark. tarafından yapılan meta analizde pasif içicilerde sigara dumanına maruz kalmayanlara göre MK riskinin %22 daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum gelişmiş dünya ülkelerinde kadınlarda kanserin neden arttığını da açıklamaya yardımcı olabilir (45). ABD’de MK olgularının %50-65’i tütün dumanıyla ilişkilendirilmektedir, bu da hastalığın en büyük risk faktörü olduğunu desteklemektedir (36).

Deri ve akciğerlerde olduğu gibi, mesane de karsinojenlere sürekli maruz kalabilen bir organdır. MK için ikinci büyük, kaçınılmaz risk faktörü, 2-naftilamin, 4-aminobifenil ve benzidin gibi aromatik aminlere mesleki maruziyettir (46); bu maddeler tüm MK olgularının %5-10’undan sorumludur. Bu bileşikler sıklıkla boyalar, metaller, lastik ve petrol ürünleri üretiminde kullanılır. Kimyasallar ve boyalarla yakın temaslı çalışmak MK için yüksek risk oluşturmaktadır. Aromatik aminlere maruziyet riski en yüksek olan meslekler tütün, boya, lastik ve deri endüstrisinde çalışanlar, kuaförler ve ressamlardır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruz kalınan diğer meslekler ise, baca temizleyiciler, hemşireler, alüminyum işçileri, petrol işçileri, itfaiyeciler, denizciler ve fungusitler kullanan çiftçilerdir (47).

Genel olarak, mesleki maruziyetlerin MK olgularının %18’inden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Şili’de yapılan prospektif bir çalışma, hava, toprak ve su içinde doğal olarak bulunan bir metaloid olan arseniğin MK riskini artırdığını ileri sürmektedir (5). Finlandiya’da yapılan başka bir çalışmada, düşük konsantrasyonda arsenik (0.5 µg/L) ve tütün dumanına maruz kalmanın MK riskini artırmada sinerjik bir etkiye sahip olduğunu bulunmuştur. Su kaynağındaki diğer karsinojenler, dezenfeksiyon yan ürünleri veya nitrattan kaynaklanan bileşikler, diyetle alınan selenyum ve çinko gibi metaller MK gelişimini etkileyebilmektedir (25, 36).

2.3.4. Enfeksiyon ve patojenler

Birçok epidemiyolojik çalışmada inatçı veya tekrarlayan bakteriyel üriner sistem enfeksiyonlarının MK gelişme riskini arttırabileceğini ileri sürülmüştür (48). Ancak bazı araştırmacılar, bu durumun kronik hastalıklar nedeniyle aralıklı kateterizasyon, kronik iltihaplı mesane taşı, sigara ve meslek gibi diğer birçok diğer risk faktörü ile birlikte kompleks bir etiyolojiye bağlı olabileceğini düşünmektedirler (36). Enfeksiyon etkenleri arasında gonore öyküsü MK gelişimi ile özellikle önemlidir. Gonore öyküsü olan erkeklerde MK gelişme riskinin yaklaşık iki kat arttığı ve oluşan tümörün daha

agresif seyrettiği gösterilmiştir. Bu durum nitrozaminler gibi karsinojenlerin üretimi ile ilişkilendirilmiştir (49).

Başka önemli bir risk faktörü ise şistosomiyazistir, Şistozomiyazis yaklaşık 200-250 milyon kişiyi etkileyen, yoksul ülkelerde yaygın olarak görülen bir protozoal hastalıktır. Şistozomlar, hem memelilerde hem de ara konaklarda enfeksiyon oluşturabilmesine karşın, *Schistosoma haematobium* (*S. haematobium*), skuamöz hücreli MK ile ilişkilendirilen tek insan şistozomudur. *S. haematobium*, memelilerin mesane venüllerinde yerleşip yumurtalarını bırakarak inflamasyon ve doku fibrozisine neden olur (50). Skuamöz hücreli MK'nın gelişim sürecinde T-helper tip-2 hücrelerinin proinflamatuvar bağışıklık yanıtının katkıda bulunduğu öngörülmektedir. Şistosomiyazisin yaygın olduğu Orta Doğu ve Afrika ülkelerinde skuamöz hücreli MK hepatosellüler karsinomdan sonra en sık görülen ikinci kanserdir. Mesane şistozomiyazis etkeninin N-nitrozo bileşikler gibi kanserojen maddeleri ürettiği, inflamasyonu, N-nitrozaminlerin endojen sentezini ve DNA hasarına neden olan serbest radikalleri arttırdığı gösterilmiştir. Anti-helminetik bir ajan olan praziquantel ile kontrol altına alınabilecek olan bu hastalık ne yazık ki bütün veya kimyasal maruziyetinden çok daha hızlı bir şekilde ortaya çıkmaktadır (36, 51).

2.3.5. Alkol ve kırmızı et

Birçok çalışma, alkolün MK geliştirme riskini hafifçe artırabileceğini, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermektedir (52). Alkolün daha çok hepatosellüler karsinom (53) ve kolorektal karsinom gibi diğer kanserlerin gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (54).

Son yıllarda yapılan bir meta-analiz, yüksek miktarda kırmızı et ve işlenmiş et tüketiminin MK riskini sırasıyla, %17 ve %10 oranında artırdığını göstermektedir (55). Başka bir çalışmada ise, işlenmiş etler için %22'lik bir artış olduğu, kırmızı et tüketiminin ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı açıklanmıştır (56). İşlenmiş etlerdeki nitratlardan kaynaklanan nitrozaminlerin, sıçanlarda mesane tümörlerinin doğrudan gelişimine neden olduğu gösterilmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, işlenmiş eti Grup 1 kanserojen olarak ve kırmızı eti olası bir kanserojen olarak 2015 yılında sınıflandırmıştır. Bununla birlikte, çalışmalarda tavuk ve domuz eti tüketiminin MK riskini artırdığı gösterilmemiştir (55).

2.3.6. Obezite

2015 yılında yapılan bir meta-analiz sonuçları, pre-obezitenin MK riskini %7, obezitenin ise %10 oranında artırdığını göstermiştir (25). Vücut kitle indeksi (VKİ) ile MK riski arasında doğrusal bir ilişki olduğu ve kilo başına 5 kg/m² artışın MK riskinde %4.2’lik bir artışla ilişkilendirildiği rapor edilmiştir. Bu riskin sigara içme, fiziksel aktivite, alkol veya diyetten bağımsız olduğu bilinmektedir (36). 2019 yılında ABD’de yapılan bir araştırmaya göre, erkeklerdeki kanser kaynaklı ölüm vakalarının yaklaşık %14’ü, kadınlardaki ise %20’si aşırı kilo ve obezite ile ilişkilendirilmiştir. Avreginos ve ark. bu çalışmalarında “obezite, insülin direnci ve adipositokin” üçlüsünün kanser gelişimi/ilerlemesi sürecindeki katkısının önemini özellikle vurgulamışlardır. Araştırmacılar obezite ve adipozopatiji kansere bağlayan faktörleri, hiperinsülinemi, insülin direnci, insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) sistemi, sinyalizasyon anormallikleri, subklinik kronik düşük dereceli enflamasyon ve oksidatif stres, adipositokin patofizyolojisindeki değişiklikler, ektopik yağ birikiminden kaynaklanan faktörler, mikro çevre ve hücresel pertürbasyonlar, sirkadiyen ritimlerin bozulması ve diyet besinleri gibi faktörlere bağlamışlardır (57).

Fiziksel aktivitenin, obeziteden bağımsız olarak MK’ ya karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (58). Yapılan çalışmalar dolaşımdaki yüksek D vitamini düzeylerinin de MK oranında azalmaya yol açabileceği düşündürmektedir (59).

2.3.7. Genetik ve kalıtsal faktörler

Çevresel faktörlere ek olarak, genetik faktörlerin de karsinogenez mekanizmasıyla ilişkili olabileceği kanıtlanmıştır (60). Büyüme sinyallerindeki yetersizlik, büyümeyi baskılayıcıların kaybı ve duyarsızlık, otofaji, apoptoz ve nekroz gibi hücre ölümü yollarına direnç, sınırsız replikasyon yeteneği, anjiogenez, mikroçevre, immün yanıtın kaçış kanser gelişiminin temel özellikleridir (61). Kansere neden olan mutasyonların dört ana gen grubunu hedef aldığı bilinmektedir. Bunlar, onkogenler, tümör baskılayıcı, apoptozu düzenleyen ve DNA tamir genleridir. Genetik değişikliklerin önemli bir kısmı onkogen oluşumuna neden olan “işlev kazandırıcı” mutasyonlar iken; diğer bir kısmı ise normal koşullarda hücrelerin uygunsuz şekilde çoğalmasını ve kendi normal bölgelerinin dışında hayatta kalmalarını engelleyen tümör baskılayıcı genlerin “inaktivasyonu”dur (62).

Sporadik MK' ya genetik yatkınlık tam olarak kanıtlanmamış olmakla birlikte; hücre sinyal molekülleri ve yaygın bir onkogen olan MYC'in genetik lokusları ile MK arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (63). Aromatik aminleri detoksifiye etmek için görev yapan N-asetiltransferaz 2 (NAT2) ve diğer çevresel kanserojenlerin detoksifikasyonunda rol oynayan glutatyon S-transferaz 1 (GSTM1) enzimlerini kodlayan genlerdeki tek nükleotid değişiklikleri ve mutasyonların MK için risk faktörü oluşturduğunu gösteren çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır (64). Tümör baskılayıcı bir gen olan "tümör baskılayıcı gen fosfataz ve tensin homolog (PTEN)"de kalıtsal bir bozukluk sonucu ortaya çıkan Cowden sendromu, transizyonel ve skuamöz hücreli ürotelyal kanserler de dahil olmak üzere çeşitli neoplazmlara yatkınlığı artırır. DNA hasar onarımındaki bir bozukluk olan Lynch sendromu, genellikle polipozis olmayan kolorektal kanserle ilişkilendirilen bir durumdur, ancak MK riskini de artırmaktadır (65).

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda MK ile ilişkili olarak iki ana gendeki mutasyonlar sorumlu tutulmuştur. Bunlardan TP53 (Tümör proteini P53) mutasyonları çoğunlukla kötü prognozlu ilerlemiş tümörlerde tanımlanırken; fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) mutasyonları (Özellikle FGFR3) düşük dereceli ve iyi prognozlu MK'larda gösterilmiştir (66, 67). Somatik mutasyonlar arasında büyüme faktörü reseptör (FGFR) mutasyonunun, nüks eden MK hastalarının %20'sinde etkisi olduğu düşünülmektedir (68).

Bunlara ek olarak, literatürde değişmiş ekspresyonları karsinogenezi etkileyen çok sayıda başka gen kategorilerinden de bahsedilmektedir:

1. Apoptozu kontrol eden genler: Kaspaz-3, FAS (Fas hücre yüzeyi ölüm reseptörü), BCL-2 (*B-Cell CLL/Lymphoma 2*) ve survivin.
2. Anjiyogenezi kontrol eden genler: Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve trombospondin 1.
3. Sinyal yollarını ve hücre-hücre etkileşimini kontrol eden genler: Üroplakinler ve RAS (Sıçan sarkom viral onkogen homologu) (69).

2.4. Epigenetik ve Kanser

Kelime olarak genetik üstü/ötesi anlamına gelen epigenetik, gen dizisinde bir değişiklik olmadan gen ifadesinde meydana gelen değişiklikleri açıklar (70). Epigenetik

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve başta miRNA olmak üzere kodlamayan RNA'lar ile ve tüm bunların birbirini etkileyen kompleks ilişkilerinden meydana gelmektedir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gen transkripsiyonunu etkiler, oysa RNA interferansı post-transkripsiyoneldir (71).

2.4.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu genomda en çok genlerin promoter bölgelerinde bulunan CpG dinükleotidlerindeki sitozinlerin 5. pozisyonundaki karbonuna bir metil grubu eklenmesiyle oluşmaktadır (72). Memeli genomundaki metilasyon paternleri germ hücrelerinde ve embriyonun preimplantasyon döneminde yeniden programlanır. Bu dönemde anneden ve babadan gelen metilasyon paternleri silinip, kişiye ve dokuya özel olarak yeniden dizayn edilmektedir. DNA metilasyonu organizmada transkripsiyonun düzenlenmesi, doku spesifik gen ekspresyonu ve gelişimsel evrelerin kontrolü, genom bütünlüğünün korunması, genomun aktif gen ya da kondanse bölgeler şeklinde yapılanması ve yerleşimi, genomun transpozisyon ve tekrarlarından korunması, genomik imprinting ve X kromozom inaktivasyonu gibi pek çok fizyolojik süreçte rol oynamaktadır (73). Normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinin genlerinde önemli ölçüde DNA hipometilasyonunun bulunduğu gösterilmiştir. Hipometilasyonun kromozomal instabilite oluşumu, yer değiştirebilen elementlerin reaktivasyonu ve imprinting kaybı ile tümör gelişimine katkıda bulunur. Genomik DNA'nın hipometilasyon derecesi, bazı tümörler de iyi huylu hücre proliferasyonlarından invaziv kanserlere doğru ilerledikçe artar (74). Buna ek olarak, tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgelerindeki hipermetilasyon da bu genlerin ekspresyonunu değiştirerek tümör oluşumuna neden olabilmektedir. DNA metilasyonunun karmaşık bir kromatin ağında meydana geldiği ve histon yapısındaki değişikliklerden de etkilendiği gösterilmiştir (75).

2.4.2. Histon modifikasyonları

Histonlar, kromatinin ana protein bileşenidir. Nükleozom ise 147 baz çift DNA'yı saran ve dört çekirdek histondan (H2A, H2B, H3 ve H4) oluşmaktadır (76). Histonların modifikasyonu, daha az karakterize edilmiş başka bir epigenetik modifikasyon mekanizmasıdır. Histonların kuyrukları globüler çekirdekten dışarı doğru uzandığından post-translasyonel modifikasyonlara izin vermektedir. Histonlarda 100'den fazla post-translasyonel modifikasyon gerçekleşebilmektedir. Bu durum "histon dekorasyonu"

adlandırılır ve bir çeşit “histon kodu” oluşturduğu düşünülmektedir. Histonların asetilasyonu ve metilasyonunun gen transkripsiyonu, DNA onarımı, DNA replikasyonu ve kromozomal organizasyon üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (77).

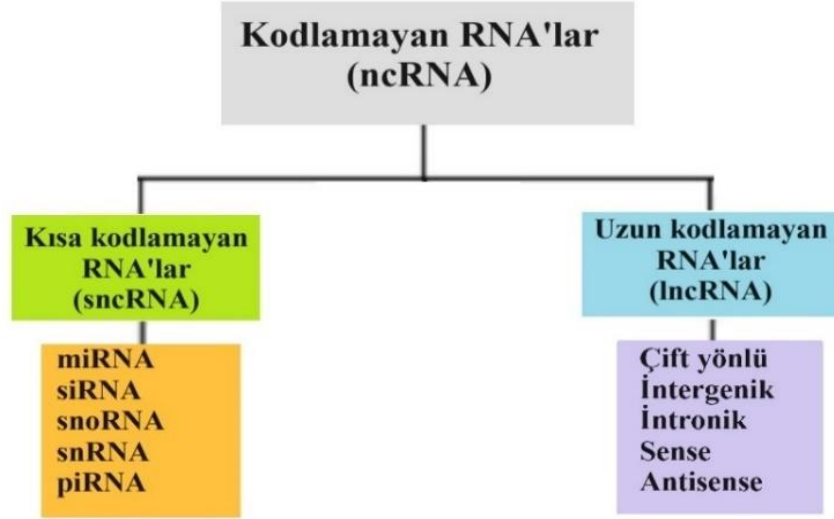
Histon asetilasyonu, aktif bir kromatin durumu işaretler. Histon asetiltransferazlar ve deasetilazlar gibi histonların post-translasyonel modifikasyonları kanserlerin başlaması, ilerlemesi ve metastazında tanımlanmıştır ve bu olaylardan bazıları kötü prognoz göstergesini yansıtmaktadır. Birkaç yeni histon post-translasyonel modifikasyonu, tümör baskılanmasındaki rolleri ve ayrıca bazılarının onkojenik işlevler sergilemesi nedeniyle dikkat çekici bir çalışma konusu olmuştur. Histon kinazlar tarafından histon fosforilasyonu, poli-ADP ribozilasyonu ve histon ubiquitinasyonu, transkripsiyon regülasyonunda ve kanser gelişiminde çok adımlı ve çeşitli yolların aktivasyonunda rol oynamaktadırlar (78).

2.4.3. Kodlamayan RNA’lar (Non-coding RNA; ncRNA)

Transkriptom analizlerindeki son gelişmeler, insan genomunun çok sayıda kodlamayan RNA (Non-coding RNA; ncRNA) içerdiğini ve bu RNA transkriptlerinin proteine çevirilmediğini göstermiştir. Protein kodlamayan bu bölgeler, yakın bir zamana kadar çöp (*Junk*) veya transkripsiyonel gürültü olarak tanımlanmış; zamanla RNA transkribe eden binlerce gen içerdiği belirlenmiştir (79). Günümüzde bir proteine çevrilmeyen bu ncRNA transkriptlerinin çok sayıda transkripsiyonel, posttranskripsiyonel ve epigenetik düzenleyici işlevlere sahip olduğu, hem zaman hem de lokasyon olarak kontrollü bir şekilde ifade edildiği ortaya konmuştur. Kanserde değişen metabolizmanın da esas olarak hücre çoğalması ve büyümesinde yer alan sinyal yolları tarafından düzenlendiği ve bunların ncRNA’ların da dahil olduğu epigenetik mekanizmalar yoluyla kontrol edildiği ileri sürülmektedir (80).

NcRNA’lar, ribozomal RNA (rRNA) ve transfer RNA (tRNA)’yı içeren yapısal RNA’lar ve düzenleyici RNA’lar olarak başlıca iki sınıfa ayrılmaktadır. Düzenleyici RNA’ların sınıflandırılmasında yaygın olarak uzunluğa dayalı sınıflandırma kullanılır. Uzun kodlamayan (Long noncoding; lnc) RNA’lar (lncRNA) 200 nükleotidden daha uzun iken; kısa kodlamayan RNA’ların (small non-coding RNA; sncRNA) uzunluğu 200 nükleotidin altında, genellikle de 15-40 nükleotid arasında değişiklik göstermektedir. SncRNA’lar, mikroRNA (miRNA), küçük inhibitör RNA (small

inhibitory interfering RNA; siRNA), küçük nükleolar RNA (Small nucleolar RNA; snoRNA), küçük nükleer RNA (Small nuclear RNA; snRNA), ve piwi ilişkili RNA (RNAs interacting with PIWI; piRNA)'lardan oluşan heterojen bir gruptur (Şekil 4) (81).



Şekil 4: Protein kodlayan (mRNA) ve kodlamayan RNA'lar (noncoding RNA; ncRNA) (miRNA; mikroRNA, siRNA; small interferingRNA, snoRNA; small nucleolarRNA, snRNA; small nuclearRNA, piRNA; interacting with PIWI RNA) (82).

2.4.3.1. Uzun kodlamayan RNA'lar

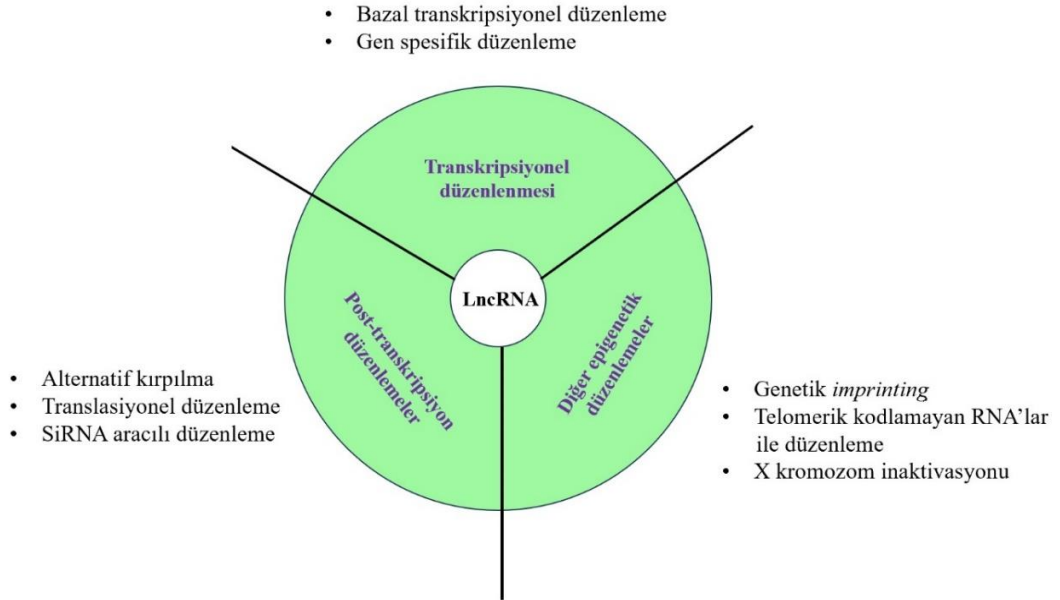
LncRNA'lar ilk kez farelerdeki cDNA kütüphanelerinin büyük ölçekli dizilemesi sırasında tanımlanmıştır (83). İlk memeli lncRNA'sı olan H19, 1989'da keşfedilmiş (84) bunu takiben, memelilerde X kromozom inaktivasyonunda önemli rol oynayan lncRNA Xist tanımlanmıştır (85). Günümüzde 15,000'den fazla lncRNA'nın insan genomu tarafından kodlandığı düşünülmektedir (86).

LncRNA'lar hücre içinde özellikle nükleusun kromatin bölgelerinde yoğun olarak bulunur. Bununla birlikte, sitoplazma ve diğer hücre içi bölmelerde de yerleşim gösterebilirler. Lokalizasyon analizleri sitoplazmik lncRNA'ların başlıca ribozomlarda konumlandığını göstermiştir. Mitokondri ise nükleer DNA ile kodlanmış bazı lncRNA'lar için diğer bir yerleşim alanıdır (87). Nükleer lncRNA'lar hedef genlerini cis- veya trans-etkili bir şekilde düzenleyebilir. Cis-etkili lncRNA'lar komşu genleri

hedef alırken, trans-etkili olanlar uzak lokuslar üzerinde bir işleve sahiptir. Farklı yakınlıktaki genler üzerindeki etkilerine rağmen, çalışma prensipleri benzerdir. LncRNA'ların ekspresyonu çoğunlukla dokuya özgüdür ve çeşitli fizyolojik/patolojik koşullar altında düzenlenmektedir (88).

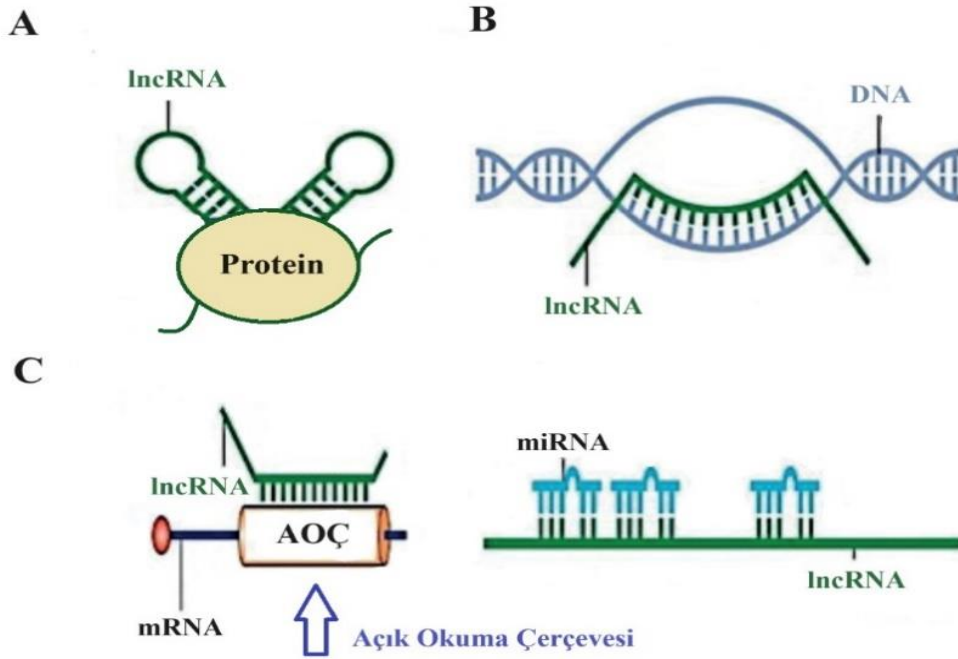
LncRNA'lar, mRNA'lar gibi RNA polimeraz II (*Pol II*) tarafından transkribe edilir, aynı mRNA'larda olduğu gibi kesip-çıkarma işlemi ile ekzonlar birleştirilir, 5'-ucuna şapka, 3'-ucuna poliadenil kuyruğu eklenir. LncRNA genlerinin farklı bölgeleri, promoterler, ekzonlar ve intronlar ile karşılaştırıldığında, genlerin en çok korunan bölgeleri olarak görülürler (89).

LncRNA'ların hücrelerin gelişim, farklılaşma gibi çeşitli hücresel süreçlerde ifade edildiği, genlerin transkripsiyonel (bazal ve gen spesifik), post-transkripsiyonel (alternatif kırılma, translasyonel düzenleme, siRNA aracılı düzenleme), diğer epigenetik düzenlemeler (genomik imprinting, telomerik ncRNA'lar, X kromozom inaktivasyonu) gibi bir dizi işleve sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 5) (87).



Şekil 5: LncRNA'ların rol aldığı epigenetik mekanizmaların şematik gösterimi (87).

LncRNA'lar işlevlerini protein, DNA ve RNA ile birebir moleküler etkileşim sağlayarak gerçekleştirmektedirler (Şekil 6) (90).



Şekil 6: LncRNA'ların A) protein, B) DNA ve C) RNA ile etkileşimlerinin şematik gösterimi (90).

LncRNA'lar bu moleküllerle etkileşerek sinyal, tuzak, kılavuz (Rehber) ve moleküler iskeleler olarak dört farklı şekilde fonksiyonlarını gerçekleştirebilmektedir (Şekil 7) (90).

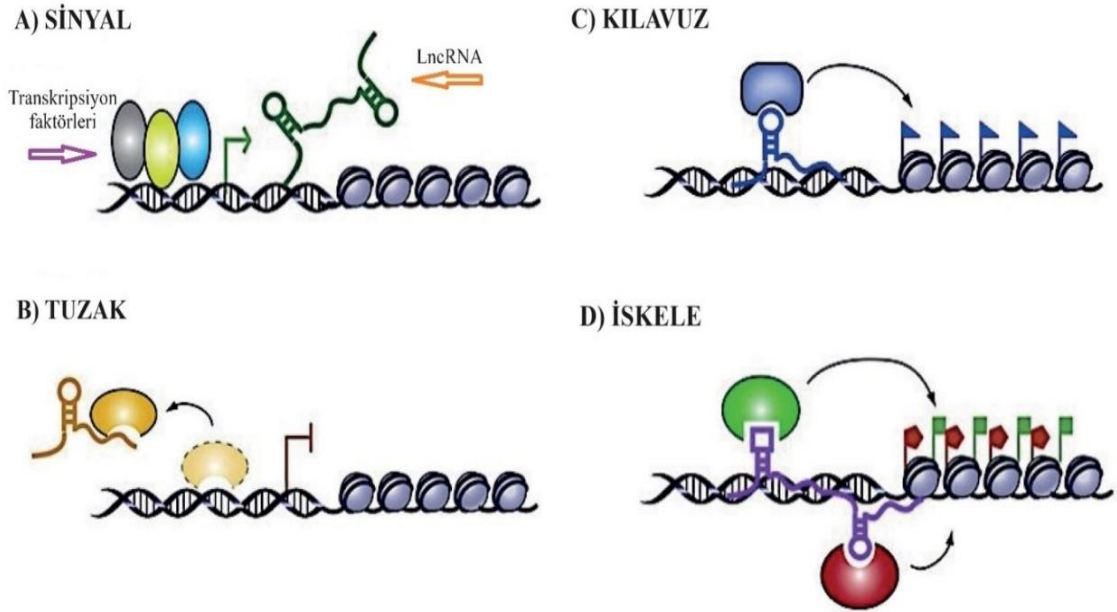
A) Sinyal LncRNA'lar: Sinyal LncRNA'lar, çeşitli uyaranlara yanıt olarak sadece belirli bir yer ve zamanda eksprese edilen LncRNA tipidir. Doğrudan genomik DNA'ya bağlanarak veya transkripsiyon faktörü ile birleşerek belirli genomik bölgelere proteinlerin yönlendirilmesini sağlarlar ya da proteinlerin belirli DNA bölgelerine bağlanmasını engelleyebilirler. Bu LncRNA'lar gen düzenlemesinin zamanlamasını ve lokalizasyonunu belirlerler. Bazı sinyal LncRNA'lar, hedeflenen proteinlerin ifadelerini azaltarak negatif düzenleyiciler (*Downregulation*) olarak regülasyon sağlarlar. Bu tür uzun kodlamayan RNA'lar (LncRNA'lar), kromatin modifiye edici enzimlerle (örneğin histon metiltransferazlar) etkileşime girerek hedef genlerin susturulmasını sağlayabilirler. Bu etkileşim, transkripsiyonel engelleme veya heterokromatin oluşturma yoluyla gerçekleşebilir (Şekil 7A).

B) Tuzak görevi yapan LncRNA'lar: Çeşitli transkripsiyon faktörleri, kromatin remodeler proteinler veya diğer RNA-binding proteinlerle bağlanarak onları hedef genlerden uzaklaştırır ve dolaylı yoldan transkripsiyonu baskılar. Rekabetçi endojen RNA (*Competing endogenous RNA*; ceRNA) olarak da bilinen bu LncRNA'lar

transkripsiyon molekülleri, miRNA'lar, kromatin düzenleyici proteinler gibi moleküllerle baz eşleşmesi yaparak bir "sünger" etkisi oluşturur ve hedef molekülleri ile etkileşimini engeller (Şekil 7B).

C) Kılavuz (Rehber) lncRNA'lar: Düzenleyici proteinlere (Örn. kromatin düzenlemesinde rol oynayan enzimler) bağlanır ve hedef genlere yönlendirirler. Bu lncRNA'lar, yönlendirilmiş komplekslerin transkripsiyon faktörleri olup olmadığına bağlı olarak genlerin aktivasyonuna veya susturulmasına aracılık edebilir. Bu genlerin ifadesini yakındaki genler için "Cis" düzenlemesi ve uzaktaki genler için "Trans" düzenleme ile değiştirebilmektedir (Şekil 7C).

D) Moleküler iskele lncRNA'lar: Proteinleri bir araya getirerek multi ribonükleoprotein kompleksleri oluşturmak için merkezi bir platform, başka bir deyişle "iskele" rolü oynarlar. Kendileri de bu komplekslerin fonksiyonel bileşenleri olarak bağlanan proteinlerle birlikte gen ekspresyonunu modüle ederler (Şekil 7D) (90).

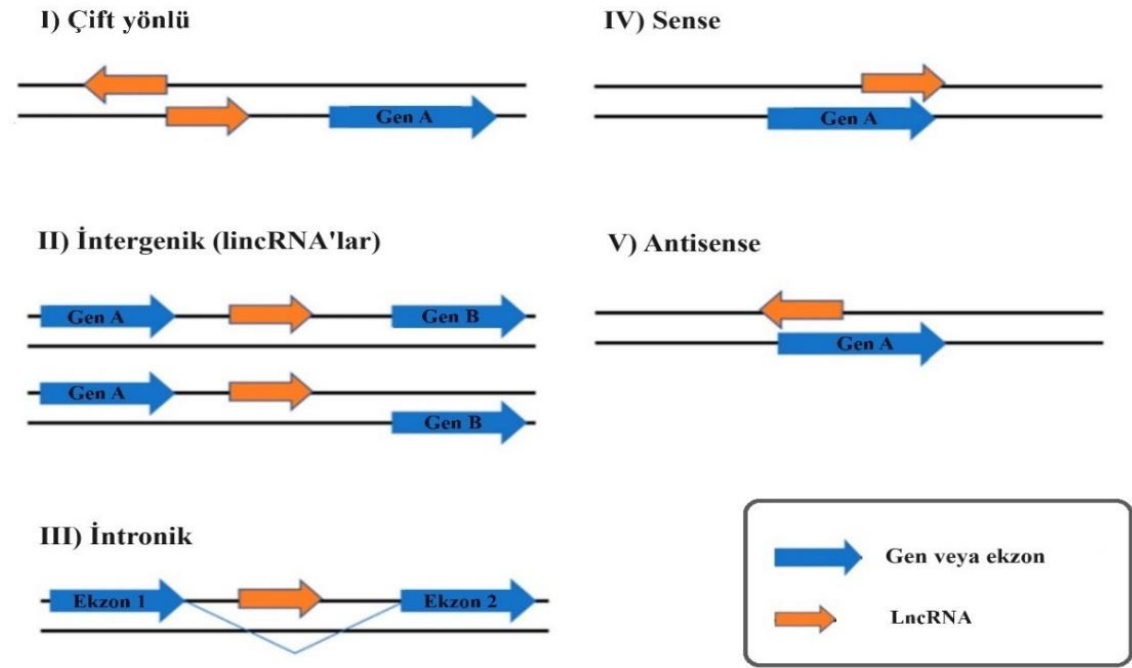


Şekil 7: LncRNA'ların fonksiyonlarını gerçekleştirirken kullandıkları mekanizmalar (90).

Genellikle lncRNA'ların belirgin dizi özelliklerinden yoksun olmaları ve temel yapı dizilerinin zayıf korunması nedeniyle, dizi bilgilerine dayalı olarak lncRNA'ların kategorik tanımlarını sağlamak zordur (88). Bu nedenle lncRNA'ların sınıflandırmaları protein kodlayan genlerle ilgili konumlarına göre yapılmış olup; çeşitli kaynaklarda

farklılık gösterebilmektedir (90). LncRNA'lar bu amaçla başlıca beş gruba ayrılabilir:

1. Çift yönlü (Bidirectional, her iki yöne gidebilen) lncRNA'lar: Bu lncRNA'lar birbirlerine zıt yönde transkribe olabilmektedirler.
2. İntergenik lncRNA (LincRNA: *Long intergenic non-coding RNA*): Protein kodlayan genlerin arasında yer alan genomik DNA segmentlerinden transkribe edilmektedir. Lokalize olduğu bölgelere yakın olan genlerin promotörlerini veya güçlendiricilerini modüle ederek gen ifadesini kontrol edebildikleri belirlenmiştir.
3. İntronik lncRNA: Protein kodlayan genlerin intronlarından kopyalanır.
4. Sense (Örtüşen, 5'→3') lncRNA: Protein kodlayan genlerin kodlayan zincirlerinden transkribe edilir. Bu genlerin ekzonik ve intronik bölgeleri ile çakışabilmektedir.
5. Antisense (Kalıp, 3'→5') lncRNA: Protein kodlayan genlerin kalıp zincirlerinden transkribe olmaktadır (Şekil 8) (91).



Şekil 8: LncRNA'ların protein kodlayan genlerle ilgili konumlarına göre sınıflandırmaları ve yönelimleri (91).

LncRNA'ların normal hücrelerdeki epigenetik düzenlemelere katılımının yanı sıra, ekspresyonlarındaki farklılıkların ve fonksiyonlarındaki anormalliklerin tümör etiyopatogenezi ile de ilişkili olabileceği ifade edilmektedir. LncRNA'ların mRNA, miRNA ve bunlara karşı gelen hedef genler ile etkileşerek tümör gelişimi, progresyonu, hücre farklılaşması ve döngüsünde ve diğer düzenleyici süreçlerde rol oynadığı

gösterilmiştir (92). Örneğin, MALAT1 (*Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1*)'in akciğer kanserinde, PCAT-1 (*Prostate cancer associated transcript 1*)'in prostat kanserinde ve GHET1 (*Gastric carcinoma high expressed transcript 1*)'in mide kanserindeki çeşitli hücresel süreçlerde önemli rol aldıkları gösterilmiştir. Linc-UBC1 (*Linc-upregulated in bladder cancer 1*), BLACAT1 (*Bladder cancer associated transcript 1*), UCA1 (*Urothelial cancer-associated 1*), AATBC (*Apoptosis associated transcript in bladder cancer*) ve PVT1 gibi bazı lncRNA'ların ise MK'daki çeşitli hücre süreçlerinde önemli oldukları gösterilmiştir (69).

2.4.3.1.1. PVT1 (*Plasmacytoma Variant Translocation 1*)

PVT1 son yıllarda oldukça dikkat çeken lncRNA'lardan biridir. PVT1 ilk kez Cory ve ark. (93) tarafından 1985 yılında farelerde keşfedilmiş, murin plazmasitomları ile ilişkili olan 6;15 kromozom translokasyonlarında bir kırılma bölgesi olarak tanımlanmıştır (94). 1986 yılında ise Graham ve ark. (95) tarafından insanda tanımlanmış olup; bu tür bir translokasyon Burkitt lenfomasının nadir varyantlarında görülmektedir (94).

PVT1, insan PVT1 geninde kodlanan uzun bir intergenik ncRNA'dır. PVT1 geni, Myc onkogenini içeren 8. kromozomun uzun kolunda (8q24.21) yer almaktadır (96). Bu bölge kromozomal translokasyonlar, amplifikasyonlar veya delesyonlar, tek nükleotid polimorfizmleri ve/veya viral entegrasyonlar nedeniyle birçok kanser türünde sıklıkla değişime uğramaktadır. PVT1 geni, alternatif kesilme yoluyla uzunluğu 2,7 ila 3,3 kb arasında değişen çoklu transkriptler üreten dokuz ekzon içerir. Bu nedenle, şimdiye kadar bu transkriptlerin hiçbirinin bir protein ürününe çevrildiği gösterilmemiştir (97). Bu alternatif kesilme varyantlarına ek olarak, PVT1, ekzon 1b'de bulunan miR-1204 hariç, PVT1'in intronik bölgelerinde kodlanan beş farklı miRNA (miR-1204, miR-1205, miR-1206, miR-1207 ve miR-1208) kümesi içerir (98). PVT1'in embriyonik gelişimin ilerleyen aşamalarında nöronal farklılaşmada da önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (94).

Kromozom mühendisliği tekniği sayesinde, hayvan modellerinde kanser oluşumu için Myc, PVT1, Ccdc26 (lncRNA) ve Gsdmc (*Gasdermin C*)'nin bir arada bulunmasının gerektiği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, PVT1 8q24-amplifiye edilmiş insan kanser hücrelerinde Myc proteini ekspresyonunun üst regülasyonunda temel bir role sahip olduğu bilinmektedir. Bu lncRNA, Akt/c-Myc sinyal yolunu kullanarak

onkogenik sürece katkı sağlar. PVT1'in susturulması kanser hücre proliferasyonunu baskımlarken, aksine aşırı ekspresyonu tam ters etki göstermektedir. PVT1'in susturulması, hücrelerin G0/G1 fazında birikmesine ve S fazındaki hücre sayısının azalmasına yol açmaktadır (15).

Çeşitli çalışmalar PVT1 ekspresyonlarının meme ve over kanseri, pediatrik malign astrositom, akut miyeloid lösemi, Hodgkin lenfoma (99), pankreatik duktal adenokarsinom, kolanjiyokarsinom , tiroid karsinomu ve malign plevral mezotelyoma, gibi çeşitli kanserlerde tümör dokusunda normal dokulara kıyasla arttığını göstermiştir (100). Bununla birlikte, daha az sayıda çalışma PVT1'in bir tümör baskılayıcı olarak potansiyel rolü olduğunu da ileri sürmektedir (101).

PVT1 tümör biyolojisi üzerinde farklı mekanizmalarla etkili olabilir: 1) miRNA kümeleri üzerindeki rolü, 2) PVT1 ile MYC'in etkileşimi, 3) PVT1'in p53'ün tümör baskılayıcı rolünün bir aracısı olarak rol oynaması ve 4) PVT1'in bir ceRNA olarak etki göstermesi (94).

1. PVT1, 5'li bir grup miRNA (miR-1204, miR-1205, miR-1206, miR-1207, miR-1208)'yı kodlamaktadır. Bu grupta olan miRNA'lardan bazıları onkogen diğerleri ise tümör baskılayıcı etki göstererek PVT1'e fonksiyon çeşitliliği kazandırıp; kanser metabolizmasında önem taşıdığını göstermektedir.

2. 8q24 bölgesinde iyi bilinen onkogen olan MYC ve PVT1 arasındaki proksimal konum, araştırmacıları bu lncRNA'nın bir şekilde kanserde yaygın olarak yer alan hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasının ana düzenleyicisi olan MYC tarafından düzenlenip düzenlenemeyeceğini analiz etmeye sevk etmiştir. Gerçekten, çeşitli çalışmalar, PVT1 ve MYC birbirlerini destekleyerek çalıştıklarını ve onkogenik aktivitelerini güçlendirerek karşılıklı etkili olduklarını göstermektedir.

3. P53, birçok kodlayan ve kodlamayan RNA ekspresyonunu modüle etmektedir. Deneysel kanıtlar PVT1'in birkaç p53-bağlayıcı element içerdiğini ve DNA'ya zarar veren ilaçlar gibi bazı stres indükleyici ajanların PVT1'in p53-bağımlı ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir. PVT1 ve p53 ilişkisi baskılayıcı etki yönünde ilerlemektedir.

4. ceRNA birçok miRNA bağlayıcı bölgeye sahip, mRNA yanıt elemanları (*Response elements*) olarak da bilinen bir RNA türüdür. Hedef mRNA'lara bağlanacak

olan miRNA'larla doğrudan etkileşime girerek (Sekestrasyon) gen ifadesini düzenler (94).

Birçok çalışma, PVT1'in potansiyel bir onkogen olarak tümör proliferasyonunu destekleyebileceğini doğrulamıştır. Tümör hücrelerinin anormal proliferasyonu, tümör dokularını normal dokulardan ayıran önemli bir özelliktir. Hücre döngüsündeki değişiklikler, apoptozun inhibisyonu ve enerji metabolizmasındaki anormallik ile karakterizedir (102). PVT1, kanser hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve uzak metastaz sırasında da aşağıdaki adımlarda rol oynadığı gösterilmiştir (103):

- I) Tümör hücreleri ile çevre dokular arasındaki bağlantının değişimi ve ana odaktan hücre kopması,
- II) Hücre dışı matriksin parçalanması,
- III) Sitoskeletonun değiştirilmesi yoluyla kanser hücrelerinin hareketliliğinin artırılması,
- IV) Tümör dokularında anjiyogenezin artışına sebep olması üzerine etki (102).

PVT1'in miR-200a, miR-200b, miR-216b, miR-195 ve miR-497 gibi birçok miRNA'nın miktarını veya işlevlerini değiştirdiği gösterilmiştir. Örneğin, PVT1'in hedef miRNA'larından biri olan miR-200 ailesi ile akciğer, böbrek, melanom, serviks kanseri ve glioma gibi birçok kanser türünün ilişkisi tanımlanmıştır (15).

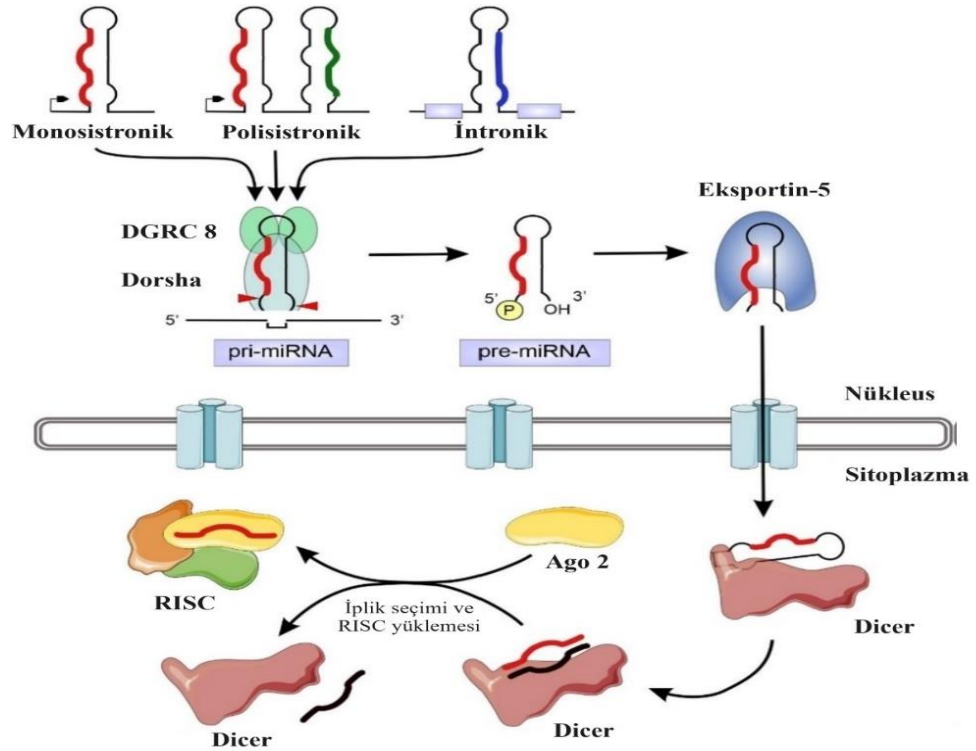
PVT1 ayrıca, serviks, over, kolorektal kanser ve hepatosellüler karsinomda transforme edici büyüme faktörü (TGF- β : *Transforming growth factor β*) sinyal yolunu da düzenlemektedir (15). TGF- β 'nın sinyal yolunun kanser hücrelerinin hareketliliğini, invazivliğini, metastazı artırarak kanser gelişimini, progresyonunu ve EMT'yi tetiklediği birçok çalışmada gösterilmiştir (104). Bir MK hücre kültürü çalışmasında, miRNA-132'nin aşağı regüle olmasıyla birlikte TGF- β ekspresyonunun arttığı ve bu durumun MK hücre metastazı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (105).

2.4.3.2. MikroRNA'lar (MiRNA)

MiRNA'lar, 20-25 nükleotid uzunluğunda, posttranskripsiyonel gen susturma ile ilişkilendirilen son derece korunmuş bir RNA sınıfıdır (106). İlk kez 1993 yılında *Caenorhabditis elegans* isimli bir tür solucanda gelişimsel zamanlamayı kontrol eden genlerin endojen düzenleyicisi olan miRNA (LIN-4) keşfedilmiştir (107). Ökaryot hücrelerinde yaygın olarak bulunan miRNA'lar en önemli gen ailelerinden biridir.

MiRBase veritabanına göre, 271 organizmadan 38,000'den fazla öncül (Olgunlaşmamış) ve yaklaşık 50,000 olgun miRNA tanımlanmıştır. MiRNA'lar, kanserle birlikte çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunan transkripsiyon sonrası gen ifadesini kontrol edip ve düzenlemesinde rol alan kısa ve kodlanmayan RNA'lardır (106).

MiRNA biyogenezi, sıkı bir şekilde düzenlenen olgun tek sarmalı miRNA'nın oluşumuyla sonuçlanan çok adımlı bir süreçtir. Nükleusta pri-miRNA'nın RNA polimeraz II ile kopyalandığıyla başlar. MiRNA'lar monosistronik (Tek tek kodlanmış) veya polisistronik (kümeler halinde kodlanmış) olabilir. Bir sonraki adımda, Drosha kompleksinin (Mikroişlemci) katılımıyla pre-miRNA üretilir ve eksportin-5 vasıtasıyla sitoplazmaya taşınır ve burada Dicer kompleksi tarafından miRNA dupleksine işlenir. MiRNA dupleksinin (Olgun miRNA) yalnızca bir ipliği, miRNA kaynaklı susturma kompleksini (*RISC*) oluşturur (108). MiRNA'lar, seed bölgeleri ile mRNA'ların 3'-UTR'sindeki tamamlayıcı dizilere bağlanır. Seed bölgesi, mRNA bağlanmasından sorumlu olan miRNA'nın 5' ucundaki 2-7 nükleotidlik bir dizidir. Bu, mRNA'nın bozulmasına veya protein translasyonunun inhibisyonuna yol açmasıyla sonuçlanmaktadır (Şekil 9) (109).



Şekil 9: MiRNA biyogenezi (DGRC8: DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8, RISC: RNA

indüklenmiş susturma kompleksi, Dorsha: RNAaz III enzimi, Ago: Argonaute protein, Dicer: Endoribonükleaz enzim) (109).

MiRNA'lar, hedef genlere ve anahtar onkogenik sinyal yollarının düzenlenmesindeki rollerine bağlı olarak oncomiR'ler veya tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak işlev görebilir. MiRNA'lar insan genlerinin yaklaşık %3'ü tarafından kodlanmasına rağmen, insan protein kodlayan genlerinin yaklaşık %30'unu düzenleyebilmektedir (110). Bir miRNA'nın sahip olabileceği çoklu hedefler, insanlarda pek çok önemli metabolik yolun düzenleyebilmesini açıklamaktadır. Bu da metabolizma, büyüme, gelişme, bağışıklık ve diğer hücre mekanizmaları dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlevleri düzenlediğini ifade etmektedir. Geniş hedef yelpazeleriyle, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogenezi düzenleyebilmeleri bir gerçek olarak kabul edilmektedir (111). MiRNA'lar hücreye özgü moleküller olarak bir hücrede onkogen aktivite gösterirken, başka bir hücrede baskılayıcı etki gösterebilmektedir. Bazı miRNA'lar, mRNA'nın 5'-UTR'sine veya açık okuma çerçevesine bağlanarak hedef genlerin baskılanmasından ziyade aktivasyonuna neden olur. Birkaç miRNA, RNA bağlayıcı proteinler gibi proteinlere doğrudan bağlanarak hedef RNA'ları ile etkileşimlerini engelleyerek tuzak rolü oynar (112). Ayrıca, bazı durumlarda miRNA'lar transkripsiyonel düzeyde doğrudan DNA düzenleyici elemanlarına bağlanarak gen ifadesini düzenleyebilmektedir. Bütün bu bilimsel gelişmelere rağmen, miRNA aracılıklı gen ifadesi düzenlenmesi halen karmaşık ve gelişmekte olan bir süreçtir (113). MiRNA'lar, özgül düzenleyici rollerine dayanarak prognostik, tanısal ve hedeflenen immünoterapötikler olarak kullanılabilirler. Sonuç olarak, başarılı ve güvenli miRNA tabanlı kanser karşıtı terapötik seçenekler geliştirmek için tümör mikroçevresinde, miRNA'ların kesin işlevlerinin detaylı bir analizi gerekmektedir (114).

Çeşitli çalışmalarda miRNA'ların farklı kanserlerin hem oluşumunda hem de değişim süreçlerinde önemle ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Örneğin, miRNA-128-3p pankreas kanserinde (115), miRNA-126 tiroid kanserinde, miRNA-140 hepatosellüler karsinomada, miRNA-877-3p akciğer kanserinde, miRNA-382-5p servikal kanserinde ve miRNA-3064-5p meme kanserinde lncRNA'lar ve sinyal yolları ile entegre olarak rol oynadıkları gösterilmiştir (116). MK'da da benzer çalışmalar bulunmaktadır. MiRNA-125b ve miRNA-490-3p'nin MK gelişiminde baskılayıcı rol oynadığı (117,

118), miRNA-516a'nın metastaz süreci (119) ve miR-195-5p'nin progresyonla (120) ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızdaki ana parametrelerden biri olan miR-128'in ise MK hücre kültüründe yapılan in vitro bir çalışmada tümör oluşum sürecinde rol aldığı ifade edilmiştir (20).

2.4.3.2.1. MiR-128

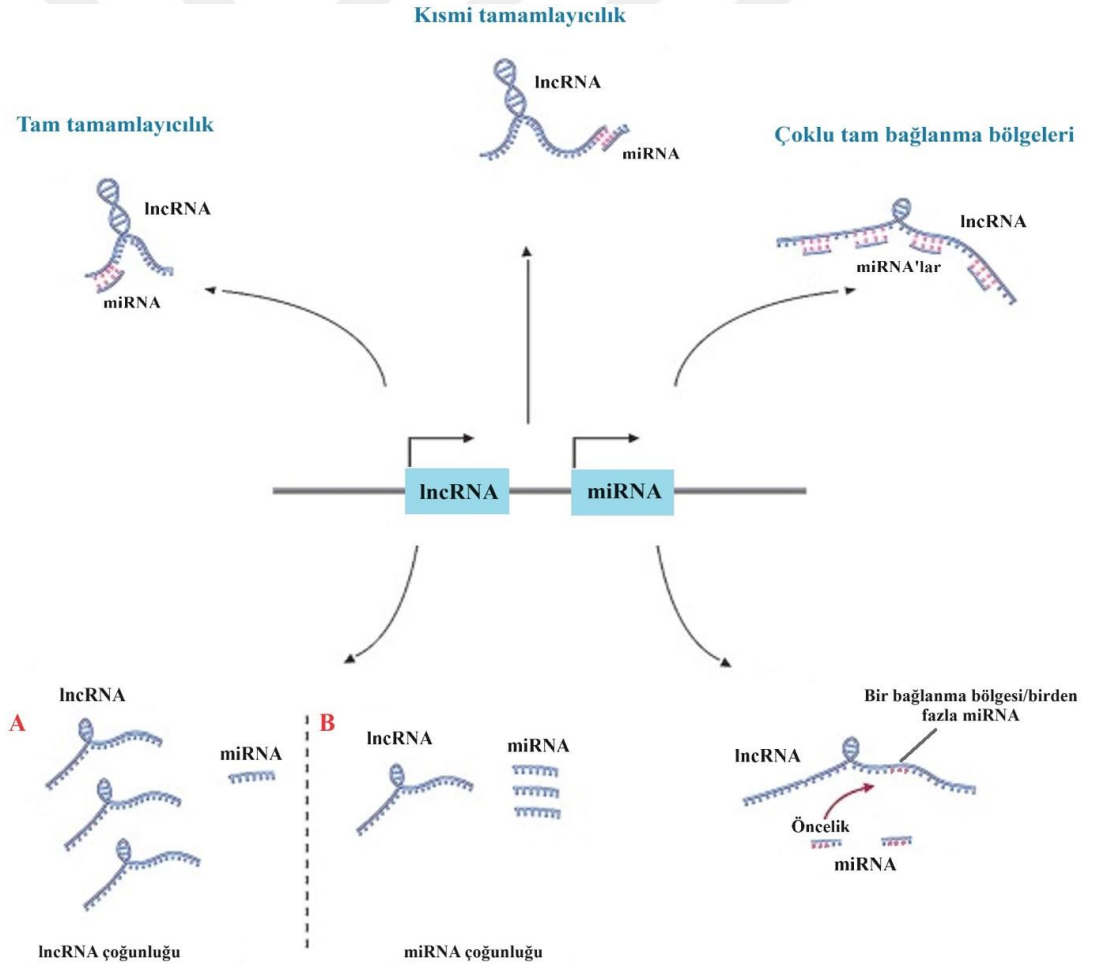
MiR-128, intronik bir miRNA sınıfına ait olup; olgun miR-128, iki izoform şeklinde miR-128-1 ve miR-128-2 kodlanmaktadır. PrimiR-128-1 geninin konumu, 2. kromozomun uzun kolu (2q21.3) üzerinde, R3H alanı içeren protein 1 geninin (R3HDM1) içindedir. PrimiR-128-2'nin ise 3. kromozomun kısa kolu (3p22.3) üzerindeki cAMP-regüle fosfoprotein, 21 kDa'luk geninin (ARPP21) içinde yer aldığı gösterilmiştir (121). MiR-128, yetişkin fare ve insan beyinde ifade edilen en yaygın miRNA'lardan biridir ve doku bağımlıdır. Farelerde, miR-128 ekspresyonu, gelişme süreci boyunca kademeli olarak artar ve yetişkinlik döneminde maksimuma ulaşır (122). MiR-128 beyin farklı bölgelerinde ifade edilmekte olup; bu durum farklı sinir hücrelerinin işleyişinde, sinir sistemi gelişimi ve onarımı açısından önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (123). MiR-128'in etkisini farklı iyon kanallarının ve ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 2 (ERK2) sinyal yolu bileşenlerinin ifadesini azaltarak, böylece sinir hücrelerinin uyarılabilirliğini ve motor aktivitesini düzenleyerek gösterdiği ifade edilmiştir (114).

MiR-128 normal dokulardaki fizyolojik rollerinin yanı sıra, tümör hücrelerinde önemli bir düzenleyici olarak da rol oynar. MiR-128 ile yapılan çalışmalar, tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduğunu kanıtlanmıştır. MiR-128'in yokluğu, insan akciğer ve meme kanserinde miR-128-2 ve ARPP21 lokusunu içeren kromozom 3p'deki bir silinme nedeniyle rapor edilmiştir. MiR-128'in tümör hücrelerinde hücre bölünmesi, EMT, tümör büyümesi, anjiyogenez ve invazyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (124). Son zamanlarda ise miR-128'in çeşitli kanser türlerinde; göğüs, kolon, over ve pankreas kanseri ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bugüne kadar toplanan veriler sonucu miR-128'in çeşitli bozukluklarda bir prognostik gösterge olarak kullanılabileceğini göstermektedir (125).

2.4.4. LncRNA ve miRNA ilişkisi

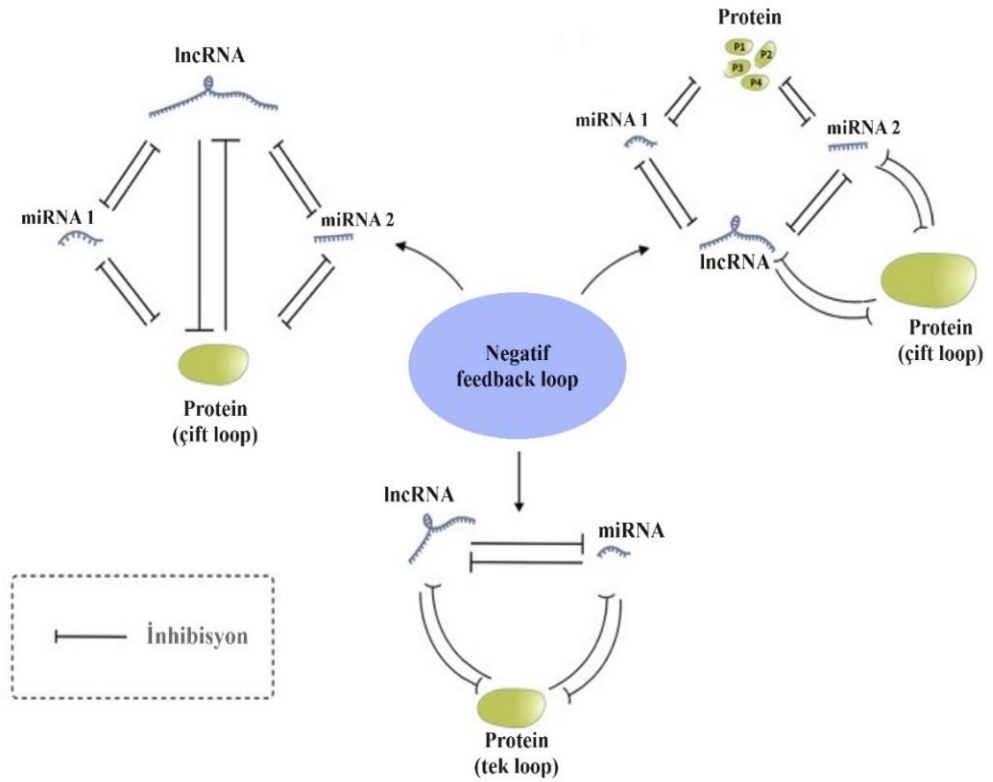
İki ncRNA grubu (LncRNA ve miRNA) gen düzenlemelerinde merkezi bir rol oynayarak organizmadaki çeşitli biyolojik aktiviteleri birlikte kontrol etmektedirler. LncRNA'lar, miRNA'ları yakalayıp ilgili mRNA'larla etkileşime girmelerini önleyen “moleküler tuzaklar” gibi davranırlar (126). LncRNA'lar miRNA'ların fonksiyonlarını iki şekilde etkiler:

1. MiRNA aracılı sünger etkileşim (MMI: *miRNA mediated sponge interactions*): LncRNA'lar dizilerinde barındırdıkları bağlanma bölgeleri sayesinde miRNA'lar ile bağlanırlar. Araştırmalar, PVT1'in 20'den fazla miRNA (miR-128, miR-30a, miR-186 vs.) ile sünger etkileşimde olduğunu göstermektedir (Şekil 10) (127).



Şekil 10: LncRNA ve miRNA ilişkilerinin şematik göstergesi (127).

2. Negatif *feed back loop* etkileşimi (miRNA ve lncRNA ilişkisi): Üç yaygın negatif *feed back loop* örneği tanımlanmıştır (Şekil 11). “LncRNA, miRNA ve bir protein”, “LncRNA, iki miRNA ve bir protein”, “LncRNA, iki miRNA ve birden fazla protein”den oluşan loop’lar birbirini inhibe ederek negatif bir döngü oluşturmaktadır (127). MiRNA’ların hedef genlere bağlanma bölgeleri maskelenir ve miRNA’ların hedef gene bağlanması engellenir. MiRNA ve lncRNA etkileşimleri, böylece, güçlendirici fonksiyona sahip bir kompleks gibi yakındaki genlerin ifadesini etkileyen düzenleyici ağ transkriptomları oluşturmaktadır. Bu şekilde çalışan lncRNA’lar ceRNA olarak adlandırılmaktadırlar (128).



Şekil 11: LncRNA, miRNA ve protein ilişkisi (127).

LncRNA’lar ile miRNA’lar arasında dizi farklılıkları olsa da, lncRNA’lar miRNA düzenlemesini değiştirmek için miRNA öncüleri olarak kullanılabilir (128).

Kemik morfogenetik protein (BMP: *Bone morphogenetic protein*), TGF- β süper ailesinin önemli bir üyesidir ve bir dizi geni düzenleyerek tümör proliferasyonu gibi birçok önemli biyolojik süreci etkilemektedir. PVT1 ile miR-128’in sünger mekanizmasıyla etkileşimi BMP2 ve BMP4-aracılıklı sinyal yolunu etkileyerek, tümör

hücrelerinde proliferasyona yol açtığı ileri sürülmüştür (129). PVT1'in ekspresyonundaki artışın miR-497'yi inhibe ederek hekzokinaz 2 (HK2) aktivitesini restore ettiği ve bunun da aerobik glikoz metabolizmasını düzenleyerek proliferasyonu ve metastazı pozitif yönde etkilediği bildirilmiştir (130). PVT1 ayrıca, tümör hücrelerinde endojen miR-143'e rekabetçi olarak bağlanır ve HK2 ekspresyonunu düzenler (131).

VEGFC bir lenfatik vasküler sistemi büyüme faktörü olarak çeşitli kanserlerde üst regüle olduğu bilinmektedir. VEGFC anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve bölgesel lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilmiş ve anti-apoptotik ve proliferatif rollere sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmalarda, miR-128 ve VEGFC arasındaki doğrudan hedef ilişkisi, ikili lusiferaz raportör deneyleri kullanılarak ortaya konmuştur. Biyoinformatik analiz PVT1'in miR-128'in korunmuş bir hedef bölgesini içerdiğini göstermiştir. Bu nedenle, PVT1 ceRNA olarak miR-128 aracılığıyla VEGFC ekspresyonunu düzenlediği varsayılmıştır (20).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grupları

Bu çalışmada, kasa invaziv olmayan MK tanısı alan hastaların demografik ve histopatolojik parametreleri ile doku düzeyinde miR-128 ve PVT1 gen ekspresyonları incelendi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Ürolojik Onkoloji Bilim Dalı' na başvurarak TUR-BT (Transurethral resection bladder tumor) ameliyatı olan ve patoloji sonuçlarına göre kasa invaziv olmayan MK tanısı konulan 50 kişi çalışma grubuna dahil edildi. Hastalara çalışmayla ilgili yazılı ve sözlü olarak bilgilendirilme yapıldıktan sonra, yazılı onamları alındı. İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi'ne başvuru yapıldı ve proje onayı alındıktan sonra birim tarafından mali destek sağlandı.

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 14/03/2022 tarih ve 800765 sayılı raporu ile çalışma için onay alınmıştır.

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TDK-2022-38685).

3.2. Çalışma Materyali

Üroloji Anabilim Dalından gelen 50 adet tümörlü doku ve tümöre bitişik normal doku örnekleri ile çalışma grupları oluşturuldu. RNA yıkımını önlemek için RNA-Later solüsyonu içine alınan dokular RNA izolasyon işlemi başlayıncaya kadar -80 °C'de saklandı. Doku örneklerinden *miRNeasy Tissue/Cells Advanced* kit (Qiagen, katalog no: 217604) ile RNA'lar elde edildi ve RNA örnekleri -80 °C'de saklandı. Hastaların patoloji sonuçlarına göre örnekler düşük ve yüksek derece, Ta ve T1 evresi, CIS (*Carcinoma in situ*) varlığı ve varyant patoloji içerip içermediğine göre ayrıldı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyet, yaş, VKİ, aile öyküsünde kanser varlığı, sigara kullanımı, TNM bilgileri kaydedildi. Hiç sigara içmemiş veya kliniğe müracaat etmesinden 1 yıl veya daha fazla zaman önce sigara içmeyi bırakmış olan kişiler sigara içmeyenler grubuna dahil edildi. Yılda 10 paket ve daha fazla sigara içen kişiler (10 paket $\geq$ yıl) ise sigara içenler grubu olarak kabul edildi.

3.2.1. Kullanılan cihazlar

1. Vorteks (MS 2 Minishaker, İKA)
2. Santrifüj cihazı (Heraeus, Germany)
3. PCR cihazı (Techne TC412 Termal Cyclers, Barloworld Scientific, UK)
4. Pipet takımı (Biohit, Proline)
5. Otoklav (Hirayama, HV – 50L)
6. RT-PCR cihazı (Gene Rotor Qiagene)
7. ELISA plak okuyucu (Biotech, UK)

3.2.2. Kullanılan Malzemeler

1. MiRNeasy Tissue/Cells Advanced kit (Qiagen, Katalog no:217684)
2. MiRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Katalog no:339340)
3. MiRCURY LNA miRNA PCR Assay U6 snRNA (Qiagen, Katalog no:YP02119464)
4. MiRCURY LNA miRNA PCR Assay miR-128 (Qiagen, Katalog no:YP00205995)
5. MiRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Katalog no:339346)
6. RT² First Strand Kit (Qiagen, Katalog no:330404)
7. RT² lncRNA qPCR Assay PVT1 (Qiagen, Katalog no:330701)
8. RT² qPCR Assay GAPDH (Qiagen, Katalog no:330001)
9. RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix (Qiagen, Katalog no:330521)
10. Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (Qiagen, Katalog no 981103)

3.3. Kullanılan Yöntemler

3.3.1. PVT1 ve miR-128 gen ekspresyonlarının tayini

PVT1 ve miR-128 ekspresyonlarının ölçümü için sırasıyla:

1. Dokulardan RNA izole edildi.
2. İzole edilen RNA'lar kit protokolüne uygun olarak PCR cihazı ile cDNA'ya dönüştürüldü.
3. Elde edilen cDNA örneklerinde Gene Rotor cihazı ile ekspresyonlar saptandı.

3.3.1.1. Doku RNA izolasyonu

RNA izolasyonu *miRNeasy Tissue/Cells Advanced* kiti (Qiagen, katalog no: 217604) kullanılarak kit protokolüne göre gerçekleştirildi.

Başlamadan önce, RNA izolasyon kiti içerisindeki RWT ve RPE tamponları yönergelere uygun olarak %96-100 etanol (Absolut etil alkol) eklenip diğer kimyasallar kullanıma hazır şekilde getirildi.

Hasta örneklerinden 20 µg doku örneği tartılıp, steril eppendorflara alındı. 260 µL *Buffer RLT* eklendikten sonra, *TissueRuptor* cihazıyla homojenize edildi. Homojenata 80 µL *Buffer AL* eklendi ve vortekslendi. 3 dk oda ısısında inkübe edildikten sonra, homojenize örnekler gDNA Eliminator kolonu bulunan eppendorflara alınarak 10,000 xg'de 1 dk santrifüjlenerek genomik DNA filtre edildi. Elde edilen ekstrakt steril yeni eppendorfa aktarıldı. 20 µL *Buffer RPP* eklendi. 20 sn boyunca vortekslendikten sonra, 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

Ardından 12,000 xg ile 3 dk santrifüjlenerek elde edilen supernatant (~300 µL) 2 mL' lik steril eppendorfa aktarıldı. Süpernatantın hacmine eşit miktarda isopropanol eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı. Elde edilen numune *RNeasy Mini Column*'a aktarıldı ve 30 sn 10,000 xg' de santrifüj edildi. Ardından sıvı uzaklaştırıldı. *RNeasy Mini Column* üzerine 700 µL *Buffer RWT* eklendi. 30 sn 10,000 xg' de santrifüj edilip sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolona 500 µL *Buffer RPE* eklendi. 30 sn 10,000 xg'de santrifüjlendi ve sıvı uzaklaştırıldı. Bir sonraki adımda 500 µL %80 etanol *RNeasy Mini Spin Column* üzerine eklendi. 2 dk 10,000 xg' de santrifüj sonrası *RNeasy Mini Column* 2 mL eppendorfa yerleştirildi. Membranı kurutmak için 17,000 xg 'de 60 sn santrifüj edildi. *RNeasy Mini Spin Column*' u yeni 1.5 mL eppendorfa yerleştirildi. 30 µL *RNase-free* su kolonun merkezine eklendi ve 60 sn oda sıcaklığında inkübe edildi.

İşlem sonunda RNA'yı ayırtırmak için 1 dakika 17,000 xg'de santrifüj ederek total RNA ekstrakte edildi. RNA elde edildikten sonra tüm numunelerin RNA konsantrasyonları ve saflıkları Eon Biotek cihazı ile ölçüldü. 1 µL RNA örneği alınıp cihaza konularak konsantrasyon miktarı 260/280 ve 260/230 nm.'de değerlendirilerek saflık oranları belirlendi. Ölçüm yapıldıktan sonra RNA'lar -80 °C'de saklandı.

3.3.1.2. cDNA (*Complementary DNA*) Sentezi

3.3.1.2.1. PVT1 cDNA sentez reaksiyonu

RNA eldesinden sonra bir sonraki aşama olan LncPVT1 cDNA sentezi işlemi için *RT² First Strand Kit* (Qiagen, katalog No: 330451) kullanıldı. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

Revers Transkripsiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı:

1. 5x Buffer BC3: 2 µL
2. Kontrol P2: 0,5 µL
3. RE3: 1 µL
4. RNase free water: 3 µL.

Hazırlanan 5 µL Revers Transkripsiyon karışımı üzerine 5 µL elde edilen RNA örneklerinden eklendi. 37 °C’de 60 dk, 95 °C’de 5 dk olacak şekilde PCR cihazında reaksiyon işlemi gerçekleştirildi. PCR cihazından çıkarıldıktan sonra buz üzerine konuldu ve cDNA elde edildi. Elde edilen örnekler -20 °C’de saklandı.

3.3.1.2.2. MiR-128 cDNA sentez reaksiyonu

cDNA sentezi için *miRCURY LNA miRNA SYBR Green PCR* (Qiagen, katalog No: 339340) kiti kullanıldı. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

Toplam hacim 10 µL olacak şekilde aşağıdaki karışım hazırlandı:

1. RNase free su 5 µL
2. 5x miRCURY SYBR Green RT buffer 2 µL
3. 10x miRCURY RT enzim miks 1 µL
4. RNA örneği 2 µL

Karışım Bio-Rad termal cycler cihazında 37 °C’de 60 dk, 95 °C’de 5 dk olacak şekilde tutularak cDNA sentez reaksiyonu tamamlandı ve örnekler -20 °C’de saklandı.

3.3.1.3. Real Time PCR Reaksiyonu

3.3.1.3.1. PVT1 Real time PCR reaksiyonu PVT1

cDNA elde edildikten sonra *RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix* (Qiagen, Katalog no: 330620) kiti kullanılarak Real- time PCR gerçekleştirildi. Bütün işlemler soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi. Toplam hacim 25 µL olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı:

1. Nükleaz free su: 10.5 μ L
2. *RT² SYBR Green Master mix*: 12.5 μ L
3. cDNA: 1 μ L
4. *RT² lncRNA qPCR Assay*: 1 μ L

Strip tüpleri *Qiagen Rotor Gene* cihazına konulduktan sonra sırasıyla, 95 °C’de 10 dk, 95 °C’ de 15 sn (40 siklus) ve 60 °C’de 60 sn şeklinde 40 siklus gerçekleştirildi. *Real Time PCR* işleminden sonra elde edilen Ct değerleri 2-ddCt metodu kullanılarak değerlendirildi.

3.3.1.3.2. MiR-128 Real time PCR Reaksiyonu

cDNA elde edildikten sonra *Real Time PCR* işlemi için hazır olan ticari kit kullanıldı (Qiagen, Katalog no: 339345). Tüm işlemler soğuk blok üzerinde toplam hacim 10 μ L olacak şekilde reaksiyon örnek başına aşağıdaki şekilde hazırlandı.

1. *Nuclease free* su 1 μ L
2. 2x *miRCURY SYBR Green Master mix* 5 μ l
3. PCR primer mix 1 μ l
4. cDNA ürünü (x30 sulu) 3 μ l

Strip tüpleri *Qiagen Rotor Gene* cihazına konulduktan sonra sırasıyla, 95 °C’de 2 dk ardından 95 °C’de 10 sn (40 siklus) ve 56 °C’de 60 sn (40 siklus) ayarlanarak reaksiyon gerçekleştirildi.

RT-PCR cihazında floresan sinyal miktarının belirlenmesi için gereken minimum değeri geçtiği döngü olan CT (*Cycle threshold*) değeri tespit edildi. Çalışmada qRT-PCR normalizasyonu için $\Delta\Delta$ CT yöntemi kullanıldı Endojen kontrol için tüm hücrelerde eşit miktarda ekspresyonu olduğu düşünülen referans lncRNA olarak GAPDH, referans miRNA için U6 snRNA kullanıldı.

3.4. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızda verilerin istatistiksel analizleri SPSS 26.0 Versiyon (SPSS, Chicago, IL) programı ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Tümörlü doku ve bitişik normal dokudaki ncRNA ekspresyonları *Wilcoxon* testi ile incelendi. Normal dağılım göstermeyen histopatolojik ve klinik

özelliklere göre PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeyindeki farklılık analizi *Mann-Whitney U* test ile yapıldı. Değişkenlerin birbiriyle aralarındaki korelasyon değerlendirmesi *Spearman* testi ile analiz edildi. Tümörlü dokunun ve yüksek dereceli tümörün belirlenmesinde ncRNA ekspresyon düzeylerinin kesme değeri (*Cut-off*) ile duyarlılık ve özgüllükleri ROC (*Receiver Operating Charecteristic*) eğrisi analizi ile incelendi.



4. BULGULAR

4.1. Hasta grubunun demografik ve klinik özellikleri

Çalışmamızdaki hasta grubumuz MK tanısı alan 48'i erkek (%96) ve 2'si kadın (%4) olmak üzere toplam 50 kişi oluşmaktadır. Çalışmamıza dahil edilen MK'lı hastaların demografik ve klinik özellikleri ile tümörlü dokuların histopatolojik değerlendirmeleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Hasta grubunun tanı anındaki medyan yaşı 69, yaş aralığı ise 33-91 yaştır. Hastaların 36'sı (%72) fazla kilolu veya obez sınıfındayken, 14 hasta normal kilolu veya zayıftı. Vücut kitle indeksi 18,38-39,95 olarak saptandı ve medyan değeri 27,18 kg/m² idi. Hasta grubunun %88'i aktif sigara içenlerden oluşurken ortanca değeri 40 paket/yıl olarak bulundu. Başvuru şikayetlerinden en sık gözlenen makrohematüri (n=33, %66) iken diğer başvuru semptomları mikrohematüri (n=3, %6) ve alt üriner sistem semptomları (AÜSS) (n=7, %14) idi. Hastaneye başvuran hastaların 7'si (%14) şikayeti olmayanlar idi (Tablo 1).

MK tanısı alan hastaların histopatolojik özelliklerine bakıldığında; tümör evresi Ta olanlar (n=30, %60), T1 olanlar (n=20, %40) idi. Hastalardan 21'i (%42) düşük dereceli iken 29'u (%58) yüksek dereceliydi. Tümöre eşlik eden CIS varlığı hastaların 13'ünde (%26), eşlik eden varyant patoloji ise 3 (%6) hastada saptandı (Tablo 1).

Tablo 1: Mesane kanserli hastaların demografik bilgileri ve tümör dokularının histopatolojik özellikleri (VKİ: Vücut kitle indeksi, CIS: Carcinoma in situ, AÜSS: Alt üriner sistem semptomu).

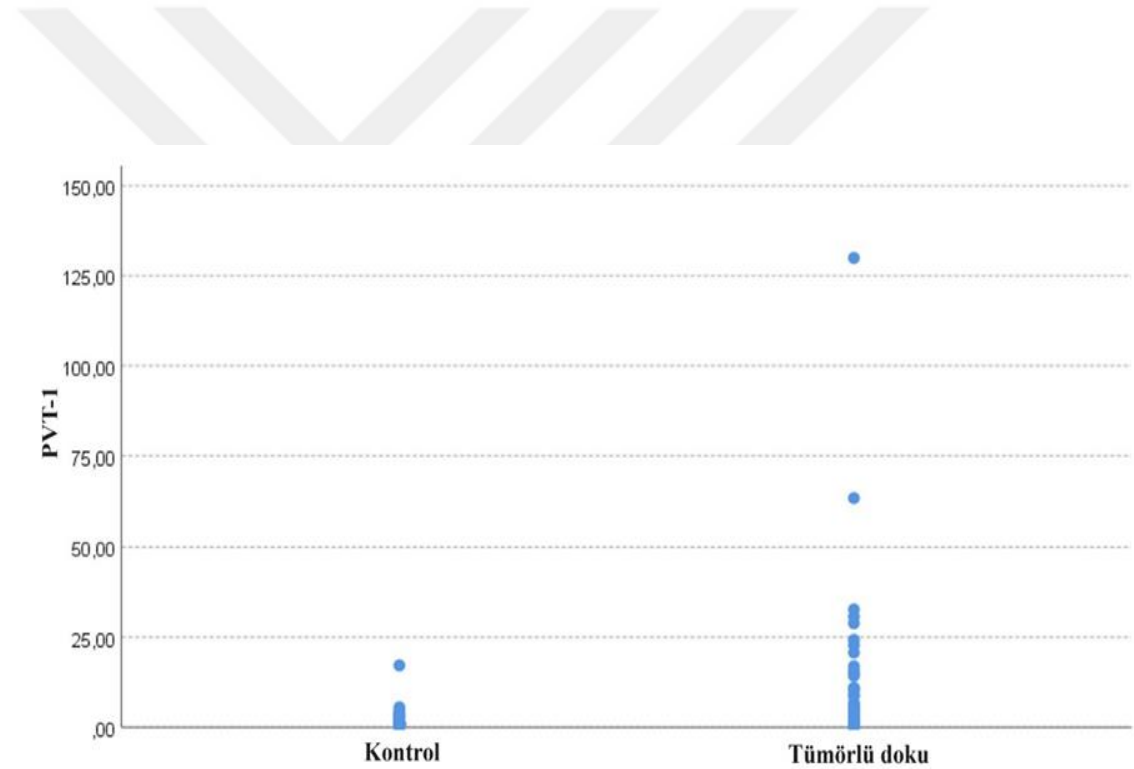
Hasta bilgileri (n=50)		Medyan (Minimum-Maksimum)
Yaş (yıl)		69 (33-91)
VKİ (kg/m ²)		27,18 (18,38-39,95)
Sigara (paket/yıl)		40 (0-120)
		N (%)
Cinsiyet	Erkek	48 (96)
	Kadın	2 (4)
Sigara öyküsü	İçmiyor	6 (12)
	Aktif içici	44 (88)
Başvuru şikayeti	Mikrohematüri	3 (6)
	Makrohematüri	33 (66)
	AÜSS	7 (14)
	Şikayet yok	7 (14)
Tümör evresi	Ta	30 (60)
	T1	20 (40)
Tümör derece	Düşük derece	21 (42)
	Yüksek derece	29 (58)
CIS	Yok	37 (74)
	Var	13 (26)
Varyant patoloji	Yok	47 (94)
	Var	3 (6)

4.2. Dokularda PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeyleri

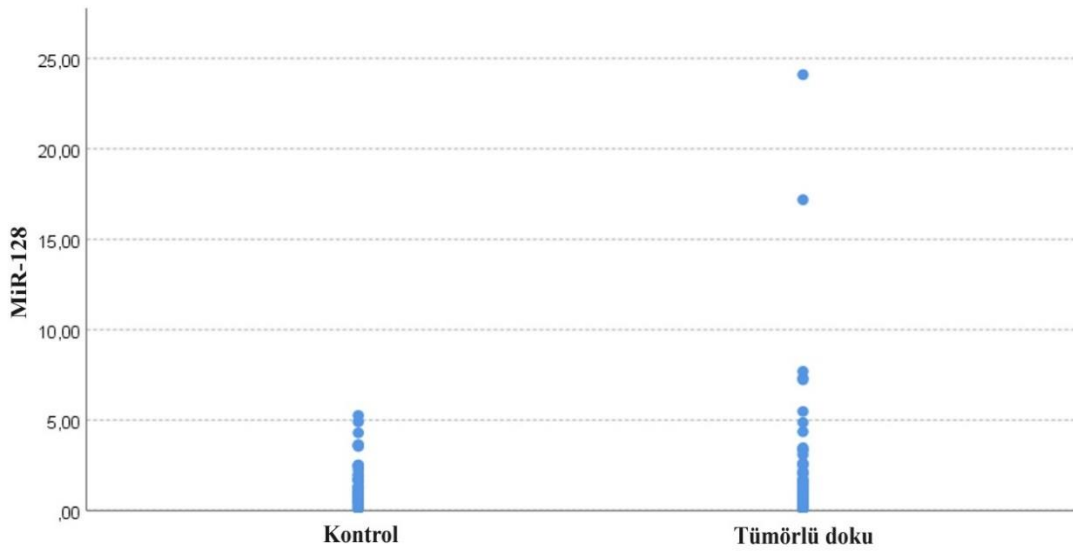
MK'lı hastaların tümör dokularındaki PVT1 ekspresyonu, tümöre bitişik kontrol dokularına göre istatistik olarak anlamlı derecede artmış olarak bulundu ($p<0,001$). Tümör dokusundaki miR-128 ekspresyonu ise bir artış eğilimi göstermekle birlikte, istatistiksel olarak bir fark saptanmadı ($p= 0,181$) (Tablo 2, Şekil 12,13).

Tablo 2: Mesane kanserli hastaların tümör ve tümöre bitişik normal (Kontrol) dokularındaki PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeyleri.

Parametre		Kontrol (n=50)	Tümörlü doku (n=50)	p değeri
PVT1	Medyan	0,99	3,41	<0,001
	Minimum	0,06	0,11	
	Maksimum	17,17	129,9	
MiR-128	Medyan	1,00	1,47	0,181
	Minimum	0,08	0,03	
	Maksimum	5,25	24,10	



Şekil 12: Mesane kanserli hastaların tümör ve tümöre bitişik normal (Kontrol) dokularındaki PVT1 ekspresyonlarının dağılımı.



Şekil 13: Mesane kanserli hastaların tümör ve tümöre bitişik normal (Kontrol) dokularındaki miR-128 ekspresyonlarının dağılımı.

4.3. MK'lı hastaların tümör dokularının histopatolojik evresi ile PVT1 ve miR-128 ekspresyonlarının ilişkisi

T1 evresindeki hastaların PVT1 ekspresyon düzeyi medyan olarak 4,26 iken, Ta evresinde 2,93 olarak bulundu. Evre ilerlediğinde düzeylerde artış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,951$). T1 evresindeki tümör dokularında miR-128 ekspresyonları 0,90 ve Ta evresinde 1,70 olarak bulundu. Evre ilerledikçe istatistiksel olarak anlamlı olmayan fakat dikkat çekici bir azalma gözlemlendi ($p=0,140$) (Tablo 3).

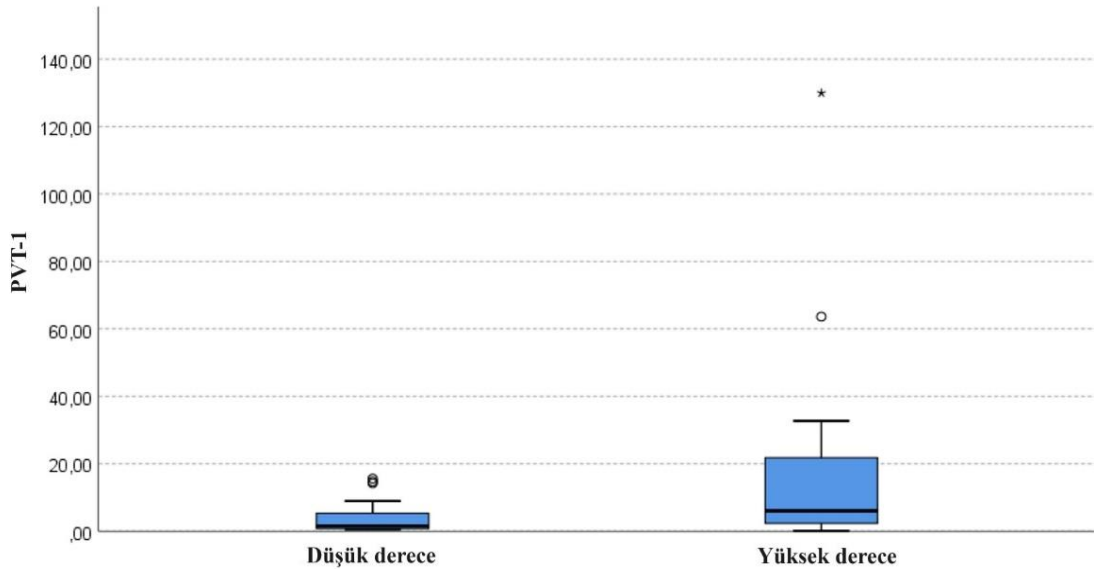
Tablo 3: Tümörün histopatolojik evresine (Ta veya T1) göre, PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeyleri.

Parametre		Tümör Evresi		p değeri
		Ta (n=30)	T1 (n=20)	
PVT1	Medyan	2,93	4,26	0,951
	Minimum	0,49	0,11	
	Maksimum	129,96	32,71	
MiR-128	Medyan	1,70	0,90	0,140
	Minimum	0,03	0,13	
	Maksimum	17,18	24,10	

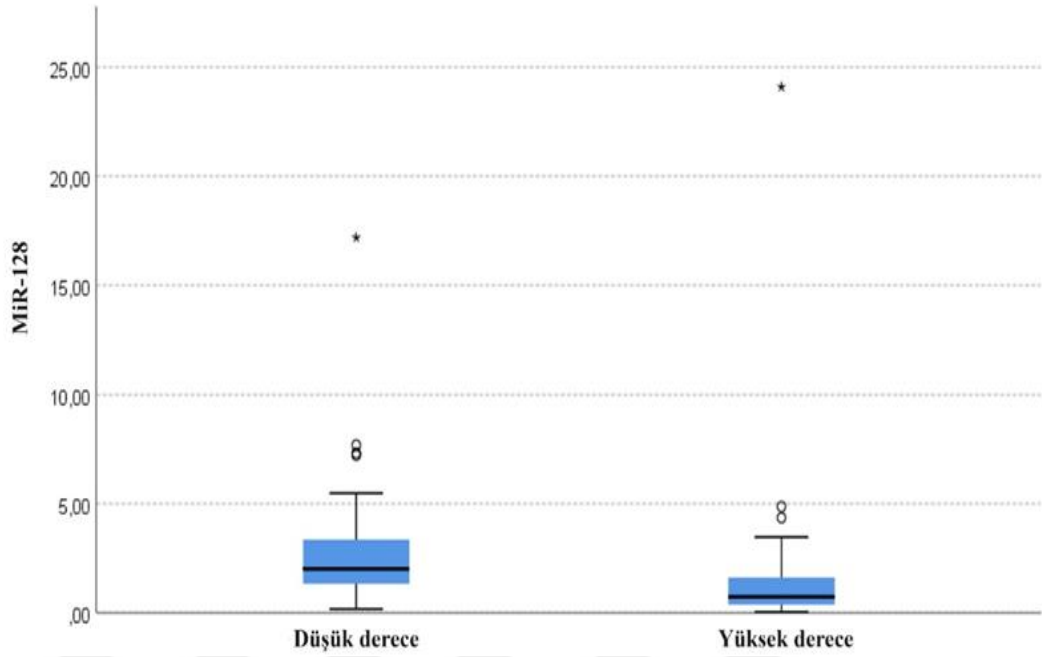
Tümörün histopatolojik derecesine göre kıyaslandığında ise (Tablo 4, Şekil 14), PVT1 düzeyleri yüksek dereceli tümör dokularında anlamlı bir artış gösterdi ($p= 0,027$). PVT1'in aksine, miR-128 ekspresyonundaki değişiklik tümör derecesi ile ters orantılıydı. Yüksek dereceli tümörlerde miR-128 azalmış iken, düşük dereceli tümörlerde daha yüksek düzeyleri gözlemlendi ($p=0,005$, Tablo 4, Şekil 15).

Tablo 4: Tümörün histopatolojik derecesine (Düşük veya yüksek) göre PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeyleri.

Parametre		Tümör Derecesi		p değeri
		Düşük derece (n=21)	Yüksek derece (n=29)	
PVT1	Medyan	1,52	6,03	0,027
	Minimum	0,49	0,11	
	Maksimum	15,58	129,96	
MiR-128	Medyan	2,00	0,72	0,005
	Minimum	0,16	0,03	
	Maksimum	17,18	24,10	



Şekil 14: Mesane kanserli hastaların histopatolojik derecelerine (Düşük, yüksek) göre tümörlü dokularındaki PVT1 ekspresyonlarının dağılımı.

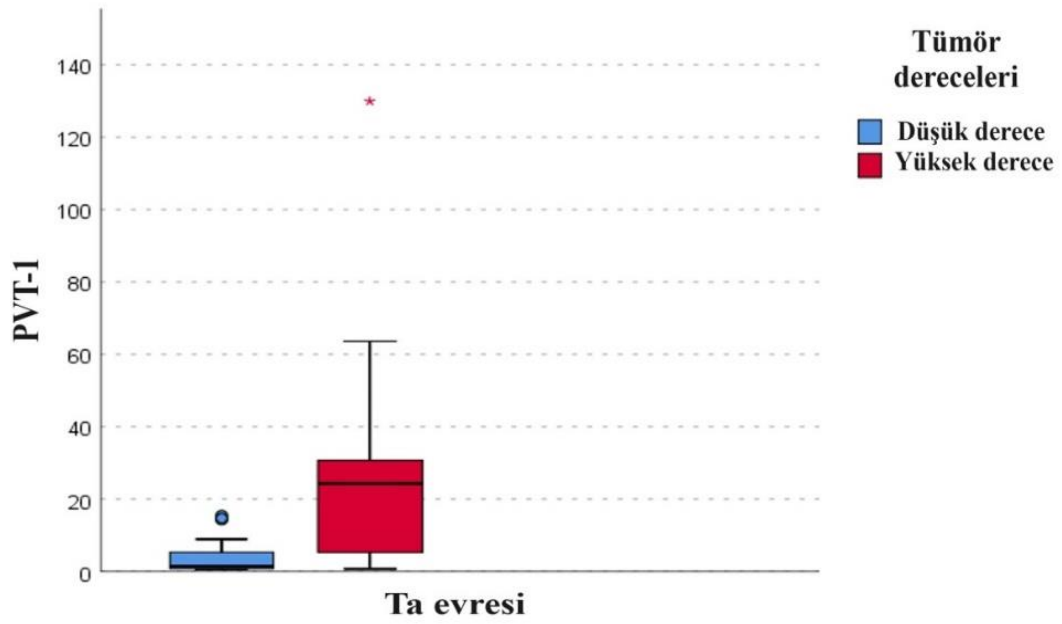


Şekil 15: Mesane kanserli hastaların histopatolojik derecelerine (Düşük, yüksek) göre tümörlü dokularındaki miR-128 ekspresyonlarının dağılımları.

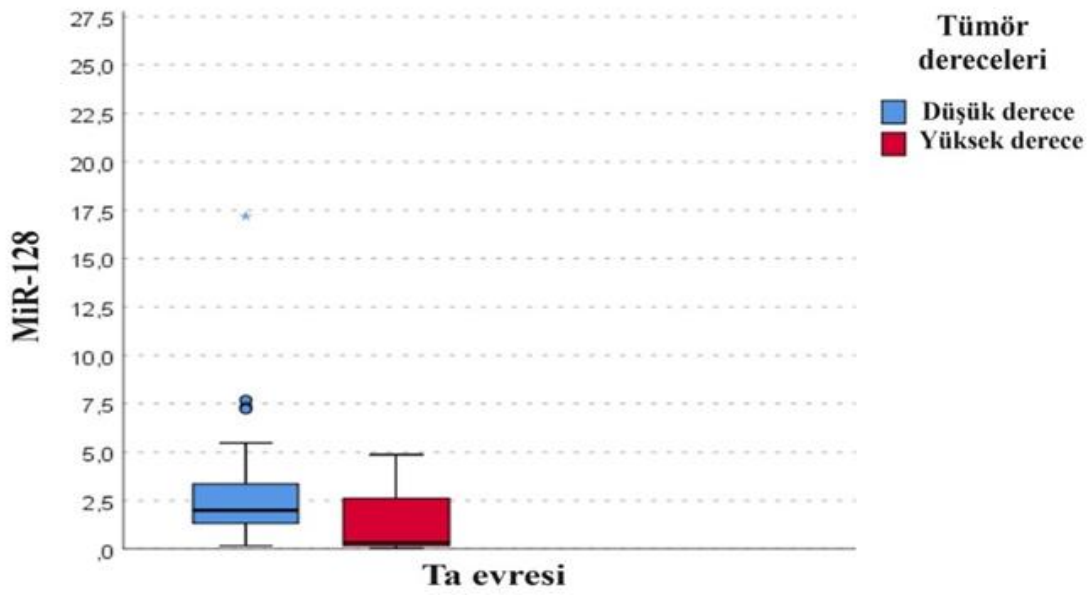
Düşük ve yüksek dereceli Ta evresinde yer alan hastalar kendi aralarında değerlendirildiğinde PVT1 ekspresyonlarında anlamlı artış bulundu ($p= 0,002$) (Tablo 5, Şekil 16). MiR-128 ekspresyonu Ta evresinde düşük dereceye sahip olan hastalarda artarken, Ta yüksek dereceli olan hasta grubunda ise azalmıştı ($p= 0,045$) (Tablo 5, Şekil 17).

Tablo 5: PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeylerinin patolojik evresi Ta olan grupta tümör derecelerine (Düşük, yüksek) göre ilişkisi.

Parametre		Ta evresi		P değeri
		Düşük derece (n=21)	Yüksek derece (n=9)	
PVT1	Medyan	1,52	24,28	0,002
	Minimum	0,49	0,75	
	Maksimum	15,58	129,96	
MiR-128	Medyan	2,00	0,34	0,045
	Minimum	0,16	0,03	
	Maksimum	17,18	4,87	



Şekil 16: Patolojik evresi Ta olan hastaların tümör derecelerine göre PVT1 ekspresyonlarının dağılımları.



Şekil 17: Patolojik evresi Ta olan hastaların tümör derecelerine göre MiR-128 ekspresyonlarının dağılımı.

MK patolojisine CIS varlığının eşlik ettiği hasta grubu değerlendirildiğinde, PVT1 ekspresyonu artmış olarak bulundu; ancak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,625$) (Tablo 6).

MiR-128 ekspresyonunda ise CIS varlığında artış eğilimi gözlemlendi ancak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,465$) (Tablo 6).

Tablo 6: PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeylerinin CIS varlığı ile ilişkisi.

Parametre		CIS Yok (n=37)	CIS Var (n=13)	p değeri
PVT1	Medyan	6,91	3,30	0,625
	Minimum	0,26	0,11	
	Maksimum	63,64	129,96	
MiR-128	Medyan	1,48	1,32	0,465
	Minimum	0,36	0,03	
	Maksimum	24,10	17,18	

Patolojik evrelemeye varyant patolojilerin eşlik ettiği hasta grupları değerlendirildiğinde, PVT1 ekspresyonu artmış olarak saptandı; ancak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,953$) (Tablo 7). MiR-128 ekspresyonu ise varyant patolojisi olan grupta anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,533$) (Tablo 7).

Tablo 7: PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeylerinin eşlik eden varyant patoloji ile ilişkisi.

Parametre		Varyant Patoloji		p değeri
		Yok (n=47)	Var (n=3)	
PVT1	Medyan	3,36	5,18	0,953
	Minimum	0,11	0,43	
	Maksimum	129,96	16,93	
MiR-128	Medyan	1,32	1,48	0,533
	Minimum	0,03	1,46	
	Maksimum	24,10	3,37	

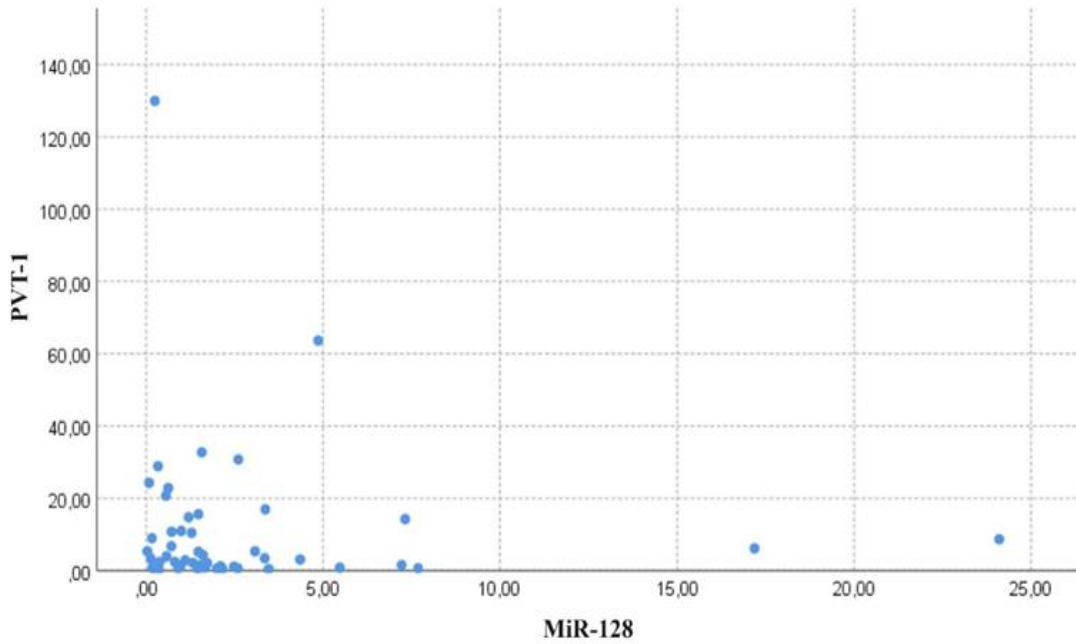
4.4. Hastaların klinik parametreleri ile PVT1 ve miR-128 ekspresyonları ilişkisi

PVT1 ekspresyonlarında sigara kullanan grupta sigara içmeyen gruba kıyasla azalma olmakla birlikte, bu fark anlamlı bulunmadı (sırasıyla $p=0,211$, $p=0,694$) (Tablo 8).

Tablo 8: PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeylerinin sigara kullanımı ile ilişkisi.

Parametre		Sigara Kullanmayan (n=6)	Aktif sigara içici (n=44)	p değeri
PVT1	Medyan	10,83	3,06	0,221
	Minimum	0,26	0,11	
	Maksimum	32,71	129,9	
MiR-128	Medyan	1,24	1,47	0,694
	Minimum	0,36	0,03	
	Maksimum	3,08	24,10	

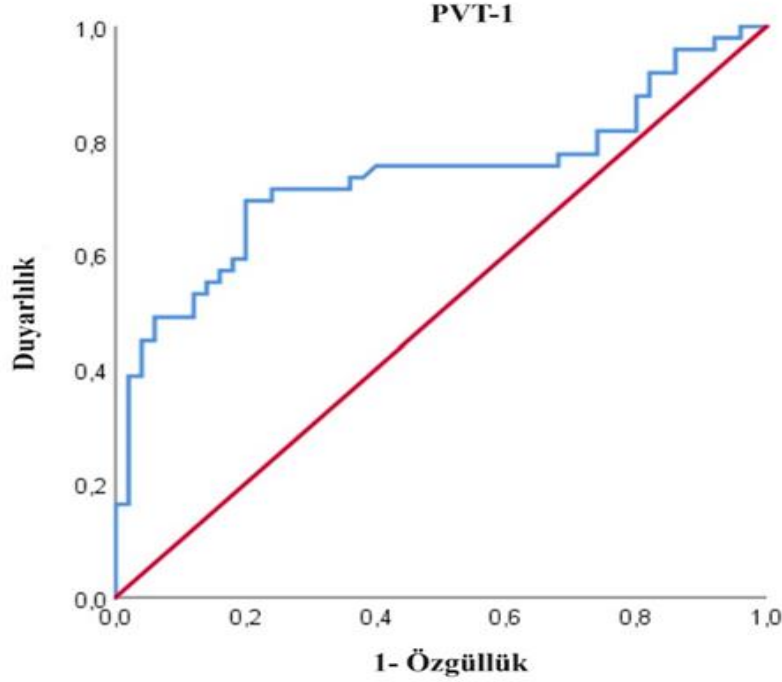
Tümörlü dokuda PVT1 ve miR-128 ekspresyonlarıyla hasta yaşı, VKİ ve sigara paket yılı arasında anlamlı korelasyon saptanmadı. Ek olarak PVT1 ve miR-128 ekspresyonları da kendi aralarında anlamlı olarak korelasyon göstermedi (Şekil 18).



Şekil 18: PVT1 ve miR-128 gen ekspresyonlarının korelasyon dağılımı.

4.5. Tümörlü dokularda PVT1 ve miR-128 ekspresyon düzeylerinin ROC analizi

Çalışmamızda tümörlü dokularda PVT1 ve miR-128 değerlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü ROC (Receiver Operating Curve) eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 19,20).

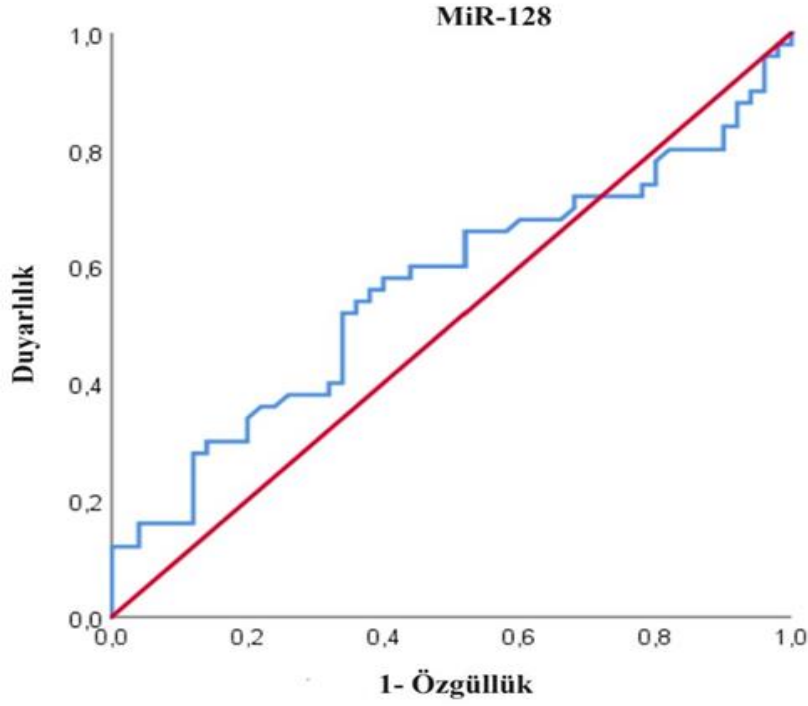


Şekil 19: PVT1 değerlerine göre ROC (Receiver Operating Curve) eğrisi.

MK'lı hastaların dokularında PVT1 değerleri için *cut-off* (kesme noktası) 1,43 olarak alındığında duyarlılık %69; özgüllük ise %80 bulundu. Eğri altında kalan alan (EAA) ise 0,735 olarak hesaplandı (Tablo 9).

Tablo 9: PVT1 ekspresyonlarının ROC (Receiver Operating Curve) analizi sonuçları, *cut-off* ve eğri altında kalan alan (EAA) değerleri.

Parametre	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Kesme noktası (<i>Cut-off</i>)	Eğri altında kalan alan (EAA)
PVT1	69	80	1,43	0,735

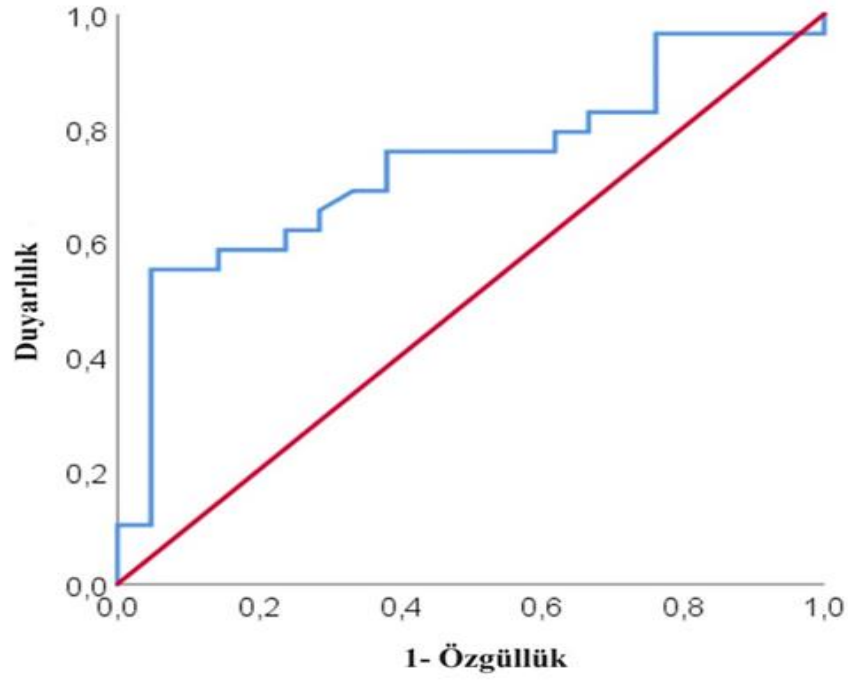


Şekil 20: MiR-128 değerlerine göre ROC (*Receiver Operating Curve*) eğrisi.

MiR-128’de ise *cut-off* 1,17 olarak alındığında duyarlılık %58; özgüllük %60, EAA 0,563 olarak bulundu. (Tablo 10). MiR-128’in, düşük ve yüksek dereceli tümörü olan hastalardaki ROC eğrisi analizi Şekil 21’de gösterildi.

Tablo 10: MiR-128 (*Receiver Operating Curve*) analizi sonuçları, *cut-off* ve eğri altında kalan alan (EAA) değerleri.

Parametre	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Kesme noktası (<i>Cut-off</i>)	Eğri altında kalan alan (EAA)
MiR-128	58	60	1,17	0,563



Şekil 21: MiR-128'in düşük ve yüksek dereceli tümörü olan hastalardaki ROC (Receiver Operating Curve) eğrisi.

Düşük ve yüksek dereceli tümöre sahip hastalar için MiR_128 *cut-off* değeri 0,86 olarak alındığında duyarlılık %55; özgüllük ise %95 olarak bulundu. EAA 0,735 olarak saptandı (Tablo 11).

Tablo 11: MiR-128'in düşük ve yüksek dereceli tümörü olan hastalardaki ROC (Receiver Operating Curve) analizi sonuçları, *cut-off* ve eğri altında kalan alan (EAA) değerleri.

Parametre	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Kesme noktası (<i>Cut-off</i>)	Eğri altında kalan alan (EAA)
MiR-128	55	95	0,86	0,735

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde bazı bölgelerde yaşa göre standardize edilmiş oranları azalmakla birlikte, yaşlanan nüfus nedeniyle tüm dünyada MK hasta sayısı giderek artmaktadır. Bu nedenle MK halen ciddi bir sağlık sorunu olup, erken tanı için moleküler mekanizmaların aydınlatılması önem taşımaktadır (132). Moleküler mekanizmalar arasında genetik mutasyonların yanı sıra, epigenetik faktörlerin de rol oynadığı bilinmektedir. Son yıllarda kanser etyopatogenezindeki araştırmalar DNA metilasyonlarından sonra ncRNA'lar üzerinde yoğunlaşmıştır (133). Özellikle lncRNA ve miRNA'lar olmak üzere, çeşitli ncRNA'ların MK tanısında, tedavisinde ve hatta hastalığın önlenmesinde rolleri olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bahsedilen ncRNA'lar, MK'da hem tanisal hem de prognostik açıdan potansiyel biyobelirteçler olarak umut vadetmektedirler (134). Xia ve ark. 13 lncRNA'yı (UCA1, Linc-UBC1, TUG1, MALAT1, H19, GAS5, UNMIBC, MEG3, SNHG16, SPRY4-IT1, HOTAIR, n336928, ncRAN) içeren 9 çalışmayı gözden geçirerek bir metaanaliz yayınlamış, MK'lı hastalara ait tümör dokularında çalışılan bütün lncRNA'ların ekspresyonlarında artış ya da azalış yönünde değişiklikler olduğunu rapor etmişlerdir. Buna ek olarak, bu değişikliklerin kısa genel sağkalım oranı ve tümörün histopatolojik derecesi ile ilişkili olduğu, ancak tümör evresi, tümör boyutu ve cinsiyet ile anlamlı ilişkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (135). Zhang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, MK'lı hastaların tümör dokularında lncRNA CCAT1 (*Colon cancer-associated transcript 1*) ekspresyonlarında artış gösterilmiş, bu artışın hücre proliferasyonu, invazyon ve göçünü arttırdığı gösterilmiştir (136).

PVT1 hepatosellüler karsinom, pankreas ve mide gibi çeşitli kanser türleri ile ilişkisi olduğu ileri sürülen son yıllarda oldukça dikkat çeken lncRNA'lardan biridir. PVT1'in, tümör hücreleri ile çevre dokular arasındaki bağlantının değişimi, ana odaktan hücre kopması, hücre dışı matriksin parçalanması, sitoskeletonun değiştirilmesi yoluyla kanser hücrelerinin hareketliliğinin arttırılması, tümör dokularında anjiyogenezin artışı ile EMT ve uzak metastaza neden olabileceği düşünülmektedir. PVT1'in bu etkilerini TGF- β sinyal yolağı, apoptotik yol ve VEGFC yolakları ile gerçekleştirebileceği, MYC onkogenine komşu yerleşimi nedeniyle de onkogenik özellik gösterebileceği ileri sürülmektedir (96, 100). Ding ve ark. hepatosellüler karsinom tanısı alan hastalarda ve

kanser hücre hatlarında PVT1 ekspresyonunun normal dokuya göre arttığını göstermişler, hastalığın progresyonu, genel sağkalımda azalma ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak, PVT1 ekspresyonu ile hepatoselüler karsinomun evre, derece, tümör boyutu ve metastazı arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır (137). Huang ve ark. pankreas kanserli hastaların tümör dokularında PVT1 ekspresyonunun arttığını ve bu artışın tümör evresi ile anlamlı ilişkisi olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar PVT1'in yüksek ekspresyonu ile genel sağkalımın öngörülebileceğini, bu nedenle potansiyel bir prognostik faktör olabileceğini ifade etmişlerdir (138). Mide kanserinde de PVT1 ekspresyonunda artış saptanmış, bu artış mide kanserli hastalarda kötü prognoz eğilimi ile ilişkilendirilmiştir. Bu araştırmacılar, hem in vivo hem de in vitro olarak PVT1'in mide kanseri hücrelerinin proliferasyon ve invazyonunu arttırdığını göstermiş, terapötik hedef olabileceğini ileri sürmüşlerdir (96). PVT1'in diğer kanser türlerindeki ekspresyonuna bakıldığında, toplam 32 kanser türü içeren derlemede kanserlerin çoğunluğunda PVT1 ekspresyonunun arttığı ifade edilmiştir. Artan PVT1 ekspresyonunun hücre farklılaşması, lenfatik invazyon, lenf nodu metastazı, invazyon derinliği, uzak metastaz ile genel sağkalım süresinde azalmada rol oynadığı gösterilmiş, bu süreçlerle ilişkili tanımlanan 24 hedef genin ekspresyonu PVT1 düzeyleri ile anlamlı şekilde ilişkilendirilmiştir (139).

Literatürde günümüze kadar bildiğimiz kadarıyla PVT1'in MK ile ilişkisini gösteren yalnızca iki çalışma bulunmaktadır (20, 140). Bu çalışmalardan biri in vitro olup, Yu ve ark. tarafından MK hücre kültüründe yapılmış ve PVT1 ekspresyonlarında artış olduğu gösterilmiştir (20). Araştırmacılar PVT1'in anjiyogenez, lenfanjiogenez ve bölgesel lenf nodu metastazı ile ilişkili anti-apoptotik ve proliferatif bir büyüme faktörü olan VEGFC ekspresyonunu arttırarak, MK gelişiminde önemli rol oynadığını ifade etmişlerdir (141). İkinci çalışma ise Tian ve ark. tarafından yapılmış olup, MK'lı hastaların tümör dokusunda ve hücre hatlarında da PVT1 ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Bu araştırmacılar, PVT1'in MK hücre hatlarında miR-31'i azaltarak, CDK1 (*Cyclin-dependent kinase 1*) artışına yol açtığını göstermiş; hücre siklusunda apoptozis ile ilişkilendirilmiş olan CDK1'deki artışın proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi süreçleri etkileyebileceğini ileri sürmüşlerdir (140).

MK'da miRNA'lar lncRNA'lardan çok daha önce araştırılmaya başlamış olup MK ve miRNA ilişkisini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (142). Xie ve ark.

tarafından 2753 MK'lı hastayı kapsayan 26 çalışmanın dahil edildiği miRNA metaanalizinde 37 farklı miRNA karşılaştırılmış; özellikle miR-21, miR-143, miR-155, miR-200, miR-214 ve miR-222 üzerinde çalışmaların yoğun olduğu görülmüştür. MK'lı hastalarda miR-21 ve miR-222 ekspresyon değişikliklerinin genel kısa sağkalım, miR-143'ün yavaş seyir, miR-155'in ilerlemesiz sağkalım (*Progression-free survival*) ve miR-214'in nüksüz sağkalım (*Recurrence-free survival*) ile korele olduğu gösterilmiştir. Bu sistematik incelemede, miRNA'ların MK'nın ilerlemesinde veya nüksün erken tespiti için biyobelirteçler olarak kullanılabileceği ve hatta hastalığın tedavisinde faydalı terapötik hedefler olabileceği öngörülmüştür (143).

MiR-128, tümör hücrelerinde proliferasyon, anjiyogenez, EMT ve invazyon ile ilişkilendirilen önemli bir miRNA'dır. Artan kanıtlar miR-128'in beyin, prostat, akciğer, tiroid ve meme de dahil olmak üzere çeşitli tümörlerin büyümesinde rol oynadığını göstermiştir. Olguların çoğunda miR-128 bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür ve ekspresyonu tümör hücrelerinde sıklıkla azalır (114, 144). Örneğin, miR-128'in glioblastoma multiforme'de önemli ölçüde aşağı regüle edildiği (145), prostat kanserinde ise hücre hareketliliğini ve invazivliğini azalttığı gösterilmiştir (146). Hu ve ark. akciğer kanserli hastaların tümör dokuları ve akciğer kanseri hücre hatlarında miR-128'in ekspresyonunun azaldığını, bu durumun hücrelerin invazyon ve göçünde yavaşlama ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir (147). Cao ve ark. tiroid kanseri doku örneklerinde ve hücre hatlarında miR-128 ekspresyonunun güçlü bir şekilde azaldığını göstermişlerdir. İlginç olarak, hücre hatlarına 5-aza-20-deoxycytidine (DAC) uygulayarak miR-128'in ekspresyonu artırıldığında, apoptozun uyarıldığı, G0/G1 fazında hücre döngüsünün durakladığı, hücrelerinin yaşam süresinin, göçünün, invazyonun ve dolayısıyla belirgin şekilde azaldığı tümör büyümesinde kayda değer bir azaldığı rapor edilmiştir (148).

Onkogen potansiyelli PVT1 ile tümör baskılayıcı olduğu düşünülen miR-128 arasındaki ilişki ise, Liu ve ark. tarafından meme kanserli hastaların doku örneklerinde ve meme kanseri hücre hatlarında değerlendirilmiş, PVT1'in ekspresyonunda artış, miR-128'de azalma olduğu gösterilmiştir. PVT1, miR-128 için spesifik bağlanma bölgeleri bulundurmaktadır. Araştırmacıların görüşün göre, PVT1 artışı miR-128'in hedefi olan FOXQ1 geninin ekspresyonunun artışına neden olmakta, artan FOXO1, hücre hatlarında EMT'yi uyarmaktadır. Diğer yandan PVT1 direkt olarak UPF1'i (*Up-*

frameshift protein 1) bağlayarak proliferasyon ve metastaz süreçlerini de uyarmaktadır (149).

Literatürde bildiğimiz kadarıyla miR-128'in MK ile ilişkisini gösteren yalnızca iki çalışma bulunmaktadır (20, 140). Zhou ve ark. MK'lı 9 hastanın tümör dokularında ve MK hücre hatlarında mir-128 ekspresyonlarını incelemiş, miR-128'de azalma, VEGFC'de ise artış olduğunu göstermişlerdir. Artan VEGFC hücre proliferasyonu, göç ve invazyonunu uyarmaktadır (21). Bilindiği gibi, VEGFC anti-apoptotik ve proliferatif rollere sahip olan lenfatik vasküler sistemin büyüme faktörüdür; dolayısıyla anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve bölgesel lenf nodu metastazı ile ilişkilidir. Yu ve ark. tarafından MK hücre hatlarında yapılan çalışmada ise, PVT1 / miR-128 / VEGFC birlikte incelenmiş; PVT1'de artış, miR-128'de azalma ve VEGFC'de artış saptanmıştır. Araştırmacılara göre, PVT1 transkriptleri miR-128 ile doğrudan etkileşime girerek miR-128 düzeylerinde azalmaya neden olur. MiR-128 ile VEGFC ilişkisi ters yöndedir. MiR-128, VEGFC mRNA'sının 3'-UTR bölgesine bağlanarak mRNA yıkıma uğratmaktadır. MiR-128 azalması dolayısıyla VEGFC artışı ile sonuçlanacaktır. Araştırmacılar, bu sonuçlar ışığında PVT1 / miR-128 / VEGFC aksının MK'da tümörigenezinde kritik bir rol oynadığını ileri sürmektedirler (20).

Biz de çalışmamızda MK'lı hastaların tümör dokularında PVT1 ekspresyonunun tümöre bitişik normal dokuya kıyasla anlamlı olarak arttığını saptadık. Bulgularımız Tian ve ark. (140) tarafından yapılan in vivo çalışma ile, Yu ve ark. (20) tarafından yapılan in vitro çalışmaları destekler niteliktedir. Bizim çalışmamızda tümör evresi ilerledikçe PVT1'de artış eğilimi görülmekle birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Histopatolojik olarak yüksek dereceli tümörler, düşük dereceli olan gruba göre anlamlı bir artış gösterdi. Benzer şekilde, sadece Ta evresindeki hastalar, histopatolojik derecesine göre gruplandırıldığında da yüksek dereceli tümörlerdeki PVT1 yüksekliği devam etti. MiR-128'in ekspresyonuna baktığımızda ise, tümöre bitişik normal dokuya kıyasla anlamlı değişiklik olmadığını saptadık. Tümör evresi ilerledikçe miR-128 ekspresyonunda azalış görülmekle birlikte, bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Histopatolojik olarak yüksek dereceli tümörler, düşük dereceli olan gruba göre anlamlı bir azalış gösterdi. Yalnızca Ta evresindeki yüksek dereceli tümörlerdeki miR-128 ekspresyonu düşük evreli olanlara kıyasla anlamlı derecede düşük olarak bulundu. T1 evresindeki hastalarda düşük dereceli bir hasta

bulunmadığından bu grupta bir değerlendirilme yapılamadı. Literatürdekine benzer şekilde, çalışmamızda tümörlü dokularda bitişik normal dokuya kıyasla PVT1 artışı ve miR-128 azalışı saptanmıştır. Evre ve derecelendirmede zaman zaman bu durum istatistiksel bir anlamlılık düzeyine ulaşmasa da, bu durumu çalışma grubumuzun kasa invaze olmayan Ta ve T1 evresindeki hastalardan oluşmasına bağlayabiliriz.

Bu parametrelerin tümör belirteci olarak kullanılıp kullanılmayacağına yönelik ROC eğrileri yaptığımızda, PVT1 için kesme noktası 1,43 alındığında duyarlılık %69, özgüllük ise %80 ve eğri altında kalan alan 0,735 olarak saptandı. MiR-128 ROC analizinde ise tümörlü dokularda miR-128 değerinin kesme noktası 1,17 alındığında duyarlılık %58, özgüllük %60 ve eğri altında kalan alan 0,563 olarak saptandı. Bu değerler çok düşük olmamakla birlikte, tümör belirteci olarak kullanımı için henüz yeterli olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızı sınırlayan faktörlere bakıldığında, çalışma grubumuzu Mayıs 2022-Nisan 2023 yılları arasında MK olgusu alan hastalar oluşturduğu için henüz uzun süreli takip bilgisi elde edilmemiştir. Bu sınırlılık nedeni ile incelenen ncRNA'ların, hastalığın nüks progresyon ve sağkalım ile ilişkisi hakkında bilgi ortaya konamamıştır. Çalışmamızda toplam hasta sayısı yeterli olmasına karşın, histopatolojik evre ve derecelere ayırdığımızda alt gruplardaki olan hasta sayıları nispeten azdır. Çalışma grubumuzdaki hasta sayısı artırılarak ve miR-128'in yüksek dereceli tümörlerde ekspresyonundaki azalma göz önüne alınarak kasa invaziv ya da metastazlı hasta grubu da eklenerek çalışma genişletilebilir. Ayrıca hasta sayısını arttırarak incelenen parametreler ve ilişkiler hakkında daha detaylı bilgiler elde edilebilir.

Sonuç olarak, çalışmamız MK'da PVT1 ve miR-128 ekspresyonlarının birlikte in vivo olarak değerlendirildiği ilk çalışmadır. MK'nın erken tanısı, prognozun belirlenmesi ve takibi diğer kanser türleri gibi hastalığın yönetimi açısından oldukça önemlidir. Çalışmamız kasa invaziv olmayan MK hastaları için PVT1 ve miR-128'in erken bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, her iki parametrenin duyarlılık ve özgüllüklerinin nispeten düşük olması nedeniyle hasta sayısı artırılarak, kasa invaziv, yakın ve uzak metastazlı hastaların da dahil edildiği daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Elde ettiğimiz veriler MK etiyopatogenezinin ve kanserin epigenetik yollarının aydınlatılması açısından ilerleyen dönemlerde bu biyobelirteçlerin umut verici çalışmalara ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clinicians*. Mayıs 2021;71(3):209-49.
2. Doshi B, Athans SR, Woloszyńska A. Biological Differences Underlying Sex and Gender Disparities in Bladder Cancer: Current Synopsis and Future Directions. *Oncogenesis*. 04 Eylül 2023;12(1):44.
3. Pasin E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP. Superficial Bladder Cancer: An Update on Etiology, Molecular Development, Classification, and Natural History. *Rev Urol*. 2008;10(1):31-43.
4. Białek Ł, Bilski K, Dobruch J, Krajewski W, Szydełko T, Kryst P, et al. Non-Invasive Biomarkers in the Diagnosis of Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma- A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 16 Mart 2022;14(6):1520.
5. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder Cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17022.
6. Chew CL, Conos SA, Unal B, Tergaonkar V. Noncoding RNAs: Master Regulators of Inflammatory Signaling. *Trends Mol Med*. 2018;24(1):66-84.
7. Sparber P, Filatova A, Khantemirova M, Skoblov M. The Role of Long Non-coding RNAs in the Pathogenesis of Hereditary Diseases. *BMC Med Genomics*. 2019;12(2):42.
8. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv Exp Med Biol*. 2016;937:3-17.
9. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An Overview of MicroRNAs: Biology, Functions, Therapeutics, and Analysis Methods. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5451-65.
10. Yang G, Lu X, Yuan L. LncRNA: A Link Between RNA and Cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1839(11):1097-109.
11. Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, Lee M, Song SJ. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1723.

12. De Rooij LA, Mastebroek DJ, Ten Voorde N, van der Wall E, van Diest PJ, Moelans CB. The MicroRNA Lifecycle in Health and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(23):5748.
13. Nemeth K, Bayraktar R, Ferracin M, Calin GA. Non-coding RNAs in Disease: From Mechanisms to Therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2024;25(3):211-32.
14. Loganathan T, Doss C GP. Non-coding RNAs in Human Health and Disease: Potential Function as Biomarkers and Therapeutic Targets. *Funct Integr Genomics*. 2023;23(1):33.
15. Ghafouri-Fard S, Omrani MD, Taheri M. Long Noncoding RNA PVT1: A Highly Dysregulated Gene in Malignancy. *J Cell Physiol*. 2020;235(2):818-35.
16. Budi HS, Younus LA, Lafta MH, Parveen S, Mohammad HJ, Al-Qaim ZH, et al. The Role of MiR-128 in Cancer Development, Prevention, Drug Resistance, and Immunotherapy. *Front Oncol*. 2022;12:1067974.
17. Huang DQ, Guo P, Lv NH, Luo LY. MiR-128, A Key Regulator of Oncogenic Properties. *Mol Biol*. 2015;49(1):40-7.
18. Li M, Fu W, Wo L, Shu X, Liu F, Li C. MiR-128 and Its Target Genes in Tumorigenesis and Metastasis. *Exp Cell Res*. 2013;319(20):3059-64.
19. Chen W, Lou K, Wang K, Zhang J. Mir-128-3p Inhibits EMT and Invasion of Lung Carcinoma Cells by Targeting SIRT1. *Int J Clin Exp Med*. 2020;13(5):2956-65.
20. Yu C, Longfei L, Long W, Feng Z, Chen J, Chao L, et al. LncRNA PVT1 regulates VEGFC through inhibiting miR-128 in bladder cancer cells. *J Cell Physiol*. 2019;234(2):1346-53.
21. Zhou X, Qi L, Tong S, Cui Y, Chen J, Huang T, et al. MiR-128 Downregulation Promotes Growth and Metastasis of Bladder Cancer Cells and Involves VEGF-C Upregulation. *Oncol Lett*. 2015;10(5):3183-90.
22. Babjuk M, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, Dominguez Escrig JL, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *Eur Urol*. 2022;81(1):75-94.
23. WHO. Bladder Source. Globocan 2020. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2020.

24. Zhang Y, Rumgay H, Li M, Yu H, Pan H, Ni J. The Global Landscape of Bladder Cancer Incidence and Mortality in 2020 and Projections to 2040. *J Glob Health*. 2023;13:04109.
25. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of Bladder Cancer. *Med Sci (Basel)*. 2020;8(1):15.
26. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Kanser İstatistikleri 2018. 2022.
27. U.S. Cancer Statistics. U.S. Cancer Statistics Data Visualizations Tool. 2020. <https://www.cdc.gov/cancer/uscs/dataviz/index.htm>.
28. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer Statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(1):17-48.
29. Ochodnický P, Cruz CD, Yoshimura N, Cruz F. Neurotrophins As Regulators of Urinary Bladder Function. *Nat Rev Urol*. 2012;9(11):628-37.
30. Fry CH, Vahabi B. The Role of the Mucosa in Normal and Abnormal Bladder Function. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2016;119(S3):57-62.
31. Giudici N, Bonne F, Blarer J, Minoli M, Krentel F, Seiler R. Characteristics of Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma in the Context of Bladder Cancer: A Narrative Review. *Transl Androl Urol*. 2021;10(10):4036-50.
32. Zhu S, Yu W, Yang X, Wu C, Cheng F. Traditional Classification and Novel Subtyping Systems for Bladder Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:102.
33. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67(2):93-9.
34. Dyrskjøl L, Hansel DE, Efstathiou JA, Knowles MA, Galsky MD, Teoh J, et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2023;9(1):1-21.
35. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*. 2016;70(1):106-19.
36. Sattam A. Halaseh. A Review of the Etiology and Epidemiology of Bladder Cancer: All You Need To Know. 2022; 14(7): e27330.
37. Karatzas A, Tzortzis V. Lower Urinary Tract Symptoms and Bladder Cancer in Children: The Hidden Scenario. *Urology Annals*. 2019;11(1):102.

38. Mohammadian M. Recent Patterns of Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview. *WCRJ* 2020;7:e1464.
39. Pang L, Ding Z, Chai H, Li F, Wu M, Shuang W. Causal Relationship Between Smoking Status, Smoking Frequency and Bladder Cancer: A Mendelian Randomization Study. *Genes Genom.* 2023;45(2):203-13.
40. Chappidi MR, Kates M, Tosoian JJ, Johnson MH, Hahn NM, Bivalacqua TJ, et al. Evaluation of Gender-Based Disparities in Time From Initial Haematuria Presentation to Upper Tract Urothelial Carcinoma Diagnosis: Analysis of A Nationwide Insurance Claims Database. *BJU International.* 2017;120(3):377-86.
41. Li P, Chen J, Miyamoto H. Androgen Receptor Signaling in Bladder Cancer. *Cancers.* 2017;9(2):20.
42. Zhao X, Wang Y, Liang C. Cigarette Smoking and Risk Of Bladder Cancer: A Dose–Response Meta-Analysis. *Int Urol Nephrol.* 2022;54(6):1169-85.
43. Ślusarczyk A, Zapala P, Zapala Ł, Radziszewski P. The Impact of Smoking on Recurrence and Progression of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023;149(6):2673-91.
44. Feki-Tounsi M, Khelifi R, Louati I, Fourati M, Mhiri MN, Hamza-Chaffai A, et al. Polymorphisms in XRCC1, ERCC2, and ERCC3 DNA Repair Genes, CYP1A1 Xenobiotic Metabolism Gene, and Tobacco Are Associated With Bladder Cancer Susceptibility in Tunisian Population. *Environ Sci Pollut Res.* 2017;24(28):22476-84.
45. Yan H, Ying Y, Xie H, Li J, Wang X, He L, et al. Secondhand Smoking Increases Bladder Cancer Risk in Nonsmoking Population: A Meta-Analysis. *Cancer Management and Research.* 2018;10:3781-91.
46. Harling M, Schablon A, Schedlbauer G, Dulon M, Nienhaus A. Bladder Cancer Among Hairdressers: A Meta-Analysis. *Occupational and Environmental Medicine.* 2010;67(5):351-8.
47. Caballero JM, Gili JM, Pereira JC, Gomáriz A, Castillo C, Martín-Baranera M. Risk Factors Involved in the High Incidence of Bladder Cancer in an Industrialized Area in North-Eastern Spain: A Case–Control Study. *Journal of Clinical Medicine.* 2023;12(2):728.

48. Vermeulen SH, Hanum N, Grotenhuis AJ, Castaño-Vinyals G, van der Heijden AG, Aben KK, et al. Recurrent Urinary Tract Infection and Risk of Bladder Cancer in the Nijmegen Bladder Cancer Study. *Br J Cancer*. 2015;112(3):594-600.
49. Michaud DS, Platz EA, Giovannucci E. Gonorrhoea and Male Bladder Cancer in A Prospective Study. *Br J Cancer*. 2007;96(1):169-71.
50. Manciuilli T, Marangoni D, Salas-Coronas J, Bocanegra C, Richter J, Gobbi F, et al. Diagnosis and Management of Complicated Urogenital Schistosomiasis: A Systematic Review of the Literature. *Infection*. 2023;51(5):1185-221.
51. Zaghloul MS, Zaghloul TM, Bishr MK, Baumann BC. Urinary Schistosomiasis and the Associated Bladder Cancer: Update. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2020;32(1):44.
52. Xiong J, Yang L, Deng YQ, Yan SY, Gu JM, Li BH, et al. The Causal Association Between smoking, Alcohol Consumption and Risk of Bladder Cancer: A Univariable and Multivariable Mendelian Randomization Study. *International Journal of Cancer*. 2022;151(12):2136-43.
53. Huang DQ, Tan DJH, Ng CH, Amangurbanova M, Sutter N, Lin Tay PW, et al. Hepatocellular Carcinoma Incidence in Alcohol-Associated Cirrhosis: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2023;21(5):1169-77.
54. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers*. 2022;14(7):1732.
55. Yu J, Li H, Liu Z, Wang T, Zhou F, Ma S, et al. Meat Intake and the Risk of Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrition and Cancer*. 2022; 75(3):825-845.
56. Fei L, Wan-Long T. Red and Processed Meat Intake and Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Annals of Oncology*. 2014;25:iv489.
57. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and Cancer Risk: Emerging Biological Mechanisms and Perspectives. *Metabolism*. 2019;92:121-35.
58. Reulen RC, Vogel S de, Zhong W, Zhong Z, Xie LP, Hu Z, et al. Physical activity and risk of prostate and bladder cancer in China: The South and East China

- case-control study on prostate and bladder cancer. PLOS ONE. 02 Haziran 2017;12(6):e0178613.
59. Hektoen HH, Robsahm TE, Stenehjem JS, Axcrona K, Babigumira R, Mondul AM, et al. Vitamin D and Vitamin D-binding Protein and Risk of Bladder Cancer: A Nested Case-Control Study in the Norwegian Janus Serum Bank Cohort. *Cancer Medicine*. 2021;10(12):4107-16.
 60. Kourie HR, Zouein J, Succar B, Mardirossian A, Ahmadi N, Chouery E, et al. Genetic Polymorphisms Involved in Bladder Cancer: A Global Review. *Oncol Rev*. 2023;17:10603.
 61. Karin EVD, Joyce JA. The Evolving Tumor Microenvironment: From Cancer Initiation to Metastatic Outgrowth. *Cancer Cell*. 2023;41:374-403.
 62. Pehlivanoglu B, Aysal A, Ekmekci S, Şahin Y, Toper MH, Gündoğan B, et al. Neoplastik Hastalıkların Moleküler Patolojik Mekanizmaları. *J Curr Pathol*. 2019;3(2):62-80.
 63. Gakis G, Perner S, Stenzl A, Renninger M. The Role of Single-Nucleotide Polymorphisms of the 8q24 Chromosome Region in Patients with Concomitant Bladder and Prostate Cancer. *Scandinavian Journal of Urology*. 2022;56(2):126-30.
 64. Avirmed S, Khuanbai Y, Sanjaajamts A, Selenge B, Dagvadorj BU, Ohashi M. Modifying Effect of Smoking on GSTM1 and NAT2 in Relation to the Risk of Bladder Cancer in Mongolian Population: A Case-Control Study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021;22(8):2479-85.
 65. Skeldon SC, Semotiuk K, Aronson M, Holter S, Gallinger S, Pollett A, et al. Patients with Lynch Syndrome Mismatch Repair Gene Mutations Are at Higher Risk for Not Only Upper Tract Urothelial Cancer but Also Bladder Cancer. *European Urology*. 2013;63(2):379-85.
 66. Asgari M, Firouzi F, Abolhasani M, Bahadoram M, Barahman M, Madjd Z, et al. The Association of P53, CK29, and FGFR3 Overexpression with the Characteristics of Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023;24(9):3125-31.
 67. Bou Zerdan M, Bratslavsky G, Jacob J, Ross J, Huang R, Basnet A. Urothelial Bladder Cancer: Genomic Alterations in Fibroblast Growth Factor Receptor. *Mol Diagn Ther*. 2023;27(4):475-85.

68. Casadei C, Dizman N, Schepisi G, Cursano MC, Basso U, Santini D, et al. Targeted Therapies for Advanced Bladder Cancer: New Strategies with FGFR Inhibitors. *Ther Adv Med Oncol*. 2019;11.
69. Gulia C, Baldassarra S, Signore F, Rigon G, Pizzuti V, Gaffi M, et al. Role of Non-Coding RNAs in the Etiology of Bladder Cancer. *Genes*. 2017;8(11):339.
70. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The Mammalian Epigenome. *Cell*. 2007;128(4):669-81.
71. Saviana M, Le P, Micalo L, Del Valle-Morales D, Romano G, Acunzo M, et al. Crosstalk Between miRNAs and DNA Methylation in Cancer. *Genes*. 2023;14(5):1075.
72. Van Vliet MM, Schoenmakers S, Gribnau J, Steegers-Theunissen RPM. The One-Carbon Metabolism as an Underlying Pathway for Placental DNA Methylation – A Systematic Review. *Epigenetics*. 2024;19(1):2318516.
73. Greenberg MVC, Bourc'his D. The Diverse Roles of DNA Methylation in Mammalian Development and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(10):590-607.
74. Bhootra S, Jill N, Shanmugam G, Rakshit S, Sarkar K. DNA Methylation and Cancer: Transcriptional Regulation, Prognostic, and Therapeutic Perspective. *Med Oncol*. 2023;40(2):71.
75. Nishiyama A, Nakanishi M. Navigating the DNA Methylation Landscape of Cancer. *Trends in Genetics*. 2021;37(11):1012-27.
76. Sokolova V, Sarkar S, Tan D. Histone Variants and Chromatin Structure, Update of Advances. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2023;21:299-311.
77. Liu R, Wu J, Guo H, Yao W, Li S, Lu Y, et al. Post-Translational Modifications of Histones: Mechanisms, Biological Functions, and Therapeutic Targets. *MedComm*. 2023;4(3):e292.
78. Shanmugam MK, Arfuso F, Arumugam S, Chinnathambi A, Jinsong B, Warriar S, et al. Role of Novel Histone Modifications in Cancer. *Oncotarget*. 2017;9(13):11414-26.
79. Nils G. Walter. Are Non-Protein Coding RNAs Junk or Treasure? An Attempt to Explain and reconcile Opposing Viewpoints of Whether the Human Genome is

- Mostly Transcribed into Non-Functional or Functional RNAs. *BioEssays*. 2024;46(4):2300201.
80. Sang L, Yang L, Ge Q, Xie S, Zhou T, Lin A. Subcellular Distribution, Localization, and Function of Noncoding RNAs. *WIREs RNA*. 2022;13(6):e1729.
 81. Guzel E, Okyay TM, Yalçınkaya B, Karacaoğlu S, Göçmen M, Akcakuyu MH. Tumor Suppressor and Oncogenic Role of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *North Clin Istanbul*. 2020;7(1):81-86.
 82. Dahariya S, Paddibhatla I, Kumar S, Raghuwanshi S, Palapati A, Gutti RK. Long Non-Coding RNA: Classification, Biogenesis and Functions in Blood Cells. *Molecular Immunology*. 2019;112:82-92.
 83. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long Non-Coding RNAs: Insights into Functions. *Nat Rev Genet*. 2009;10(3):155-9.
 84. Groux H, Huet S, Aubrit F, Tran HC, Boumsell L, Bernard A. A 19-kDa Human Erythrocyte Molecule H19 is Involved in Rosettes, Present on Nucleated Cells, and Required for T Cell Activation, Comparison of the Roles of H19 and LFA-3 molecules in T cell activation. *The Journal of Immunology*. 1989;142(9):3013-20.
 85. Briggs SF, Reijo Pera RA. X Chromosome Inactivation: Recent Advances and A Look Forward. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2014;28:78-82.
 86. Alsaedy H, Mirzaei A, Alhashimi RA. Investigating the Structure and Function of Long Non-Coding RNA (LncRNA) and Its Role in Cancer. *Cell Mol Biomed Rep*. 2022;2(4): 245-253.
 87. Coşan DT, Yağcı E, Kurt H. Epigenetikten Kansere Uzanın Çizgiler: Uzun Kodlamayan RNA'lar. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2018;40(3):114-21.
 88. Xiao ZD, Zhuang L, Gan B. Long Non-Coding RNAs in Cancer Metabolism. *BioEssays*. 2016;38(10):991-6.
 89. Rinn JL, Chang HY. Long Noncoding RNAs: Molecular Modalities to Organismal Functions. *Annual Review of Biochemistry*. 2020;89:283-308.
 90. Şentürk H, Komurcu-bayrak E. Kardiyovasküler Hastalıklarda Uzun Kodlamayan RNA'lar ve Sirküler RNA'ların Önemi. *Sabiad*. 2019;2(3):115-25.
 91. Zhao N, Zhang J, Zhao Q, Chen C, Wang H. Mechanisms of Long Non-Coding RNAs in Biological Characteristics and Aerobic Glycolysis of Glioma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(20):11197.

92. Yang M, Lu H, Liu J, Wu S, Kim P, Zhou X. LncRNAfunc: A Knowledgebase of LncRNA Function in Human Cancer. *Nucleic Acids Research*. 2022;50(1):1295-306.
93. Cory S, Graham M, Webb E, Corcoran L, Adams JM. Variant (6;15) Translocations in Murine Plasmacytomas Involve a Chromosome 15 Locus at Least 72 kb From the c-myc Oncogene. *The EMBO Journal*. 1985;4(3):675-81.
94. Boloix A, Masanas M, Jiménez C, Antonelli R, Soriano A, Roma J, et al. Long Non-Coding RNA PVT1 as a Prognostic and Therapeutic Target in Pediatric Cancer. *Front Oncol*. 2019;11: 1173.
95. Graham M, Adams JM. Chromosome 8 Breakpoint Far 3' of the c-myc Oncogene in a Burkitt's Lymphoma 2;8 Variant Translocation is Equivalent to the Murine pvt-1 Locus. *The EMBO Journal*. 1986;5(11):2845-51.
96. Li R, Wang X, Zhu C, Wang K. LncRNA PVT1: A Novel Oncogene in Multiple Cancers. *Cell Mol Biol Lett*. 2022;27(1):84.
97. Colombo T, Farina L, Macino G, Paci P. PVT1: A Rising Star Among Oncogenic Long Noncoding RNAs. *BioMed Research International*. 2015;2015:e304208.
98. Huppi K, Volfovsky N, Runfola T, Jones TL, Mackiewicz M, Martin SE, et al. The Identification of MicroRNAs in a Genomically Unstable Region of Human Chromosome 8q24. *Molecular Cancer Research*. 2008;6(2):212-21.
99. Barsotti AM, Beckerman R, Laptenko O, Huppi K, Caplen NJ, Prives C. p53-Dependent Induction of PVT1 and miR-1204. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(4):2509-19.
100. Cui M, You L, Ren X, Zhao W, Liao Q, Zhao Y. Long Non-Coding RNA PVT1 and Cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;471(1):10-4.
101. Cho SW, Xu J, Sun R, Weissman JS, Curtis C, Chang HY. Promoter of LncRNA Gene PVT1 is a TumorSuppressor DNA Boundary Element. *Cell*. 2018;173: 1398-1412.
102. Wang W, Zhou R, Wu Y, Liu Y, Su W, Xiong W, et al. PVT1 Promotes Cancer Progression Via MicroRNAs. *Front Oncol*. 2019;9: 609.

103. Dong L, Wang H, Gao Y, Wang S, Wang W. Long Non-Coding RNA PVT1 Promotes the Proliferation, Migration and EMT Process of Ovarian Cancer Cells by Regulating CTGF. *Oncology Letters*. 2023;25(2):1-7.
104. Massague J, Sheppard D. TGF- β signaling in health and disease. *Cell*. 2023;186:4007-4037.
105. Wei XC, Lv ZH. MicroRNA-132 Inhibits Migration, Invasion and Epithelial-Mesenchymal Transition Via TGF β 1/Smad2 Signaling Pathway in Human Bladder Cancer. *OncoTargets and Therapy*. 2019;12: 5937-45.
106. Xiong Q, Zhang Y, Li J, Zhu Q. Small Non-Coding RNAs in Human Cancer. *Genes*. 2022;13(11):2072.
107. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75: 843-854.
108. Michlewski G, Cáceres JF. Post-Transcriptional Control of miRNA Biogenesis. *RNA*. 2019;25(1):1-16.
109. Leitão AL, Enguita FJ. A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. *Non-Coding RNA*. 2022;8(1):10.
110. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA—Implications for Cancer. *Virchows Arch*. 2008;452(1):1-10.
111. Menon A, Abd-Aziz N, Khalid K, Poh CL, Naidu R. MiRNA: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(19):11502.
112. Shah MY, Calin GA. MicroRNAs as Therapeutic Targets in Human Cancers. *WIREs RNA*. 2014;5(4):537-48.
113. Kabekkodu SP, Shukla V, Varghese VK, D' Souza J, Chakrabarty S, Satyamoorthy K. Clustered miRNAs and Their Role in Biological Functions and Diseases. *Biological Reviews*. 2018;93(4):1955-86.
114. Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, et al. Interplay Between miRNAs and Human Diseases. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(3):2007-18.
115. Zheng T, Han W, Wang A, Wang Y. Functional Mechanism of hsa-miR-128-3p in Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Cancer Cells Via ZEB1 Regulation. *PeerJ*. 2022;10:e12802.

116. Fontemaggi G. Non-Coding RNA Regulatory Networks in Post-Transcriptional Regulation of VEGFA in Cancer. *IUBMB Life*. 2023;75(1):30-9.
117. Huang L, Luo J, Cai Q, Pan Q, Zeng H, Guo Z, et al. MicroRNA-125b Suppresses the Development of Bladder Cancer by Targeting E2F3. *International Journal of Cancer*. 2011;128(8):1758-69.
118. Zhang CM, Song LD, Wang JW, Ye HB, Chen S. Role of miR-490-3p in Blocking Bladder Cancer Growth Through Targeting the RNA-Binding Protein PCBP2. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2022;38(1):30-7.
119. Chang Y, Jin H, Li H, Ma J, Zheng Z, Sun B, et al. MiRNA-516a Promotes Bladder Cancer Metastasis by Inhibiting MMP9 Protein Degradation Via the AKT/FOXO3A/SMURF1 Axis. *Clinical and Translational Medicine*. 2020;10(8):e263.
120. Wang H, Niu X, Jiang H, Mao F, Zhong B, Jiang X, et al. Long Non-Coding RNA DLX6-AS1 Facilitates Bladder Cancer Progression Through Modulating miR-195-5p/VEGFA Signaling Pathway. *Aging*. 2020;12(16):16021-34.
121. Ching AS, Ahmad-Annuar A. A Perspective on the Role of microRNA-128 Regulation in Mental and Behavioral Disorders. *Front Cell Neurosci*. 2015;9: 465.
122. Tan CL, Plotkin JL, Venø MT, Von Schimmelmann M, Feinberg P, Mann S, et al. MicroRNA-128 Governs Neuronal Excitability and Motor Behavior in Mice. *Science*. 2013;342(6163):1254-8.
123. Adlakha YK, Saini N. Brain microRNAs and Insights into Biological Functions and Therapeutic Potential of Brain Enriched miRNA-128. *Mol Cancer*. 2014;13(1):33.
124. Zhao L, Li R, Xu S, Li Y, Zhao P, Dong W, et al. Tumor Suppressor miR-128-3p Inhibits Metastasis and Epithelial–Mesenchymal Transition by Targeting ZEB1 in Esophageal Squamous-Cell Cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2018;50(2):171-80.
125. Al-Awsi GRL, Jasim SA, Fakri Mustafa Y, Alhachami FR, Ziyadullaev S, Kandeel M, et al. The Role of miRNA-128 in the Development and Progression of Gastrointestinal and Urogenital Cancer. *Future Oncology*. 2022;18(38):4209-31.
126. Bhattacharjee R, Prabhakar N, Kumar L, Bhattacharjee A, Kar S, Malik S, et al. Crosstalk Between Long Noncoding RNA and microRNA in Cancer. *Cell Oncol*. 2023;46(4):885-908.

127. Sun B, Liu C, Li H, Zhang L, Luo G, Liang S, et al. Research Progress on the Interactions Between Long Non-Coding RNAs and microRNAs in Human Cancer (Review). *Oncology Letters*. 2020;19(1):595-605.
128. López-Urrutia E, Bustamante Montes LP, Ladrón de Guevara Cervantes D, Pérez-Plasencia C, Campos-Parra AD. Crosstalk Between Long Non-Coding RNAs, Micro-RNAs and mRNAs: Deciphering Molecular Mechanisms of Master Regulators in Cancer. *Front Oncol*. 2019;9: 669.
129. Fu C, Li D, Zhang X, Liu N, Chi G, Jin X. LncRNA PVT1 Facilitates Tumorigenesis and Progression of Glioma via Regulation of MiR-128-3p/GREM1 Axis and BMP Signaling Pathway. *Neurotherapeutics*. 2018;15(4):1139-57.
130. Song J, Wu X, Liu F, Li M, Sun Y, Wang Y, et al. Long Non-Coding RNA PVT1 Promotes Glycolysis and Tumor Progression by Regulating miR-497/HK2 Axis in Osteosarcoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;490(2):217-24.
131. Chen J, Yu Y, Li H, Hu Q, Chen X, He Y, et al. Long Non-Coding RNA PVT1 Promotes Tumor Progression by Regulating the miR-143/HK2 Axis in Gallbladder Cancer. *Mol Cancer*. 2019;18(1):33.
132. van Hoogstraten LMC, Vrieling A, van der Heijden AG, Kogevinas M, Richters A, Kiemeny LA. Global Trends in the Epidemiology of Bladder Cancer: Challenges for Public Health and Clinical Practice. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(5):287-304.
133. Ferreira HJ, Esteller M. Non-Coding RNAs, Epigenetics, and Cancer: Tying it All Together. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37(1):55-73.
134. Jiang L, Sun G, Zou L, Guan Y, Hang Y, Liu Y, et al. Noncoding RNAs as a Potential Biomarker for the Prognosis of Bladder Cancer: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2023;23(4):325-34.
135. Xia Y, Liu Z, Yu W, Zhou S, Shao L, Song W, et al. The Prognostic Significance of Long Noncoding RNAs in Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Plos One*. 2018;13(6): e0198602.
136. Zhang C, Wang W, Lin J, Xiao J, Tian Y. LncRNA CCAT1 Promotes Bladder Cancer Cell Proliferation, Migration and Invasion. *Int braz j urol*. 2019;45:549-59.
137. Ding C, Yang Z, Lv Z, Du C, Xiao H, Peng C, et al. Long Non-Coding RNA PVT1 is Associated with Tumor Progression and Predicts Recurrence in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Oncology Letters*. 2015;9(2):955-63.

138. Huang C, Yu W, Wang Q, Cui H, Wang Y, Zhang L, et al. Increased Expression of the LncRNA PVT1 is Associated with Poor Prognosis in Pancreatic Cancer Patients. *Minerva Med.* 2015;106(3):143-9.
139. Chen X, Yang Y, Cao Y, Wu C, Wu S, Su Z, et al. LncRNA PVT1 Identified as an Independent Biomarker for Prognosis Surveillance of Solid Tumors Based on Transcriptome Data and Meta-Analysis. *Cancer Management and Research.* 2018;10:2711-27.
140. Tian Z, Cao S, Li C, Xu M, Wei H, Yang H, et al. LncRNA PVT1 Regulates Growth, Migration, and Invasion of Bladder Cancer by miR-31/ CDK1. *Journal of Cellular Physiology.* 2019;234(4):4799-811.
141. Mylona E, Magkou C, Gorantonakis G, Giannopoulou I, Nomikos A, Zarogiannos A, et al. Evaluation of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C Role in Urothelial Carcinomas of the Bladder. *Anticancer Research.* 2006;26(5):3567-71.
142. El-Mahdy HA, Elsakka EGE, El-Husseiny AA, Ismail A, Yehia AM, Abdelmaksoud NM, et al. MiRNAs Role in Bladder Cancer Pathogenesis and Targeted Therapy: Signaling Pathways Interplay – A review. *Pathology Research and Practice.* 2023;242:154316.
143. Xie Y, Ma X, Chen L, Li H, Gu L, Gao Y, et al. MicroRNAs with Prognostic Significance in Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):5619.
144. Orso F, Quirico L, Dettori D, Coppo R, Virga F, Ferreira LC, et al. Role of miRNAs in Tumor and Endothelial Cell Interactions During Tumor Progression. *Seminars in Cancer Biology.* 2020;60:214-24.
145. Xu J, Song J, Xiao M, Wang C, Zhang Q, Yuan X, et al. RUNX1 (RUNX Family Transcription Factor 1), A Target of microRNA miR-128-3p, Promotes Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiform by Upregulating Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1). *Bioengineered.* 2021;12(2):11768-81.
146. Li S, Wang Y, Cao Q, Li H, Zhao Z, Wei B, et al. GLIDR Promotes the Aggressiveness Progression of Prostate Cancer Cells by Sponging miR-128–3p. *Pathology - Research and Practice.* 2023;242:154343.
147. Hu J, Cheng Y, Li Y, Jin Z, Pan Y, Liu G, et al. MicroRNA-128 Plays A Critical Role in Human Non-Small Cell Lung Cancer Tumourigenesis, Angiogenesis and

Lymphangiogenesis by Directly Targeting Vascular Endothelial Growth Factor-C. European Journal of Cancer. 2014;50(13):2336-50.

148. Cao XZ, Bin H, Zang ZN. MiR-128 Suppresses The Growth of Thyroid Carcinoma by Negatively Regulating SPHK1. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019;109:1960-6.
149. Liu S, Chen W, Hu H, Zhang T, Wu T, Li X, et al. Long Noncoding RNA PVT1 Promotes Breast Cancer Proliferation And Metastasis by Binding miR-128-3p and UPF1. Breast Cancer Res. 2021;23(1):115.



HAM VERİLER



FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI