



**T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL EĞTİM VE  
ARAŞTIRMA HASTANESİ  
PATOLOJİ KLİNİĞİ**

**BÖBREK HÜCRELİ KARSİNOM VE BÖBREK HÜCRELİ  
KARSİNOM METASTAZLARINDA MİKRORNA-21 VE  
MİKRORNA-210 EKSPRESYONUNUN HİSTOLOJİK TÜMÖR  
TİPİ VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

**Dr. Taha Cumhan Şavlı**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL-2020**





**T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL EĞİTİM VE  
ARAŞTIRMA HASTANESİ  
PATOLOĞİ KLİNİĞİ**

**BÖBREK HÜCRELİ KARSİNOM VE BÖBREK HÜCRELİ  
KARSİNOM METASTAZLARINDA MİKRORNA-21 VE  
MİKRORNA-210 EKSPRESYONUNUN HİSTOLOĞİK TÜMÖR  
TİPİ VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

**Dr. Taha Cumhan Şavlı**

**Tez DanıŐmanı:  
Uzm. Dr. Sevim Baykal Koca**

**TIPTA UZMANLIK TEĞİ**

**İSTANBUL-2020**

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	İV
KISALTMALAR .....	V
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT .....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. BÖBREK HÜCRELİ TÜMÖRLER .....	3
2.1.1. Epidemiyoloji .....	3
2.1.2. Etiyoloji.....	3
2.1.2.1. Obezite.....	3
2.1.2.2. Tütün Kullanımı .....	3
2.1.2.3. Hipertansiyon.....	3
2.1.2.4. Kazanılmış Kistik Böbrek Hastalığı.....	4
2.1.2.5. Mesleki Maruziyet.....	4
2.1.3. Genetik Yatkınlık .....	4
2.1.4. Klinik Prezantasyon.....	4
2.1.5. Derecelendirme.....	4
2.1.6. Patolojik TNM Evrelemesi .....	5
2.1.7. Klinik Evreleme.....	6
2.1.8. Böbrek Tümörlerinin Sınıflandırılması .....	7
2.1.8.1. Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom .....	9
2.1.8.2. Papiller böbrek hücreli karsinom .....	11
2.1.8.3. Kromofob böbrek hücreli karsinom .....	13
2.1.8.4. Düşük malignite potansiyelli multiloküler kistik böbrek hücreli neoplazi .....	14
2.1.8.5. Herediter leiomyomatozis ve böbrek hücreli karsinom ilişkili böbrek hücreli karsinom .....	14
2.1.8.6. Toplayıcı duktus karsinomu.....	15

2.1.8.7. Böbrek medüller karsinomu.....	15
2.1.8.8. MiT ailesi translokasyonlu böbrek hücreli karsinom.....	15
2.1.8.9. Süksinat dehidrogenaz eksikliği gösteren böbrek hücreli karsinom .....	16
2.1.8.10. Müsinöz tübüler ve içsi hücreli karsinom .....	16
2.1.8.11. Tübülökistik böbrek hücreli karsinom.....	17
2.1.8.12. Edinsel kistik hastalık ilişkili böbrek hücreli karsinom .....	17
2.1.8.13. Berrak hücreli papiller böbrek hücreli karsinom .....	17
2.1.8.14. Böbrek hücreli karsinom, sınıflandırılmayan.....	18
2.2. MİKRORNA.....	18
2.2.1. Giriş .....	18
2.2.2. MikroRNA Biyogenezi.....	19
2.2.3. MikroRNA Fonksiyonları .....	20
2.2.4. MikroRNA Etkileri.....	21
2.2.4.1. Gelişimsel zamanlama.....	21
2.2.4.2. Hücre çoğalması ve diferansiyasyonu .....	21
2.2.4.3. Apoptoz .....	21
2.2.4.4. Kanserler.....	22
2.2.5. MikroRNA-21 ve MikroRNA-21'in Böbrek Karsinomlarındaki Ekspresyon Durumu .....	22
2.2.6. MikroRNA-210 ve MikroRNA-210'un Böbrek Karsinomlarındaki Ekspresyon Durumu .....	23
2.2.7. MikroRNA'ların Klinik Kullanımları.....	24
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
3.1. OLGU SEÇİMİ.....	26
3.2. YÖNTEM.....	27
3.2.1. Dokuların Mikrosantrifüj Tüpüne Aktarımı.....	27
3.2.2. Deparafinizasyon – RNA izolasyonu .....	27
3.2.3. Total RNA'dan Komplementer DNA Sentezi .....	32
3.2.4. Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile miRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi .....	34
3.2.5. Hedef miRNA Ekspresyon Verilerinin Normalizasyonu ve Ekspresyon Profillerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi.....	37

3.2.6. İstatistik Analiz.....	37
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>39</b>
4.1. DEMOGRAFİK VE KLİNİK BULGULAR.....	39
4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	39
4.3. MOLEKÜLER BULGULAR.....	42
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>54</b>
<b>6. SONUÇLAR.....</b>	<b>62</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>64</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>81</b>



## TEŞEKKÜR

SBÜ İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitim sürecimde ilgi, destek ve deneyimlerinden yararlandığım, başta idari sorumlumuz Doç. Dr. Cem LEBLEBİCİ ve eğitim sorumlumuz Doç. Dr. Nevra DURSUN olmak üzere, bilgi ve tecrübelerini aktaran tüm hocalarıma ve uzmanlarıma,

Tezimin ve eğitimimin büyük bir kısmında yeri olan, mesleki ve akademik gelişimimde katkısı bulunan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Canan KELTEN TALU'ya,

En yoğun zamanlarında dahi beni destekleyen, tez sürecimde ve eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Uzm. Dr. Sevim BAYKAL KOCA'ya,

Çalışmamın her aşamasında, özellikle moleküler patoloji ile ilgili bilgi ve deneyiminden yararlandığım, laboratuvarının kapılarını çalışmam için sonuna kadar açan, gece gündüz beraber çalıştığımız Doç. Dr. İsmail Yılmaz'a,

Tezimin istatistiksel verilerinin oluşturulmasında sorularımı bıkmadan cevaplayan Doç. Dr. Hikmet KÖSEOĞLU, Uzm. Dr. Ersin TURAL ve Uzm. Dr. Gizem İSSİN'e,

Eğitim hayatım boyunca beraber vakit geçirdiğimiz, beraber öğrendiğimiz, birçok şey paylaştığımız benden önce ve sonra gelen asistan arkadaşlarım Uzm. Dr. Ceren BOYACI, Uzm. Dr. Oğuzhan OKCU, Uzm. Dr. Ezgi HACIHASANOĞLU, Uzm. Dr. Yasemin ÇAKIR, Uzm. Dr. Buket Bambul SIĞIRCI, Uzm. Dr. GAMZE USUL, Dr. Begüm YENİ, Dr. Hatice DİNÇER, Dr. Beste NOYAN, Dr. Miray YILDIZ'a,

Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenen çalışmamız için, çalışmamın yürütülmesinde büyük destek sağlayan tüm SBÜ BAP Koordinatörlüğü üyelerine,

Her zaman yanımda olan, beni tüm imkanlarıyla destekleyen, bugünlere gelmemde çok büyük rolü olan annem Doç. Dr. Füsun SARAÇ, canım kız kardeşim Elif Tuba ŞAVLI ve babam Şeref ŞAVLI'ya,

Ailemin yeni ve değerli üyeleri Muzaffer BÖLME, Ayşe BÖLME ve Gözde ERDOĞAN'a,

Üniversite eğitimimizde yollarımızın kesiştiği, asistanlık dönemi ve öncesinde her türlü zorluğa beraber göğüs gerdiğimiz, tez yazım aşamasında olduğu gibi her anımda tüm sevgisiyle yanımda olan, bana tüm kalbiyle güvenen, desteğini benden esirgemeyen, hayat arkadaşım biricik eşim Dr. Tuğçe BÖLME ŞAVLI'ya,  
sonsuz teşekkür ederim.

## KISALTMALAR

**AJCC:** American Joint Committee on Cancer

**BHBHK:** Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom

**BHK:** Böbrek hücreli karsinom

**BK:** Böbrek karsinomu

**c-DNA:** complementary DNA

**CK:** Sitokeratin

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**H&E:** Hematoksilen & Eozin

**HIF(s):** Hypoxia-Inducible Factor(s)

**ISUP:** International Society of Urological Pathology

**KBHK:** Kromofob böbrek hücreli karsinom

**MiRNA:** MikroRNA

**mRNA:** Messenger ribonükleik asit

**PBHK:** Papiller böbrek hücreli karsinom

**PCR:** Polymerase chain reaction

**qRT-PCR:** quantitative Real Time- polymerase chain reaction

**RNA:** Ribonükleik asit

**VHL:** Von Hippel-Lindau

**WHO:** World Health Organization



## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 1:</b> World Health Organization (WHO) / International Society of Urological Pathology (ISUP) derecelendirme sistemi .....	5
<b>Tablo 2:</b> AJCC sistemi, Böbrek karsinomlarının patolojik TNM evrelemesi (8.baskı) .....	5
<b>Tablo 3:</b> AJCC sistemi, Böbrek karsinomlarının klinik evrelemesi (8.baskı).....	6
<b>Tablo 4:</b> Dünya Sağlık Örgütü (2016) böbrek tümörlerinin sınıflandırılması .....	7
<b>Tablo 5:</b> 15 µl'lik revers transkripsiyon reaksiyonu için hazırlanan revers transkripsiyon master miks içeriği.....	33
<b>Tablo 6:</b> Revers Transkripsiyon için süre-sıcaklık programı .....	34
<b>Tablo 7:</b> 20 µl'lik qRT-PCR reaksiyonu için kullanılacak solüsyon miktarları.....	35
<b>Tablo 8:</b> 7500 RT-PCR cihazı miRNA qRT-PCR için süre-sıcaklık programı .....	36
<b>Tablo 9:</b> Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom ve papiller böbrek hücreli karsinomlarda vakaların WHO/ ISUP derecelerine ve patolojik evrelere göre dağılımları .....	42
<b>Tablo 10:</b> Sağlıklı böbrek dokusuna göre histolojik alt tiplerde miRNA-21 ekspresyon durumları.....	45
<b>Tablo 11:</b> Sağlıklı böbrek dokusuna göre histolojik alt tiplerde miRNA-210 ekspresyon durumları.....	45
<b>Tablo 12:</b> Histolojik alt tiplere göre miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon farklarının anlamlılığı analizi (ANOVA).....	47
<b>Tablo 13:</b> Post Hoc Çoklu Karşılaştırma, Tukey's HSD .....	48
<b>Tablo 14:</b> Primer- metastatik tümör dokusu arasında miRNA-21 ve miRNA-210 anlamlılığı.....	49
<b>Tablo 15:</b> Metastaz yapmayan BHBHK ile metastataz yapan BHBHK olgularına ait primer dokular arasında miRNA-21 ve miRNA-210 anlamlılığı.....	49
<b>Tablo 16:</b> miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri için genel sağkalım analizleri .....	53

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1:</b> miRNA biyogenezi ve mRNA'nın posttranskripsiyonel olarak düzenlenmesi .....	20
<b>Şekil 2:</b> miRNA-21'in karsinogenez yollarına katılımı .....	23
<b>Şekil 3:</b> H&E boyalı kesitlerde tümörlü ve sağlıklı böbrek alanlarının işaretlenmesi .....	28
<b>Şekil 4:</b> Deparafinizasyon akış şeması .....	30
<b>Şekil 5:</b> RNA izolasyonu akış şeması.....	31
<b>Şekil 6:</b> RNA konsantrasyonunun belirlenmesi.....	32
<b>Şekil 7:</b> RT-cDNA çalışma şablonu örneği .....	34
<b>Şekil 8:</b> miRNA çalışma şablonu örneği .....	36
<b>Şekil 9:</b> Real time PCR sonrası örneklerdeki miRNA ekspresyonları ve PCR örneklerinin 96 kuyuluk pleytlerdeki yerleşimleri .....	38
<b>Şekil 10:</b> Histolojik tiplerin dağılımı.....	40
<b>Şekil 11:</b> WHO/ ISUP derecelerinin berrak hücreli böbrek hücreli karsinom (BHBHK) ve papiller böbrek hücreli karsinom (PBHK) vakalarındaki dağılımı .....	40
<b>Şekil 12:</b> Çalışma grubundaki vakaların patolojik evrelerinin yüzdelik dilime göre dağılımı .....	41
<b>Şekil 13:</b> Histolojik tiplere göre miRNA-21 ekspresyonlarının kat artışları .....	43
<b>Şekil 14:</b> Histolojik tiplere göre miRNA-210 ekspresyonlarının kat artışları .....	43
<b>Şekil 15:</b> Metastatik odaklardaki miRNA-21 ekspresyonlarının kat artışları.....	44
<b>Şekil 16:</b> Metastatik odaklardaki miRNA-210 ekspresyonlarının kat artışları.....	44
<b>Şekil 17:</b> Histolojik alt tiplerde log <sub>2</sub> dönüşümü sonrası miRNA-21 dağılımları .....	46
<b>Şekil 18:</b> Histolojik alt tiplerde log <sub>2</sub> dönüşümü sonrası miRNA-210 dağılımları.....	47
<b>Şekil 19:</b> BHBHK ile KBHK ayırımında miRNA-21 ve miRNA-210 için ROC eğrileri .....	50
<b>Şekil 20:</b> PBHK ile KBHK ayırımında miRNA-21 ve miRNA-210 için ROC eğrileri .....	51
<b>Şekil 21:</b> BHBHK ile PBHK ayırımında miRNA-21 ve miRNA-210 için ROC eğrileri .....	52
<b>Şekil 22:</b> Metastaz ile primer BK ayırımında miRNA-21 ve miRNA-210 için ROC eğrileri .....	53

# BÖBREK HÜCRELİ KARSİNOM VE BÖBREK HÜCRELİ KARSİNOM METASTAZLARINDA MİKRORNA-21 VE MİKRORNA-210 EKSPRESYONUNUN HİSTOLOJİK TÜMÖR TİPİ VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ

## ÖZET

**Amaç:** Böbrek hücreli karsinom (BHK) yetişkinlerde böbrek tümörlerinin %90'ını oluşturan en sık böbrek tümörüdür. Berrak hücreli BHK (BHBHK) en sık ve agresif BHK alt tipi olup vakaların %60-70'ini oluşturur. BHBHK hastalarının yaklaşık %20-30'unda tanı anında metastaz saptanır. Küratif cerrahi tedavi sonrası takiplerde ise geri kalan %30 hastada metastaz saptanır. Kromofob BHK (KBHK) ve Papiller BHK (PBHK) diğer sık tanı konulan BHK alt tipleridir. Bu alt tipler arasında zaman zaman immünohistokimyasal ve histomorfolojik özelliklerin örtüşmesi nedeniyle ayırıcı tanı yapmak oldukça zorlaşmaktadır. Ayırıcı tanı konusunda yaşanan sorunlar nedeniyle de prognoz tayini ve tedavi protokollerinin seçimi eksik veya yanlış olabilmektedir.

MikroRNA'lar yaklaşık 20 nükleotitten oluşan, tek zincirli, protein kodlamayan, küçük RNA gruplarıdır. Hücre çoğalması ve farklılaşması, apoptozis, metabolizma ve angiogenez gibi çok sayıda biyolojik olayda rol almaktadırlar. Bu görevlerinin yanı sıra kanser gelişiminde, doku invazyonunda ve metastaz gibi olaylarda da rolleri gösterilmiştir.

Çalışmamızda primer BHBHK, PBHK ve KBHK olguları yanı sıra metastatik BHBHK olgularındaki mikroRNA-21 (miRNA-21) ve mikroRNA-210 (miRNA-210) ekspresyon profillerini belirlemeyi hedefledik. Bu şekilde ayırıcı tanı, tedavi protokolü ve prognoz belirleme konularında literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Kliniğimizde 2012-2018 yılları arasında tanı alan 35 BHBHK, 11 KBHK ve 9 PBHK olgusu retrospektif olarak tekrar değerlendirildi. Uygun ve yeterli tümör ya da sağlıklı böbrek dokusu içermeyen olgular çalışma dışı bırakıldı. Ek olarak 9 BHBHK olgusunun metastatik dokularından alınan örnekler çalışmamıza dahil edildi.

Olguların tümör ve sağlıklı böbrek dokusu içeren parafin bloklarından qRT-PCR yöntemi ile miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon profillerini belirlemek üzere

dokular elde edildi. Hedef miRNA düzeyinin sağlıklı doku ile karşılaştırarak hesaplanmasına verilen ad olan *fold change*, tümör ve metastaz dokularında  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ile hesaplandı. Hesaplanan değerlerin orantısal veri olması nedeniyle logaritmik dönüşüm uygulandı. İstatistiksel analiz için dönüşüm uygulanmış veriler kullanıldı.

**Bulgular:** miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon profilleri histolojik alt tipler arasında anlamlı olarak farklı saptanmıştır. miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyonları ile hastaların yaşları, cinsiyetleri, WHO/ ISUP dereceleri, TNM evreleri ve lenfovasküler invazyon durumları arasında anlamlı fark saptanmadı. miRNA-21 ekspresyon profillerine göre BHBHK- KBHK ve KBHK-PBHK arasında ayırım yapmak mümkünken, BHBHK-PBHK arasında ayırım yapılamamaktadır. miRNA-210 ekspresyon profillerine göre ise BHBHK-KBHK, KBHK-PBHK ve BHBHK-PBHK arasında ayırım yapmak mümkündür. Metastatik odaklardaki miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri ile primer tümörlerin miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı. Metastatik BHBHK'lerdeki tümör dokusu ile metastaz yapmayan BHBHK'lerin primer tümörleri arasında miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyonları arasında anlamlı fark saptanmadı. Histolojik alt tipten bağımsız olarak miRNA-210 ekspresyon düzeyleri ile metastaz yapabilme olasılığı öngörülebildi. Ayrıca histolojik alt tipten bağımsız olarak miRNA-210 ekspresyon seviyeleri arttıkça genel sağkalım oranında azalma izlendi. miRNA-21 ekspresyonu ile genel sağkalım ve metastaz olasılığı arasında anlamlı fark saptanmadı.

**Sonuç:** Böbrek tümörlerinde miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyonları farklılık gösterir. Ekspresyon düzeylerindeki farklılık histolojik alt tipler arasında ayırıcı tanı yapmak için kullanılabilir. Tedavi olarak miRNA ekspresyon düzeylerinin artırılması veya azaltılması ile hastaların sağkalım sürelerinin uzaması sağlanabilir. Son olarak ekspresyon düzeyleri metastaz yapabilecek hastaları öngörmek açısından fayda sağlayabilir. Ekspresyon düzeylerinin yakından takibiyle olası metastatik süreçler ve agresif seyir engellenebilir.

Anahtar kelimeler: Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom, kromofob böbrek hücreli karsinom, papiller böbrek hücreli karsinom, miRNA, miRNA-21, miRNA-210

**THE RELATIONSHIP OF MICRORNA-21 AND MICRORNA-210  
EXPRESSION TO HISTOLOGIC TUMOR TYPE AND  
PROGNOSIS IN RENAL CELL CARCINOMA AND RENAL  
CELL CARCINOMA METASTASES**

**ABSTRACT**

**Aim:** Renal cell carcinoma (RCC) is the most common kidney tumor that constitutes 90% of kidney tumors in adults. Clear cell RCC (ccRCC) is the most common and aggressive subtype of RCC and constitutes 60-70% of cases. Approximately 20-30% of ccRCC patients have metastases at the time of diagnosis. Metastasis is detected in the remaining 30% during the follow-ups after curative surgical treatment. Chromophobe RCC (CRCC) and Papillary RCC (PRCC) are other frequently diagnosed RCC subtypes. It is difficult to make differential diagnosis among these subtypes from time to time due to the overlapping of immunohistochemical and histomorphological features. Due to the problems encountered in differential diagnosis, prognosis and the selection of treatment protocols can be incomplete or incorrect.

MicroRNAs are single-chain, non-coding, small RNA groups consisting of approximately 20 nucleotides. They play a role in many biological events such as cell proliferation and differentiation, apoptosis, metabolism and angiogenesis. In addition, it has been shown that they play a role in cancer development, tissue invasion and metastasis.

In our study, we aimed to determine the microRNA-21 (miRNA-21) and microRNA-210 (miRNA-210) expression profiles of ccRCC, PRCC and CRCC cases. In this way, we aimed to contribute to the literature on differential diagnosis, treatment protocol and prognosis determination.

**Materials and methods:** 35 ccRCC, 11 CRCC and 9 PRCC cases, which were diagnosed in our clinic between 2012-2018, were re-evaluated retrospectively. Patients who did not have suitable and adequate tumor or healthy kidney tissue were excluded from the study. In addition, samples taken from the metastatic tissues of 9 ccRCC cases were included in our study.

**Results:** The expression profiles miRNA-21 and miRNA-210 differed significantly between histological subtypes. There was no significant difference between miRNA-21 or miRNA-210 expressions and patients' ages, genders, WHO/ISUP grades, TNM stages, and lymphovascular invasion status. According to miRNA-21 expression profiles, it is possible to distinguish between ccRCC-CRCC and CRCC-PRCC, while ccRCC-PRCC cannot be distinguished. According to miRNA-210 expression profiles, it is possible to distinguish between ccRCC-CRCC, CRCC-PRCC and ccRCC-PRCC. There was no significant difference between miRNA-21 and miRNA-210 expressions of metastatic foci and miRNA-21 and miRNA-210 expressions of primary tumors. No significant difference was found between miRNA-21 and miRNA-210 expressions between primary tumors of metastatic ccRCCs and non-metastasized ccRCCs. Regardless of the histological subtype, the possibility of metastasis could be predicted with miRNA-210 expression levels. In addition, the overall survival rate was decreasing as miRNA-210 expression levels increased regardless of the histological subtype. There was no significant difference between miRNA-21 expression and overall survival time and possibility of metastasis.

**Conclusion:** Expressions of miRNA-21 and miRNA-210 are different in kidney tumors. The difference in expression levels can be used to make differential diagnosis between histological subtypes. With the development of treatments that increase or decrease miRNA expression levels, patients' survival can be prolonged. Finally, since expression levels can be used to predict patients who may metastasize, they can be used to closely monitor these patients and prevent possible metastatic processes and aggressive behaviour.

Key words: Chromophobe renal cell carcinoma, clear cell renal cell carcinoma, papillary renal cell carcinoma, miRNA, miRNA-21, miRNA-21

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Böbrek karsinomu (BK) birçok ülkede farklı sosyoekonomik düzeylerde sıklığı ve öldürücülüğü artmakta olan kanserler arasındadır. 2012 yılında dünya çapında toplam 318.000 böbrek karsinomu vakası bildirilmiştir (1).

Böbrek hücreli karsinom (BHK) tübül epiteli kaynaklı, erişkinlerdeki en sık böbrek tümörüdür ve böbrek tümörlerinin %90'ını oluşturur. Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom (BHBHK) en agresif ve en sık görülen alt tip olmakla birlikte vakaların %60-70'ini oluşturmaktadır. Kromofob böbrek hücreli karsinom (KBHK), papiller böbrek hücreli karsinom (PBHK) ve onkositomlar da diğer sık tanı konulan böbrek tümörü alt tipleridir (2). Yaklaşık %20-30 hastada tanı sırasında metastatik hastalık saptanırken, küratif cerrahi yapılan diğer %30 hastada ise takip sırasında metastaz saptanmaktadır (3).

MikroRNA (miRNA)'lar yaklaşık 20-22 nükleotitten oluşan, küçük, protein kodlamayan, tek zincirli RNA gruplarıdır. miRNA'lar RNA düzeyinde, epigenetik olarak insan genlerinin yaklaşık %30'unu etkileyerek biyolojik olayları düzenlemektedir. Ayrıca hücre çoğalması ve diferansiyasyonu, hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, metabolizma, angiogenez, gelişim ve bağışıklık gibi çok sayıda biyolojik olay yanı sıra birçok kanser gelişimi, doku invazyonu, progresyon ve metastazda önemli rol oynamaktadır (4).

MikroRNA'lar değişik biyolojik fonksiyonlara sahip yüzlerce messenger RNA (mRNA)'yı hedef alabildikleri için kanserde hem hücre ölümünü hem de hücrelerin hayatta kalmasını sağlayabilir. Bu durum miRNA'ların hem onkogen hem de tümör süpresör olarak görev yapabilmeleri ile açıklanmaktadır (5).

MikroRNA'ların biyolojik olaylardaki önemi yanı sıra karsinogenezdeki rollerinin ortaya çıkması yeni araştırmaları beraberinde getirmiştir. Birçok tümör tipinde doku örneklerinde, kan ve vücut sıvılarında miRNA ifadelerindeki değişim ilgi çekmiştir (6). Hastalıkların tanısı, tümör sınıflaması, hastaların operasyon sonrası tedavi takipleri ve prognoz belirlemede önemli birer biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri ortaya çıkmıştır. Bu gelişmelerin üzerine, tedavi sürecinde oluşabilecek ilaç direnciyle ilgili olabilecekleri ve hastalıklarla ilişkili miRNA'ları hedef alan tedavi ajanlarının da geliştirilebileceği gündeme gelmiştir. Tüm bu

düşünceler miRNA'ların sadece moleküler bir biyobelirteç olmaktan çıkıp rutin pratiğimizde de kullanılabileceğini düşündürmektedir. Tümörögenizde görevli miRNA'ları hedef alan tedavilerde (Küçük Molekül İnhibitörler) onkojenik özellik gösteren miRNA'ların baskılanması, tümör süpresör özellik gösteren miRNA'ların ise aktive edilmesi tedavi hedefini oluşturmaktadır (7). Bu amaç doğrultusunda hastalıklar ile ilişkili miRNA profillerinin açığa çıkarılması, kişiselleştirilmiş hedefe yönelik tedavilerin önemli bir komponenti haline gelme yolundadır.

Böbrek hücreli karsinomda kullanılan güncel prognoz belirleme sistemleri klinikopatolojik parametrelere dayanmakta fakat hastaların prognozunu tam olarak doğru şekilde belirleyememektedir. Moleküler yöntemler kullanılması daha kötü prognoz gösterecek hastaların belirlenerek, daha agresif ve/veya hedefe yönelik tedavilerden fayda görebilecek hasta popülasyonunun seçilmesini sağlayabilir (8). Son çalışmalar, miRNA'ların BK'lerde potansiyel birer prognostik biyobelirteç olabileceğini ve tedavi kararlarına yön verebileceğini bildirmektedir (9-11).

Çalışmamızda, berrak hücreli (BHBHK), papiller (PBHK) ve kromofob (KBHK) gibi farklı histolojik alt tiplerdeki BHK'lerde ve BHBHK metastazlarında miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri bakımından farkları ortaya koymak ve bu farkın klinik parametreler, tanı ve prognoz açısından anlamlılığını araştırmayı amaçladık.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. BÖBREK HÜCRELİ TÜMÖRLER

#### 2.1.1. Epidemiyoloji

Böbrek karsinomu tüm dünyada 2012 yılı verilerine göre erkekler arasında en sık 9'uncu, kadınlar arasında ise en sık 14'üncü kanser olarak bildirilmektedir. Erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 2 kat daha sık izlenirken, çocuklarda nadirdir. Tüm dünyada kanser nedenli ölümler arasında ise 16. en sık sebep olarak belirtilmektedir. Bildirilen kanserlerin yaklaşık %70'i gelişmiş ülkelerde olmasına rağmen öldürücülük oranı (Ölüm oranı/ yakalanma oranı) gelişmiş ülkelerde 0,4; gelişmemiş ülkelerde ise 0,5'tir (1).

Türkiye'de ise Sağlık Bakanlığı'nın 2015 yılında yaptığı kanser istatistiklerine göre tüm yaş gruplarında erkeklerde en sık 7'nci sırada yer alırken, kadınlarda ilk 10 içerisinde yer almamaktadır (12).

#### 2.1.2. Etiyoloji

**2.1.2.1. Obezite:** Kilolu olmak özellikle obezite hem kadınlarda hem de erkeklerde BK için risk faktörüdür (13). Amerika Birleşik Devletlerinde ve Avrupa ülkelerinde tüm BK vakalarının %40'ında şişmanlık ve obezite ile ilişki saptanmıştır. Böbrek karsinogenezinde obezitenin etki mekanizması belli olmamakla birlikte endokrin bozukluklar ile birlikte etki ettiği düşünülmektedir (14, 15).

**2.1.2.2. Tütün Kullanımı:** Devamlı tütün kullanımının hiç tütün kullanımı olmayanlara göre BK riskini arttırdığı gösterilmiştir (16, 17). Ayrıca günde içilen sigara sayısı da doz bağımlı olarak riski artırır. Tütün kullanımı bırakıldıktan sonraki 5 yıl süresince risk azalır (1). Erkeklerde tüm BK'lerin yaklaşık %20-30'undan, kadınlarda ise %10-20'sinden sorumlu tutulur (18).

**2.1.2.3. Hipertansiyon:** Hipertansiyon ve hipertansiyon tedavisi BK riski ile ilişkilendirilmiştir. Diüretiklerin de dahil olduğu hipertansif ilaçların kullanımı artmış risk ile ilişkilidir (19).

**2.1.2.4. Kazanılmış Kistik Böbrek Hastalığı:** Kazanılmış kistik böbrek hastalığı genellikle son dönem böbrek yetmezliği nedeniyle uzun süre hemodiyaliz tedavisi alan hastalarda gelişir. BK gelişme sıklığı son dönem böbrek yetmezliğinde belirgin olarak (%3-7) yüksektir (20). PBHK'nin son dönem böbrek yetmezliğinde en sık görülen alt tip olduğuna inanılmaktaydı. Günümüzde kazanılmış kistik böbrek hastalığı ile ilişkili böbrek karsinomu ayrı bir histolojik alt tip olarak düşünülse de tüm diğer BK alt tiplerinin kistik ya da kistik olmayan son dönem böbrek yetmezliği zemininden gelişebildiği düşünülmektedir (1).

**2.1.2.5. Mesleki Maruziyet:** Mesleki maruziyet (Trikloroetilen) BHBHK riskini arttırmaktadır (21).

### **2.1.3. Genetik Yatkınlık**

Çoğu BK sporadik olmasına rağmen %2-4 oranında ailesel BK görülür. Birçok genetik hastalık BK ile ilişkilendirilmektedir (22). BK tanılı birinci derece akrabaya sahip kişilerde BK gelişme riski yaklaşık olarak iki kat artmıştır (1).

### **2.1.4. Klinik Belirti ve Bulgular**

Böbrek karsinomları çok farklı klinik belirti ve bulgu oluşturabilen tümörlerdir. Klasik olarak yan ağrısı, renal kitle ve makroskopik hematüri triadı izlense de erken tanı için değerleri azdır. Hastaların %40'ında tanı sırasında genitoüriner belirtiler mevcut değildir (23). Hastaların %15'inden azında ise klasik triad izlenir (24).

### **2.1.5. Derecelendirme**

Derecelendirme için en sık kullanılan yöntem Fuhrmann derecelendirme sistemi olmasına rağmen çeşitli dezavantajları nedeniyle 2013 yılında WHO/International Society of Urological Pathology (ISUP) derecelendirme sisteminin kullanılması önerilmiştir (Tablo 1) (25-27). Bu yeni derecelendirme sistemi BHBHK ve PBHK'lerde prognostik belirteç olarak onaylanmıştır (1).

Tablo 1: WHO/ ISUP derecelendirme sistemi

Derece	Tanım
Derece 1	Nükleol x400 büyütmede yok ya da kolayca fark edilmeyen boyutta ve bazofilik.
Derece 2	Nükleol x400 büyütmede belirgin ve eozinofilik ancak x100 büyütmede görülebilir fakat belirgin değil.
Derece 3	Nükleol x100 büyütmede belirgin ve eozinofilik.
Derece 4	Belirgin nükleer pleomorfizm, tümör dev hücresi varlığı, ve/veya rabdoid ve/veya sarkomatoid diferansiyasyon varlığı.

### 2.1.6. Patolojik TNM Evrelemesi

Cerrahi materyal, böbrek sinüs yağ dokusu veya gevşek bağ dokusu invazyonu ve böbrek sinüsü içinde endotel ile döşeli büyük damar invazyonu açısından dikkatlice incelenmelidir. BK'lerin patolojik TNM evrelemesinde AJCC (American Joint Committee on Cancer) sistemi kullanılmaktadır (Tablo 2)(28).

Tablo 2: AJCC sistemi, Böbrek karsinomlarının patolojik TNM evrelemesi (8.baskı)

T evresi	Tanım
<b>Tx</b>	<b>Primer tümör değerlendirilemedi.</b>
<b>T0</b>	<b>Primer tümöre dair kanıt bulunamadı.</b>
<b>T1</b>	<b>Tümör en büyük boyutunda <math>\leq 7</math> cm ve böbrekte sınırlı.</b>
<i>T1a</i>	Tümör $\leq 4$ cm
<i>T1b</i>	Tümör $> 4$ cm fakat $\leq 7$ cm
<b>T2</b>	<b>Tümör en büyük boyutunda <math>&gt; 7</math>cm ve böbrekte sınırlı.</b>
<i>T2a</i>	Tümör $>7$ cm fakat $\leq 10$ cm
<i>T2b</i>	Tümör $> 10$ cm
<b>T3</b>	<b>Tümör ana ven veya perinefrik dokulara uzanıyor fakat ipsilateral adrenal beze ve Gerota fasyasına uzanmıyor.</b>

<i>T3a</i>	Tümör renal ven veya onun segmental (kas içeren) dallarına uzanıyor veya tümör perirenal ve/veya sinüs yağ dokusunu Gerota fasyasını geçmeyecek şekilde invaze ediyor.
<i>T3b</i>	Tümör diyafram altı seviyede vena cava içerisine uzanıyor.
<i>T3c</i>	Tümör diyafram üzeri seviyede vena cava içerisine uzanıyor veya vena cava duvarını invaze ediyor.
<b>T4</b>	<b>Tümör Gerota fasyası ötesini invaze ediyor (devamlılık gösteren ipsilateral adrenal bez içine olan uzanımlar dahil).</b>
<b>N evresi</b>	
<b>Nx</b>	<b>Bölgesel lenf nodu metastazı değerlendirilemedi.</b>
<b>N0</b>	<b>Bölgesel lenf nodu metastazı izlenmedi.</b>
<b>N1</b>	<b>Bölgesel lenf nodu metastazı mevcut.</b>
<b>M evresi</b>	
<b>M0</b>	<b>Uzak metastaz izlenmedi</b>
<b>M1</b>	<b>Uzak metastaz mevcut</b>

### 2.1.7. Klinik Evreleme

Primer BK'lerin klinik evrelemede AJCC (American Joint Committee on Cancer) sistemi kullanılmaktadır (Tablo3)(28).

Tablo 3: AJCC sistemi, Böbrek karsinomlarının klinik evrelemesi (8.baskı)

<b>Evre I</b>	T1	N0	M0
<b>Evre II</b>	T2	N0	M0
<b>Evre III</b>	T1-2	N1	M0
	T3	Herhangi N	M0
<b>Evre IV</b>	T4	Herhangi N	M0
	Herhangi T	Herhangi N	M1

### 2.1.8. Böbrek Tümörlerinin Sınıflandırılması

Dünya Sağlık Örgütü 2016 yılında böbrek tümörlerini aşağıdaki gibi sınıflandırmıştır (Tablo 4)(29).

Tablo 4: Dünya Sağlık Örgütü (2016) böbrek tümörlerinin sınıflandırılması

<b>Böbrek hücreli tümörler</b>
❖ Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom
❖ Düşük malignite potansiyelli multiloküler kistik renal neoplazi
❖ Papiller böbrek hücreli karsinom
❖ Herediter leiomyomatozis ve böbrek hücreli karsinom ilişkili böbrek hücreli karsinom
❖ Kromofob böbrek hücreli karsinom
❖ Toplayıcı duktus karsinomu
❖ Böbrek medüller karsinomu
❖ MiT ailesi translokasyonlu böbrek hücreli karsinom
❖ Süksinat dehidrogenaz eksikliği gösteren böbrek hücreli karsinom
❖ Müsinöz tübüler ve içsi hücreli karsinom
❖ Tübülökistik böbrek hücreli karsinom
❖ Edinsel kistik hastalık ilişkili böbrek hücreli karsinom
❖ Berrak hücreli papiller böbrek hücreli karsinom
❖ Böbrek hücreli karsinom, sınıflandırılmayan
❖ Papiller adenom
❖ Onkositom
<b>Metanefrik tümörler</b>
❖ Metanefrik adenom
❖ Metanefrik adenofibrom
❖ Metanefrik stromal tümör
<b>Çocuklarda görülen nefroblastik ve kistik tümörler</b>

- 
- ❖ Nefrojenik kalıntılar
  - ❖ Nefroblastom
  - ❖ Kistik parsiyel diferansiye nöroblastom
  - ❖ Pediatrik kistik nefroma

### **Mezenkimal tümörler**

#### **Çocuklarda görülen mezenkimal tümörler**

---

- ❖ Berrak hücreli sarkom
- ❖ Rabdoid tümör
- ❖ Konjenital mezoblastik nefrom
- ❖ İnfantil ossifiye böbrek tümörü

#### **Erişkinlerde görülen mezenkimal tümörler**

---

- ❖ Leiomyosarkom
- ❖ Anjiosarkom
- ❖ Rabdomyosarkom
- ❖ Osteosarkom
- ❖ Sinoviyal Sarkom
- ❖ Ewing Sarkomu
- ❖ Anjiomyolipom
- ❖ Epiteloid anjiomyolipom
- ❖ Leiomyom
- ❖ Hemanjiom
- ❖ Lenfanjiom
- ❖ Hemanjioblastom
- ❖ Jukstaklomerüler hücreli tümör
- ❖ Renomedüller interstisyel hücreli tümör
- ❖ Schwannom
- ❖ Soliter fibröz tümör

#### **Mikst epitelyal ve stromal tümör ailesi**

---

- ❖ Erişkin kistik nefroma
  - ❖ Mikst epitelyal ve stromal tümör
-

---

### Nöroendokrin tümörler

---

- ❖ İyi diferansiye nöroendokrin tümör
- ❖ Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
- ❖ Küçük hücreli nöroendokrin karsinom
- ❖ Paraganlioma

---

### Diğer tümörler

---

- ❖ Böbrek hematopoetik neoplazileri
- ❖ Germ hücreli tümörler

---

### Metastatik tümörler

---

**2.1.8.1. Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom:** Berrak ya da eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşan morfolojik olarak heterojen görünümde malign bir neoplazidir (30). Böbreğin proksimal tübül epitelinden köken aldığı bilinmektedir (31).

Böbrek kanserlerinin %65-70'ini oluşturur ve % 60-80 ultrason, bilgisayarlı tomografi ya da manyetik rezonans görüntüleme sırasında rastlantısal olarak bulunur (30). Yaşla birlikte görülme sıklığı artar ve en sık 6-7. dekatta, erkeklerde 2 kat daha sık olarak izlenir (2).

Klinik belirti görülen vakalarda en sık hematüri ve yan ağrısı bulunur. Kilo kaybı ve ateş ileri evrelerde görülür (30).

Metastazlarını sıklıkla hematojen yolla renal sinüs venleri, renal ven ve vena kava aracılığıyla akciğerlere yapar (32-34). Ayrıca merkezi sinir sistemi, baş-boyun bölgesi ve kemiklere de metastaz yapabilir (35). Hiler, kaval ve torasik lenf nodlarına ve buralardan da çeşitli bölgelere yayılabilir (36, 37).

Her iki böbrekte eşit oranda izlenebilen kortikal, solid tümörlerdir. Multifokalite ve/veya bilateralite olguların %5'den azında bildirilir. Multifokalite, bileteralite ve erken yaşta karsinom tanısı von Hippel-Lindau (VHL) sendromu gibi herediter kanser sendromları için tipiktir (38).

Tipik olarak böbrek kapsülünü iterek büyüyen, yoğun lipid içeriği nedeniyle altın sarısı olarak izlenen kitleler oluşturur. Sıklıkla keskin sınırlı ve psödokapsüllüdür. Kistik alanlar, nekroz ve hemoraji yaygındır (30).

Histolojik olarak çeşitli yapısal paternler sergileyebilse de, solid alveoler ve asiner patern en sık izlenenlerdir. Alveoler ve asiner yapılar genişleyerek mikrokistik ya da makrokistik patern oluşturabilir. Tanı için yardımcı olan tipik özelliklerinden biri tümör hücre kümelerini çevreyen düzenli ince duvarlı damarlardan oluşan bağ dokusudur.

Tümör hücreleri belirgin sitoplazmik membrana sahiptir. Sitoplazmalarında yoğun lipid ve glikojen içerirler. Rutin histolojik işlemler sırasında sitoplazmik lipid ve glikojenin kaybına bağlı olarak berrak/şeffaf görünümde izlenirler. Nekroz ve hemoraji alanları çevresinde ve bazı vakalarda özellikle yüksek dereceli tümörlerde granüler eozinofilik sitoplazma izlenebilir. Histolojik dereceye bağlı olarak nükleol küçük/büyük ya da belirsiz olabilir. Sarkomatoid ve rabdoid değişiklikler %5 kadar tümörde izlenebilir ve bu değişiklikler kötü prognoz ile ilişkilidir (39).

İmmünotipik olarak transkripsiyon faktörleri olan PAX8 ve PAX2 neredeyse tüm BHBHK'lerde nükleer olarak pozitifdir (40, 41). Karbondioksit transportunda ve pH düzenlenmesinde görevli enzim olan karbonik anhidraz, karbonik anhidraz IX (CA IX) antikoruna ile karakteristik olarak diffüz membranöz paternde BHBHK'lerin %75-100'ünde pozitifken, yüksek dereceli tümörlerde ekspresyon kaybı izlenebilir (42-44). BHBHK sitokeratin AE1/AE3, epitelyal membran antijen (EMA) ve CAM5.2 gibi epitelyal markerler ile pozitifdir. BHBHK sitokeratin 7 (CK7) ekspresyonu nadirdir. Yüksek dereceli tümörlerde ve kistik komponenti bulunan tümörlerde izole, az sayıda hücre veya hücre kümesinde sınırlı olarak pozitifdir (44-46). Proksimal tübül belirteci olan CD10 BHBHK'lerde membranöz olarak pozitifdir (47). Vimentin ise yüksek dereceli alanlarda daha yoğun olmak üzere vimentin BHBHK'lerde pozitifdir (48). Yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin (YMACK), sitokeratin 20 (CK20), *mucin 1 cell surface associated* (MUC1), parvalbumin,  $\alpha$ -metilaçil-CoA rasemaz (AMACR), böbrek spesifik cadherin ve CD117 çoğu vakada negatiftir (49-52).

Von Hippel Lindau tümör süpresör geni (3p25-26) değişiklikleri VHL kanser sendromu yanı sıra sporadik BHBHK'lerde de sıklıkla izlenir (53). BHBHK'de bu



gen tipik olarak allelik delesyon, mutasyon ya da daha az sıklıkla hipermetilasyon ile inaktif duruma gelir (53, 54). VHL protein fonksiyon bozuklukları tümör başlangıcı, ilerlemesi ve metastazlarıyla ilişkilidir (55).

3p14.2 lokalizasyonunda bulunan diğer bir tümör süpresör gen olan FHIT geni de inaktive olarak BHBHK gelişimine neden olabilir (56). Ayrıca 3p lokalizasyonunda kromatin yeniden düzenlenmesinde görevli olan BAP1 gen mutasyonları da izlenir. Bu durumda tümörler tipik olarak yüksek dereceli ve kötü sağkalım ile ilişkilidir (57).

Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom tipik olarak VHL sendromunun manifestasyonuyken, Cowden sendromu, Birt-Hogg-Dube (BHD) sendromu, Tuberoskleroz ve Süksinat Dehidrogenaz eksikliği ile ilişkili olan BHK'ler de mevcuttur (58-60).

Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom için en doğru prognoz göstergesi patolojik evredir (61, 62). Evresi aynı olan tümörler arasında histolojik derece, nekroz varlığı, sarkomatoid ve/veya rabdoid diferansiyasyon bulunması ek prognostik bilgi sağlar (27). Tümör nekrozu varlığının bağımsız bir prognostik önemi bulunur (27, 63). Genel olarak toplam tümör hacminin %10'undan fazla tümör nekrozu varlığı daha kötü sağkalım ile ilişkilidir. TNM evre 1 ve evre 2 tümörler için ise sınır değeri toplam tümör hacminin %20'sidir (27, 63, 64). BHBHK için ortalama 5 yıllık sağkalım oranı %62 olmasına rağmen metastaz varlığında bu oran %10'lara kadar düşmektedir (65, 66).

**2.1.8.2. Papiller böbrek hücreli karsinom:** Böbreğin tübül epitelinden köken alan, genellikle iyi sınırlı, papiller ya da tübülöpapiller yapılanmaya sahip böbreğin en sık ikinci malign tümörüdür. BHBHK'ye benzer olarak 59-63 yaşları arasında siktir (67).

Belirli bir etiyoloji bulunmasa da skar dokusu içeren son dönem böbrek yetmezliği veya kazanılmış kistik hastalıklar ile daha sık birliktelik gösterir (68, 69). Çoğunlukla sporadik olmakla birlikte nadiren genetik ve herediter PBHK sendromları ile ilişkilidir (70).

Böbreğin korteksinde izlenir ve skar dokusu ile ilişkili olduğunda multipl olabilir. Multipl ve/veya bilateral olduğunda herediter sendromlar da akla gelmelidir (67).

Klinik özellikleri BHBHK ile benzer olmasına rağmen tipik klinik triad olan abdominal kitle, yan ağrısı ve hematüri sadece %5-10 hastada izlenir. Günümüzde %50 hastada semptom yoktur ve görüntüleme yöntemleri sırasında rastlantısal olarak saptanır (65, 71). Görüntülemelerde %30 oranında kalsifiye odak saptanır.

Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom ile aynı yolları izleyerek en sık akciğere metastaz yapar. Renal hilus lenf nodlarına lenfatik yayılım BHBHK'lerden daha sık olarak izlenir.

Makroskopik olarak genellikle iyi sınırlı ve psödokapsüllüdür. Kanamaya bağlı olarak ten renginden koyu kahverengine doğru değişen çeşitli renklerde izlenebilir. Tümör genellikle parçalanabilir yapıdadır ve büyük tümörler fibrozis, nekroz ve kistik dejenerasyon içerebilir (67).

Histolojik olarak köpüksü makrofajlar ve psammom cisimcikleri içeren ince fibrovasküler kordlara sahip papiller yapılar izlenir. Bazen kordlar ödem ya da hyalinize bağ dokusuyla genişlemiş olarak izlenebilir (65, 71). Bazı tümörler tübüler görünümde ya da papillaların sıkı dizilimlerine bağlı olarak solid görünümde olabilir (72). PBHK'lerin yaklaşık %5'inde sarkomatoid diferansiyasyon izlenir (73).

Papiller böbrek hücreli karsinom iki alt tipe ayrılır (73, 74). Tip 1 tek sıra halinde dizilen dar soluk sitoplazmalı hücrelerden oluşan papillalardan oluşur. Tip 2 ise nükleer psödostratifikasyonlu ve yüksek nükleolar dereceli, geniş eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşur (67). PBHK sıklıkla CK7, sitokeratin AE1/AE3, CAM 5.2, YMACK, EMA, AMACR, RCC antijeni, vimentin ve CD10 ile immünohistokimyasal reaksiyon verir (73-75). CK7 ekspresyonu tip 1 olgularda tip 2 olgulara göre daha siktir (50, 51, 74).

Kromozom 7 trizomisi ya da tetrazomisi, kromozom 17 trizomisi ve Y kromozomu kaybı PBHK'de karakteristiktir (67). Tip 1 ve tip 2 farklı genetik profillere sahiptir. Tip 1 tümörler 7p ve 17p kazancı, tip 2 tümörler ise 1p, 3p, 5q, 6, 8, 9p, 10, 11, 15, 18 ve 22'de heterozigotluk kaybı içerirler (76). PHBK genellikle sporadik olmasına rağmen, ailesel PBHK sendromu ve BHD sendromunda da

izlenebilir (77). Herediter PBHK'e sahip aile bireyleri MET geninde mutasyonlara sahiptir ve bu kişilerde multipl ve bilateral BK izlenebilir (78).

Papiller böbrek hücreli karsinom; BHBHK, toplayıcı duktus karsinomu (27) ve herediter leiomyomatozis ve böbrek hücreli karsinom ilişkili böbrek hücreli karsinoma göre daha iyi prognoza sahiptir (67). Tip 1 PBHK ise Tip 2 tümörlere göre daha iyi prognozludur. Sarkomatoid ve/veya rabdoid diferansiyasyon ve WHO/ISUP derece yüksekliği azalmış sağkalım ile ilişkilidir (27). 5 yıllık sağkalım oranları %49 ile %91 arasında değişir. Sağkalım; artmış nükleer derece ve evre, vasküler invazyon, köpüksü hücrelerin rölatif azlığı, artmış ki-67 proliferasyon indeksi gibi nedenlerle farklılıklar gösterebilir (79).

**2.1.8.3. Kromofob böbrek hücreli karsinom:** Belirgin hücre membranı, perinükleer halo, buruşuk çekirdek ve soluktan eozinofiliğe kadar değişen morfolojide sitoplazmaya sahip hücrelerle karakterize bir tümördür (80). Toplayıcı duktusun interkale hücrelerinden köken aldığı düşünülmektedir (81).

Tüm böbrek karsinomlarının %5-7'sini oluşturur (82). Sıklıkla sporadik izlenirken, nadir herediter formları da bulunur. En sık altıncı dekatta hafif erkek cinsiyet ağırlıklı olarak izlenir.

Ortalama 7 cm boyutunda, iyi sınırlı, kapsülsüz, ten renginden kahverengiye kadar değişen renklerde, böbreğe sınırlı tümörlerdir (82-84).

Tümör hücreleri tipik olarak inkomplet, genellikle hyalinize vasküler septalar ile birbirinden ayrılan solid tabakalar şeklinde yapılıdır. Küçük yuvalar, mikrokistik, trabeküler ve nadiren papiller ve tübüler alanlar izlenebilir. Bitki hücresi benzeri belirgin hücre membranına sahip soluk sitoplazmalı hücreler ve daha az oranda küçük eozinofilik granüler sitoplazmalı hücreler karakteristik olarak karışık halde izlenir. Genellikle binükleasyon ve perinükleer halolar (koilositik atipi) içeren, kuru üzüm şeklinde tabir edilen buruşuk görünümde, kaba kromatinli nükleuslar izlenir. Sarkomatoid değişiklik %2-8 oranında görülür (82). Tümörler sahip oldukları nükleer atipi nedeniyle histolojik olarak derecelendirilmemektedir (85). Özellikle BHD sendromu, onkositozis ve bazı sporadik vakalarda onkositomlar ile çok benzeyen histolojik görünüm oluşabilir (58, 86, 87).

Elektron mikroskobu ile incelendiğinde tümör hücrelerinin sitoplazmasında defektif mitokondri gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülen çok sayıda mikrovezikül gözlenir. Bu mikroveziküller özellikle soluk hücrelerde fazladır, mitokondriler ise eozinofilik hücrelerde daha yoğun bulunur. Hale koloidal demir ile bu mikroveziküllere uyan alanlarda sıklıkla diffüz sitoplazmik boyanma mevcuttur (88). İmmünohistokimyasal olarak CD117, parvalbümin ve böbrek spesifik kadherin ve CK7 ile sıklıkla diffüz pozitif boyanma görülür. Vimentin, CK20 ve AMACR ise her zaman negatiftir (89-93).

Genetik olarak incelendiğinde kromozom 1, 2, 6, 10, 13, 17 ve 21'de kayıp görülür (94).

Hastaların 5 yıllık sağ kalımı %78-100 arasındadır (63, 82, 83). Tümör evresi, sarkomatoid ve rabdoid değişiklikler, nekroz ve küçük damar invazyonu sağkalımı bağımsız olarak etkiler (82, 84).

**2.1.8.4. Düşük malignite potansiyelli multiloküler kistik böbrek hücreli neoplazi:** İnce septalarla birbirinden ayrılan çok sayıda kistten oluşan bir tümördür. Hücreler berrak sitoplazmalı, küçük nükleuslu düşük histolojik dereceli (WHO/ISUP derece 1 veya 2) BHBHK hücrelerine benzer niteliktedir.

Çok iyi prognozludur, rekürrens ya da metastaz bildirilmemiştir (27, 87, 95).

**2.1.8.5. Herediter leiomyomatozis ve böbrek hücreli karsinom ilişkili böbrek hücreli karsinom:** Karakteristik olarak Krebs döngüsü enzimlerinden olan Fumarat Hidrataz (FH) geninde mutasyon bulunan hastalarda, deri ve uterus yerleşimli çok sayıda leiomyom ve bunlara ek olarak agresif seyirli böbrek karsinomu birlikteliği izlenen herediter bir sendromdur (96-98).

Tümör tipik geniş eozinofilik sitoplazmalı, inklüzyon benzeri belirgin eozinofilik nükleol içeren, büyük nükleuslu hücreler ile karakterizedir. Papiller yapılardan zengin olmakla birlikte, tübüler, tübülökistik, solid ve mikst paternler de izlenebilir (99).

Bu sendromla ilişkili böbrek karsinomlarında erken dissemine hastalık bildirilmektedir. Diğer herediter böbrek karsinomlarının aksine kötü prognozludur. (100).

**2.1.8.6. Toplayıcı duktus karsinomu:** Bellini'nin toplayıcı duktuslarının esas hücrelerinden köken alan nadir malign epitelyal bir tümördür (101).

Lenf nodu, akciğer, karaciğer, kemik, adrenal bez ve beyin metastazlarının sıklığından dolayı %70'den fazla hasta tanı anında pT3 ya da daha ileri evrededir (102).

Tipik olarak desmoplastik stroma içinde çevre yapılara infiltre olan tübüler, tübülopapiller ya da tübülokistik tümörlerdir (103). Tümör hücrelerinin sitoplazması genellikle soluk eozinofilik ya da berrak özelliktedir. Tek belirgin nükleollü nükleuslar; iri, veziküler ve pleomorfik görünümündedir. (101). Tanı için; medulla tutulumu, belirgin tübüler morfoloji, desmoplastik stroma yanıt, yüksek dereceli sitolojik özellikler, infiltratif büyüme paterni ve diğer böbrek hücreli karsinom alt tipleri ya da ürotelyal karsinomun yokluğu gibi kriterler önerilmektedir (87).

Yaygın ve hızlı klinik seyir, tanı anında yüksek metastaz oranı ve tedavi yanıtında sınırlılığa bağlı kötü prognozlu tümörlerdir (104).

**2.1.8.7. Böbrek medüller karsinomu:** Orak hücreli hemoglobinopatiler ile ilişkili, böbrek medullası yerleşimli agresif bir tümördür (105). Literatürde yaklaşık 200 hasta tanımlanmış olup bunların büyük bir kısmı siyahi ve genç hastalardır (106).

Toplayıcı duktus karsinomu ile örtüşen yapısal ve sitolojik özellikleri mevcuttur. Bu tümörün ayırıcı özelliği adenoid kistik, retiküler ve mikrokistik görünümüdür. Miksoid stromal yanıt ile ilişkili nötrofillerden zengin inflamatuvar yanıt ve mikroabseler çoğu olguda izlenir (107). SMARCB1 (INI1) kaybı ve OCT3/4 ekspresyonu tanısal olarak yardımcıdır (108, 109).

Olguların büyük kısmında metastatik hastalık mevcuttur ve sağkalım aylarla sınırlıdır (110).

**2.1.8.8. MiT ailesi translokasyonlu böbrek hücreli karsinom:** MiT ailesi transkripsiyon faktörleri olan TFE3 ve TFEB genlerinin füzyonları ile karakterize morfolojik olarak benzer özellikler gösterebilen, nadir izlenen BHK'lerdir. Xp11 translokasyonu TFE3 geni ile ilişkilirken, t(6,11) ise TFEB geni ile ilişkilidir (111).

Çocukluk çağı BHK'lerinin %40'ını, erişkin çağı BHK'lerinin ise %1,6-4'ünü Xp11 translokasyonu bulunan tümörler oluşturmaktadır (112).

Xp11 translokasyonlu BHK'lerde çok sayıda psammom cisimciği ve epiteloïd berrak hücrelerin oluşturduğu papiller yapılar sıklıkla izlenmektedir. (113, 114). t(6,11) BHK'lerin en önemli ayırt edici özelliği ise çevresinde iri epiteloïd hücreler, merkezinde ise bazal membran materyali etrafında dizilen küçük hücrelerden oluşan yuva yapılarıdır (115).

Xp11 translokasyonlu BHK için güçlü nükleer TFE3 immünreaktivitesi (116), t(6,11) BHK için ise güçlü nükleer TFEB immünreaktivitesi izlenir (117).

Xp11 translokasyonlu BHK hastaları için sağkalım berrak hücreli BKH ile benzerken, Xp11 translokasyonlu BHK'ler daha yavaş seyirlidir (111).

**2.1.8.9. Süksinat dehidrogenaz eksikliği gösteren böbrek hücreli karsinom:** Süksinat dehidrogenaz (SDH) genlerinde, özellikle de SDHB geninde, germline mutasyonlar ile karakterize sıklıkla genç erişkin dönemde izlenen, malign nadir bir tümördür (118, 119). BHK, paraganglioma veya gastrointestinal stromal tümör bu kişilerde izlenebilir.

En önemli ayırıcı morfolojik özellik sitoplazmik vakuoller ya da tiftiksi soluk eozinofilik inklüzyonların bulunmasıdır. Bunlar fazla sayıda olduklarında köpüksü görünüme neden olabilir. Yüksek dereceli transformasyon ve sarkomatoid değişiklikler izlenebilir (118).

İmmünohistokimyasal olarak karsinom hücrelerinde SDHB kaybı tanı için gereklidir (120).

Büyük kısmı (%75) düşük dereceli, nekroz içermeyen, iyi prognozlu tümörlerdir (118, 119). Sarkomatoid patern, yüksek nükleer derece ve nekroz varlığında metastaz olasılığı artar. Bu özelliklerin bulunması prognozu kötüleştirir (118).

**2.1.8.10. Müsinöz tübüler ve işsi hücreli karsinom:** Miksoïd bir stroma içerisinde atipi içermeyen anastomozlaşan tübüler yapılar ve işsi hücrelerin iç içe geçmesiyle oluşan nadir bir tümördür (121).

Nükleuslar tipik olarak düşük dereceli (122, 123) olmasına rağmen yüksek dereceli nükleuslar ve sarkomatoid değişiklikler de izlenebilmektedir (124, 125).

Çoğu tümör yavaş seyirlidir fakat yüksek dereceli değişim gösterenlerde uzak metastaz ve ölümcül seyir izlenebilir (122, 124, 126).

**2.1.8.11. Tübülökistik böbrek hücreli karsinom:** Küçük- orta boy tübüller ve daha büyük kistlerden oluşan nadir kistik bir BHK'dir (127).

Tümörü oluşturan kistler; tek sıralı, basık, kübik/kolumnar veya kabara çivisi görünümüne sahip epitel ile döşelidir. Stroma fibrotiktir. Orta/iri boyutlu WHO/ISUP derece 3 nükleole sahip büyük düzensiz nükleuslu hücreler izlenir (128). Az diferansiye ve sarkomatoid alanlar içerebilir (129).

Genellikle yavaş seyirli olmakla birlikte nüks ve metastaz az sayıda vakada bildirilmiştir (128).

**2.1.8.12. Edinsel kistik hastalık ilişkili böbrek hücreli karsinom:** Son dönem böbrek yetmezliği bulunan ve özellikle uzun süreli hemodiyaliz gören hastalarda izlenen edinsel kistik hastalık zemininde en sık gelişen tümörlerdir (69, 130, 131).

Multifokalite %50'den fazla vakada, bilateralite ise %20'den fazla vakada izlenir. Aynı tümör içerisinde alveoler, tübüller, multikistik, papiller ve solid paternler ve bu paternlerin çeşitli kombinasyonları izlenebilir. İntra ya da intersitoplazmik boşlukların oluşturduğu kribriform/mikrokistik/elek benzeri yapılar en sık izlenen morfolojidir. Tümör hücreleri geniş eozinofilik sitoplazmalı ve belirgin nükleollüdür. Stromada kalsiyum oksalat kristalleri sıklıkla izlenir (69, 87).

Bu hastalar yakın takip edildiklerinden dolayı tümörler erken dönemde tanı alır. Bu durum muhtemel iyi prognozla ilişkilidir. Rabdoid ve sarkomatoid değişim olanlar metastaz yapabilir (69, 87, 132).

**2.1.8.13. Berrak hücreli papiller böbrek hücreli karsinom:** Sakin görünüşlü berrak hücrelerden oluşan tübül ve papilla yapılarından zengin yavaş gidişli nadir bir tümördür (69, 133).

Tübüler, papiller, asiner, kistik, kurdele benzeri ve solid paternler değişen oranlarda izlenebilir. Tümör, kübik ya da alçak kolumnar epitelyal hücrelerden oluşmaktadır. Tümör hücreleri belirgin olmayan nükleol içeren, bazal membrandan uzak yerleşimli lineer dizilim gösteren, uniform nükleuslara sahiptir. (133, 134). Vakalar genellikle WHO/ISUP derece 1 veya 2'dir (135).

Tümör hücreleri CK7 ile diffüz sitoplazmik/membranöz, CA IX ile ise karakteristik olarak kupa şeklinde membranöz pozitif immün reaktivite gösterirler (69, 133).

Şu ana kadar bildirilen vakalarda rekürrens ya da metastaz izlenmemiştir (87, 136).

**2.1.8.14. Böbrek hücreli karsinom, sınıflandırılmayan:** Ayrı bir tip olmayan, tanımlanmış alt gruplar içerisine dahil edilemeyen bir gruptur. Bu grubun içerisine, şu ana kadar tanımlanmış alt grupların kombinasyonu olan tümörler, müsin üretimi olanlar, tanımlanmamış epitel hücreleri içerenler, düşük ya da yüksek dereceli onkositik tümörler, saf sarkomatoid morfolojiye sahip olanlar ya da diğer sınıflandırılmayan böbrek tümörleri dahil edilebilir (137). Tanı verilmeden önce invaziv ürotelyal karsinom ve diğer bölgelerden metastaz olasılığı dışlanmalı, bunlara ek olarak böbrek kökenli olduğu kesinleştirilmelidir.

Sahip olduğumuz bilgi kısıtlı olmasına rağmen, prognoz sıklıkla tanı anındaki nükleer derece ve evre ile ilişkilidir (138).

## **2.2. MİKORNA**

### **2.2.1. Giriş**

MikroRNA'lar bitkilerden insanlara kadar değişen çok sayıda organizmada transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesinde rol alan, küçük, kodlayıcı olmayan RNA'lardır (139, 140). Bu RNA'lar düzenleyici özelliklerini ya hedef mRNA'yı parçalayarak ya da translasyonlarını baskılayarak gösterir (140-143).

İnsan genomunun yaklaşık %1'i miRNA'lara ayrılmıştır ve bu miRNA'lar insan vücudundaki tüm mRNA'ların yaklaşık üçte birini düzenler. miRNA'lar, ortalama 20-22 nükleotit gibi kısa uzunlukta olmalarıyla diğer RNA türlerinden



farklılık gösterir. Buna ek olarak miRNA'lar genomdaki diğer genlerden farklı bölgelerden kaynaklanır ve benzer organizmalarda yüksek oranda korunan bölümlere sahiptir (139-144). 1993 yılında ilk miRNA'nın keşfedilmesinden bu yana (145), miRNA kayıtlarında binlerce miRNA geni belgelenmiştir (146).

MikroRNA'ların işlevlerini değerlendirmek zor olsa da, gelişimsel zamanlama, doku büyümesi ve şekillenmesi, tümör baskılanması, hücre diferansiyasyonu ve apoptoz gibi olayların kontrolünü içeren önemli roller ortaya çıkmaktadır (147).

### 2.2.2. MikroRNA Biyogenezi

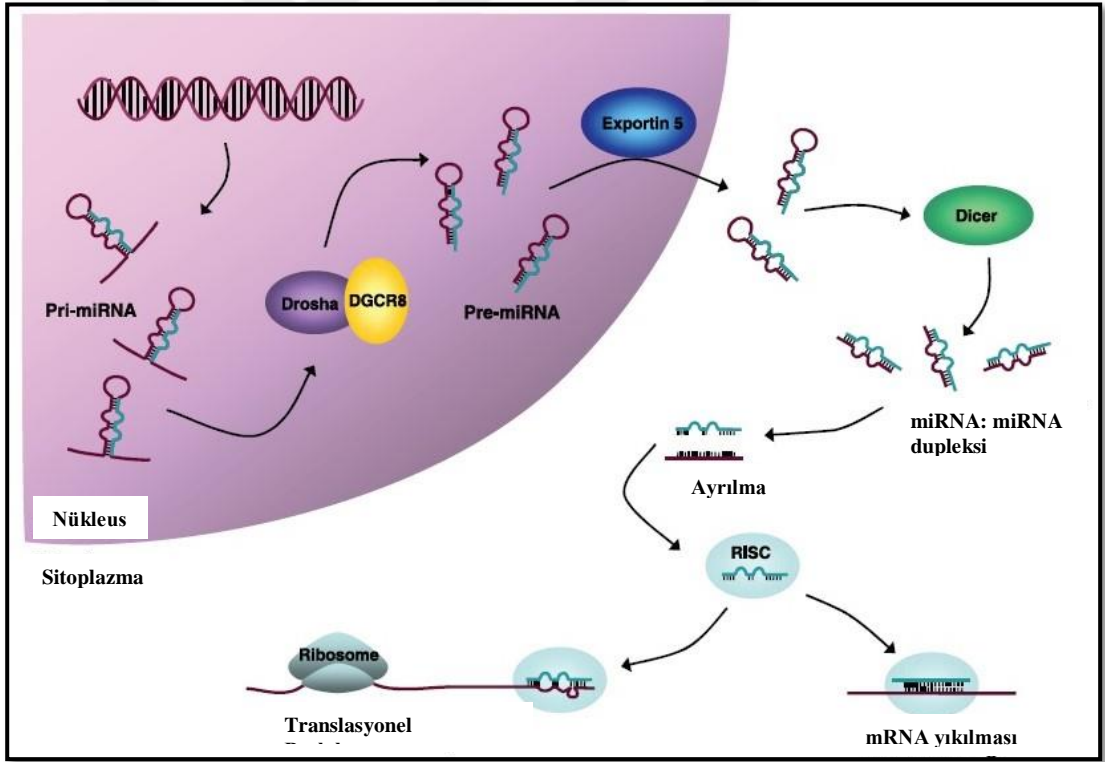
MikroRNA genlerinin genom üzerindeki yerleşim yerleri değişkendir. Bazı genler tek başına bulunurken bir kısmı da diğer genlerle gruplar oluşturmuş olarak bulunur. Bunun anlamı miRNA'lar kendi promoterleri aracılığıyla transkripsiyona uğrayabilir ya da diğer genlerin transkripsiyon ürünlerinden elde edilebilir (147).

MikroRNA'ların biyogenezi, çekirdek ve sitoplazmada kademeli bir şekilde meydana gelir. Olgun miRNA'lar, primer miRNA (pri-miRNA) ile başlayan bir dizi bölünme işlemi sonucunda ortaya çıkan kısaltılmış RNA'lardır (139, 140). İlk olarak bazı türlerde RNA polimeraz II bazı türlerde ise RNA polimeraz III aracılığıyla yaklaşık 500-3000 baz içeren sap-ilmik yapısına sahip pri-miRNA sentezlenir (147). Pri-miRNA zinciri, çekirdek içerisinde çift sarmallı RNA (dsRNA) spesifik, özel bir ribonükleaz olan Drosha tarafından işlenerek yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA elde edilir. Daha sonra bu RNA zincirleri Exportin-5 aracılığıyla sitoplazmaya taşınarak Dicer olarak adlandırılan başka bir dsRNA'ya spesifik ribonükleaz tarafından yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleks parçalarına ayrılır (148). miRNA'nın bu olgun formu, translasyonun baskılanması veya hedef RNA'ların doğrudan yıkılması için gerekli olan RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) ile bağlanmak için hazırdır. Dubleks yapısındaki miRNA'lardan daha kararlı olanı bu kompleksin yapısına katılırken, diğeri bu kompleks tarafından yıkılır. Kompleksin yapısına katılan miRNA "kılavuz iplik", yıkılan miRNA ise "anti-kılavuz" olarak adlandırılır (149) (Şekil 1).

### 2.2.3. MikroRNA Fonksiyonları

MikroRNA'yı yapısına katan RISC, mRNA translasyonunu durdurabilir ya da doğrudan mRNA yıkımına neden olabilir. Bu fonksiyonlarını hedef genlerde bulunan ve kendi nükleotidleri ile eşleşen diziler sayesinde gerçekleştirir (147).

Hayvanlardaki miRNA'lar genellikle 3' bölgesindeki Translasyona Uğramayan Bölge (TUB)'lerdeki kusurlu bir baz eşleşmesi nedeniyle hedef mRNA'ların translasyonunu baskılar (150, 151). miRNA, mRNA'nın 3'TUB'sine bağlanıp translasyonu başlatma faktörlerini engelleyerek veya polyA kuyruk fonksiyonunu bozarak translasyonu önleme yeteneğine sahiptir (141, 152, 153). Bununla birlikte RISC ile sabit kompleksler oluşturan poliribozomlar nedeniyle de translasyonun devamlılığı engellenebilir (154, 155).



Şekil 1: miRNA biyogenez ve mRNA'nın posttranskripsiyonel olarak düzenlenmesi (156)

Translasyon baskılanması ile mRNA yıkımı arasındaki ayırım, miRNA ile hedefi arasındaki tamamlayıcılık derecesine dayanır. Hayvan miRNA'larının mRNA

yıkılımda fonksiyon gösterebilmesi hedef mRNA'sı ile baz eşleşmesindeki neredeyse tam uyuşma ile olabilmektedir (157).

Sitoplazmik P-cisimleri, hücrede mRNA'nın parçalanması için yıkıcı enzimler ve ekzonükleazlar içeren bölümlerdir. miRNA'lar ayrıca P cisimleri ile de ilişki içerisindedir ve mRNA'ların yıkılması için bu cisimciklere yönlendirilmesi miRNA bağımlıdır (158).

#### **2.2.4. MikroRNA Etkileri**

**2.2.4.1. Gelişimsel zamanlama:** MikroRNA'ların biyogenezi ve fonksiyonu hakkındaki bilginin çoğu, *C. elegans*'ın gelişimsel zamanlaması fonksiyonunda yer alan miRNA'lar olarak tanımlanan lin-4 ve let-7'nin keşfedilmesiyle sağlanan yaklaşımdan kaynaklanmaktadır. Bu miRNA'ların düzenlenmesi ile *C. Elegans*'ın gelişimsel dönemleri devam edebilmektedir (145, 159).

**2.2.4.2. Hücre çoğalması ve diferansiyasyonu:** MikroRNA'lar spesifik ve hızlı etkili düzenleyici görevleri nedeniyle hücre çoğalması ve diferansiyasyonunun önemli düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir. Hücre bölünmesi bir organizmanın büyümesi için zorunlu olsa da, uygunsuz zamanlarda meydana geldiğinde organizmaya zararlı olabilir. Bu durum kanserin ayırt edici özelliğidir ve birçok miRNA'nın tümörlerde arttığı gösterilmiştir (147).

**2.2.4.3. Apoptoz:** Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, dokuların gelişmesinde vazgeçilmez bir özelliktir. Apoptoz işe yaramayan ya da canlıya zararlı hücrelerin yok edilmesini sağlayan bir süreçtir. Apoptoz bir defa aktive edildiğinde kaspaz proteinleri hücrenin hem yapısal hem de fonksiyonel elemanlarına yapışır. Bu nedenle hücre ölümü veya hayatta kalması büyük ölçüde aktif kaspazların kontrolündedir. Kaspazlar hücre içinde hazır olduğundan, düzenlenmelerinde miRNA'ların rol oynadığı açıktır. *Drosophila*'nın gözünde, miR-14'ün yokluğu hücre ölüm efektörü olan Drice'in artışına neden olur ve bu da miR14'ün apoptoz inhibitörü olduğunu destekler (160).

**2.2.4.4. Kanserler:** MikroRNA'lar canlıların gelişimi için büyük öneme sahip olsalar da, baskılama özellikleri azaldığında hastalıkların oluşumu ile de ilişkilidir. Bazı miRNA'ların başka bir onkogen ekspresyonu üzerinde baskılayıcı özellikler gösterdiği dolayısıyla tümör süpresör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların ekspresyonunda azalma tümörögeneze yol açmaktadır. Bu nedenle bu gruba giren miRNA'lara tümör süpresör miRNA'lar denilmektedir (161).

MikroRNA'lar aynı zamanda tümör süpresör aktiviteye sahip genlerin baskılanması ve apoptoz inhibisyonu gibi olayları da etkileyebilmektedir. Bu etki üzerinden kanser oluşumuna neden olan miRNA'lar ise onkogenik miRNA'lar olarak isimlendirilir (147).

### **2.2.5. MikroRNA-21 ve MikroRNA-21'in Böbrek Karsinomlarındaki Ekspresyon Durumu**

MikroRNA-21'in embriyo gelişiminde, organogenez sürecinde organ şekillenmesinde, immün sistem hücrelerinin gelişiminde ve birtakım immün hücre aracılı hastalık gelişiminde, epitelyal mezenşimal dönüşümde ve buna bağlı olarak fibroziste ve son olarak da kanser ve kanser tedavilerinde görülen ilaç dirençlerinin gelişiminde büyük rolü vardır (162, 163).

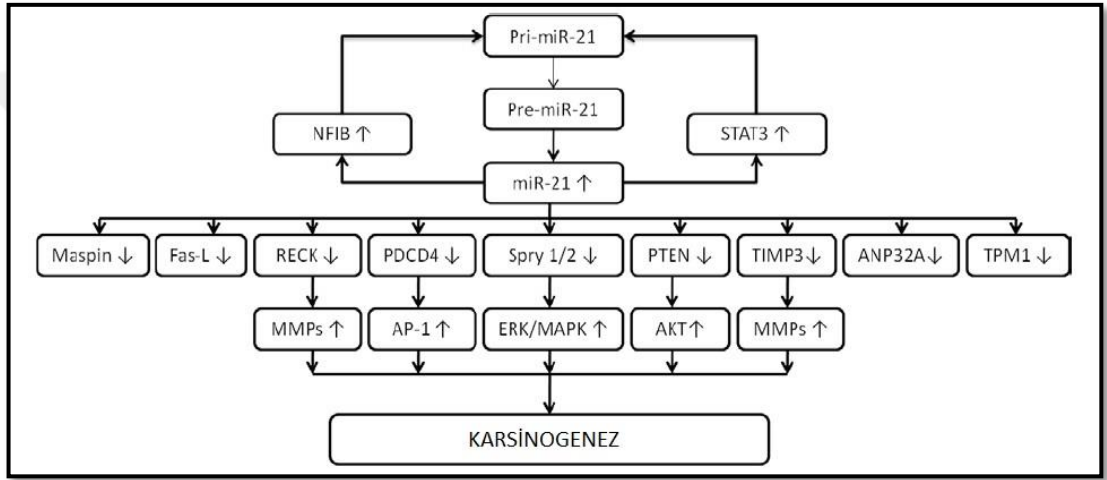
MikroRNA-21'in solid ve hematolojik kanserlerde en sık artış gösteren miRNA olduğu gösterilmiştir (164). Özellikle meme kanseri (161), glioblastom (165) ve pankreas kanseri gibi sayısız kanserde yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur (166). Meme kanseri veya glioblastom hücrelerinin anti-sens miRNA-21 (antagomiR-21) ile transfekte edilmesiyle miRNA-21'in down regülasyonu izlenmiştir. Bu tedaviye bağlı olarak artan apoptoz sayesinde hücre çoğalmasının engellenmesi miRNA-21'in hücre içerisindeki rolünü kanıtlar niteliktedir (166, 167).

MikroRNA-21 pro-apoptotik genleri inhibe ederek onkogen (oncomiR) olarak işlev görür. Buna ek olarak, miRNA-21 PI-3 kinaz-Akt sinyal yolunun hayatta kalma/büyümeyi teşvik edici aktivitesini antagonize eden bir fosfataz olan tümör süpresör PTEN'i hedeflemektedir (168). PI-3 kinaz-Akt/PTEN sinyal yolağı bozukluklarının BHK gelişiminde önemli olduğu bilinmektedir. miRNA-21 ise bu yolağı etkileyerek apoptozu bozar ve tümörögenezde rol oynar (169). Artmış miRNA-21 ekspresyonu, başka bir tümör süpresör gen olan PDCD4 ekspresyonunu

post-transkripsiyonel düzeyde negatif olarak kontrol etmekte ve böylece kanser hücresinde motilite, transformasyon ve hiperplaziye neden olmaktadır (170).

Von Hippel Lindau fonksiyonu bulunan (VHL mutasyonu olmayan-vahşi tip) BK'lerde de miRNA-21 ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir. Bu sonuçlar VHL/HIF yolağı ile miRNA-21 ekspresyonu arasında bir ilişki olduğu düşündürmektedir (171).

miRNA-21, PTEN, PDCD4 ve VHL geni dışında pek çok gen aktivitesi üzerinde de etkili olarak karsinogenezde rol oynamaktadır (Şekil 2)(172).



Şekil 2: miRNA-21'in karsinogenez yollarına katılımı *miR*: mikroRNA; *pri-miR*, primer mikroRNA; *pre-miR*, prekürsör mikroRNA *AP-1*, activated protein-1; *NFI*, nuclear factor I; *Maspin*, mammary serine protease inhibitor; *Fas-L*, Fas ligand; *Spry 1/2*, sprouty homolog 1/2; *PDCD4*, programmed cell death protein 4; *TPM1*, tropomyosin 1; *RECK*, reversion-induced cystine-rich protein with Kazal motifs; *TIMP3*, tissue inhibitor of metalloproteinases 3; *ANP32A*, acidic nuclear phosphoprotein 32 family, member A; *MMP*, matrix metalloproteinase; *PTEN*, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; *STAT3*, signal transducer and activator of transcription 3; *JNK*, c-Jun N-terminal kinase; *MDR*, multi-drug resistance; *ERK*, extracellular signal-regulated kinase; *MAPK*, mitogen-associated protein kinase. (172)

## 2.2.6. MikroRNA-210 ve MikroRNA-210'un Böbrek

### Karsinomlardaki Ekspresyon Durumu

MikroRNA-210 hipoksi durumunda artış gösteren majör miRNA olması yanı sıra mitokondriyal metabolizma, anjiogenez, hücre çoğalması ve diferansiyasyonu,

DNA hasar yanıtı ve apoptozda görevlidir (173). Bunlara ek olarak kanserde hipoksi durumu, metastaz ve tümör invazyonu gibi çok sayıda önemli olay ile de ilişkilendirilmiştir (174).

Hipoksi, oksijen konsantrasyonunun belirgin seviyede azaldığı solid tümörlerde en sık neoplastik mikroçevredir. Hipoksi ile çok sayıda miRNA indüklenmektedir ve bunlar tümörlerdeki düşük oksijene karşı gelişen adaptif yanıtta önemli rol oynamaktadır (175). *Hypoxia-Inducible Factors(HIFs)* hipoksiye yanıtta iyi bilinen ana düzenleyicilerdendir. Çok sayıdaki çalışma, hipoksik hücrelerde hayatta kalmayı sağlamada, miRNA-210 ekspresyon düzeyi artışının önemine işaret etmektedir. Ek olarak miRNA-210 hipoksik hücrelerde ekspresyon düzeyi artışının en fazla olduğu miRNA'dır (176, 177). Tüm bunlar miRNA-210'un *HIFs* düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (178).

Berrak hücreli böbrek hücreli karsinomlarda HIF-1 ve HIF-2'nin VHL gen mutasyonları sonucu arttığı bildirilmiştir. Bu artışa eşlik eden artmış miRNA-210 ekspresyonunun da HIF-1 düzenleyicisi olduğu ve diğer hedef genleri de etkileyerek BHK'lerde hücre göçü ve invazyon, anjiogenez, mitokondriyal metabolizma, apoptoz, DNA hasar tamiri ve hücre hayatta kalması ile ilişkili olduğu görülmüştür (179, 180).

MikroRNA-210'un meme, akciğer, baş-boyun, pankreas ve glioblastom gibi çok sayıda tümörün ilerlemesinde onkojenik özellikler gösterdiği bilinmektedir (173, 181). Bunlara ek olarak anjiogenez destekleyici özelliği nedeniyle metastazları da kolaylaştırmaktadır. Fakat over karsinomları, özefagus ve larinksin skuamöz hücreli karsinomu gibi bir grup tümörde de hücre çoğalması, apoptoz ve mitoz düzenlenmesindeki etkileriyle tümör süpresör roller üstlendiği bildirilmektedir (5, 182).

### **2.2.7. MikroRNA'ların Klinik Kullanımları**

MikroRNA ekspresyon profilleri, tümörleri kökenlerine, (164, 183) diferansiyasyon durumlarına ve gelişimlerine göre (184) sınıflandırmada ve teşhis amacıyla kullanılabilir. Sadece 200 adet miRNA gen ekspresyonuna dayanan miRNA ekspresyon profili, çoğu tanıdaki az diferansiye tümörü başarıyla

sınıflandırmış, oysaki yaklaşık 16.000 adet protein kodlayan gen içeren mRNA profili bu sınıflandırmada başarısız olmuştur (183).

Bu bulgular miRNA profillemesinin mRNA profillemesinden çok daha bilgilendirici olduğunu göstermektedir. Ayrıca prognostik miRNA ekspresyon özellikleri tanımlanabilmiş tümör gruplarında yüksek ilerleme riski, kötü sağkalım veya metastaz varlığı gibi özellikler öngörebilir (185-187). Bunlara ek olarak miRNA'lar kanser önleme veya terapötik müdahale için hedef veya araç olabilir (188).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. OLGU SEÇİMİ

Bu çalışmada; 2012-2018 yılları arasında İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi üroloji servisi tarafından opere edilmiş, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi patoloji laboratuvarında incelenmiş ve böbrek karsinomu tanısı almış hastalar, hastanemizin elektronik arşivi geriye dönük (retrospektif) olarak incelenerek saptandı. Operasyon öncesi kemoterapi veya radyoterapi almamış, ek bir malignitesi bulunmayan hastalar belirlendi. Hastalar içinde metastazı bulunanlardan, metastatik odakları İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde cerrahi olarak çıkarılmış hasta grubu tespit edildi. Çalışmaya böbrek tümörü tanılı 55 olgu (35 adet BHBHK, 11 adet KBHK, 9 adet PBHK) ile mevcut olgular içinde metastatik odak içeren 9 metastatik olgu dahil edildi.

Olgulara ait hematoksilin ve eozin (H&E) boyalı ve immünohistokimyasal boyama lamları arşivden çıkarıldı. Primer olguların bloklarında moleküler çalışma için yeterli tümör ve sağlıklı böbrek dokusu bulunan ve metastatik odaklara ait bloklarında moleküler çalışma için yeterli tümör bulunan hastalar belirlendi. Olgulara ait lamlar iki farklı gözlemci tarafından yeniden değerlendirildi. Olguların histolojik derecelendirme ve evrelemesi WHO 2016 sınıflamasına göre yapıldı. Olgularda sarkomatoid / rabdoid dönüşüm, lenfovasküler invazyon, renal ven ve büyük damar invazyonu / trombüsü ve nekroz gibi özellikler belirlendi. BHBKK olgularından WHO/ ISUP derece 1 ve 2 olanlar 'düşük dereceli', WHO/ ISUP derece 3 ve 4 olanlar ise 'yüksek dereceli' grup olarak ayrıldı.

Tümör ve metastaz odaklarına ait H&E boyalı lamlarda tümörü en iyi yansıtan, nekroz ve kanama alanlarından fakir alanlar belirlendi. Benzer şekilde böbrek rezeksiyon materyallerine ait H&E boyalı kesitlerde, inflamasyon ve kanamadan fakir sağlıklı böbrek dokusunu içeren alanlar belirlendi. Moleküler çalışmalarda ilgili parafin bloklar kullanıldı.

Hastalara ait klinik bilgilere - yaş, cinsiyet, tıbbi özgeçmiş ve soygeçmiş, başvuru yakınması, yapılan cerrahinin türü, metastaz varlığı, cerrahi sonrası tedavi ve takip bilgileri gibi- multidisipliner çalışma grubunun klinik hekimleri ile temasa geçilerek ve/veya bir kısım olguda hastanenin elektronik arşivinden ulaşıldı.



İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 07/12/2018 tarihinde yapılan toplantısında ETİK KURUL: 1555 sayılı raporu ile çalışma için onay alınmıştır. (Bkz. EK-1)

Bu tez çalışması Sağlık Bilimleri Üniversitesi (SBÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 2019/022)

## **3.2. YÖNTEM**

### **3.2.1. Dokuların Mikrosantrifüj Tüpüne Aktarımı**

Seçilen her bir olguya ait H&E boyalı kesitlerde nekroz, inflamasyon ve hemoraji içermeyen tümörden zengin doku yanı sıra sağlıklı böbrek parankimi içeren alanlar, Olympus BX53 (Olympus, Tokyo, Japan) ışık mikroskobu altında işaretlendi. (Şekil 3). Cerrahi olarak çıkarılmış metastatik dokulara ait H&E boyalı kesitlerde de nekroz, inflamasyon ve nekroz içermeyen alanlar, Olympus BX53 (Olympus, Tokyo, Japan) ışık mikroskobu altında işaretlendi. Seçilen H&E boyalı kesitlere ait arşivdeki formalinde fikse parafine gömülü doku bloklarından 5'er µm kalınlığında, 2-10 sayıda doku kesitleri alındı. İşaretli alanların izdüşümüne uyan alan dışındaki alanlar 11 numaralı bisturi ucu ile uzaklaştırıldı. İşaretli alanlar (tümör, sağlıklı böbrek parankimi ve metastatik tümör) 11 numaralı bisturi ucu yardımıyla steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.

### **3.2.2. Deparafinizasyon – RNA izolasyonu**

Tüplere aktarılan doku kesitlerinden, deparafinizasyon ve rehidrasyon sonrası RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE, Thermo Fisher Scientific Inc. , Foster City, CA, USA, katalog no. AM1975' kullanılarak, aşağıdaki protokole uygun RNA ekstraksiyonu yapıldı.



Şekil 3: H&E boyalı kesitlerde tümörlü ve sağlıklı böbrek alanlarının işaretlenmesi

Parafini uzaklaştırmak için doku kesitleri içeren mikrosantrifüj tüpleri içerisine 1 ml ksilen eklendi ve 30 sn vortekslendi. Vortekslenen örnekler 'Eppendorf 5417 R' santrifüj cihazında 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen örnekler, parafinin erimesi için 50°C'deki ısı bloklarında 3 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek pellet oluşturuldu. Pipetleme ile doku pelletine dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı. Ksilen ekleme ve devamındaki işlemler tekrarlanarak oluşan süpernatant tekrar uzaklaştırıldı.

Ksileni uzaklaştırmak için, mikrosantrifüj tüpündeki pellet üzerine 1 ml %100'lük etanol eklendi ve 30 sn vortekslendi. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve pellet oluşturuldu. Pipetleme ile doku pelletine dokunmadan, süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Tüp içerisinde kalan doku pelleti biyolojik kabin içerisinde tüpler ağzı açık şekilde 50°C'deki ısı bloklarında 20 dk doku tamamen kuruyana ve olası etanol buharlaşana kadar inkübe edildi.

Daha sonra dokuyu parçalamak için, her mikrosantrifüj tüpü içerisindeki deparafinize edilmiş doku örneğinin üzerine 200 µl 'Lizis Buffer' ile 4 µl proteaz

eklendi ve düşük hızda vortekslendi. 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpleri 50°C'deki ısı bloklarında gece boyunca inkübe edildi. (Şekil4).

Mikrosantrifüj tüpleri içindeki dokunun tamamen parçalandığı görüldükten sonra, mikrosantrifüj tüpleri 80°C'deki ısı bloklarında 15 dk inkübe edildi. Tüpler soğuduktan sonra 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. RNA izolasyon kiti içerisinde bulunan filtreli tüp ve toplama tüplerinden her bir vaka için birer adet hazırlandı. Her bir mikrosantrifüj tüpüne 240 µl '*İzolasyon Katkı Maddesi*' adlı solüsyon ve 550 µl%100'lük etanol eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı.

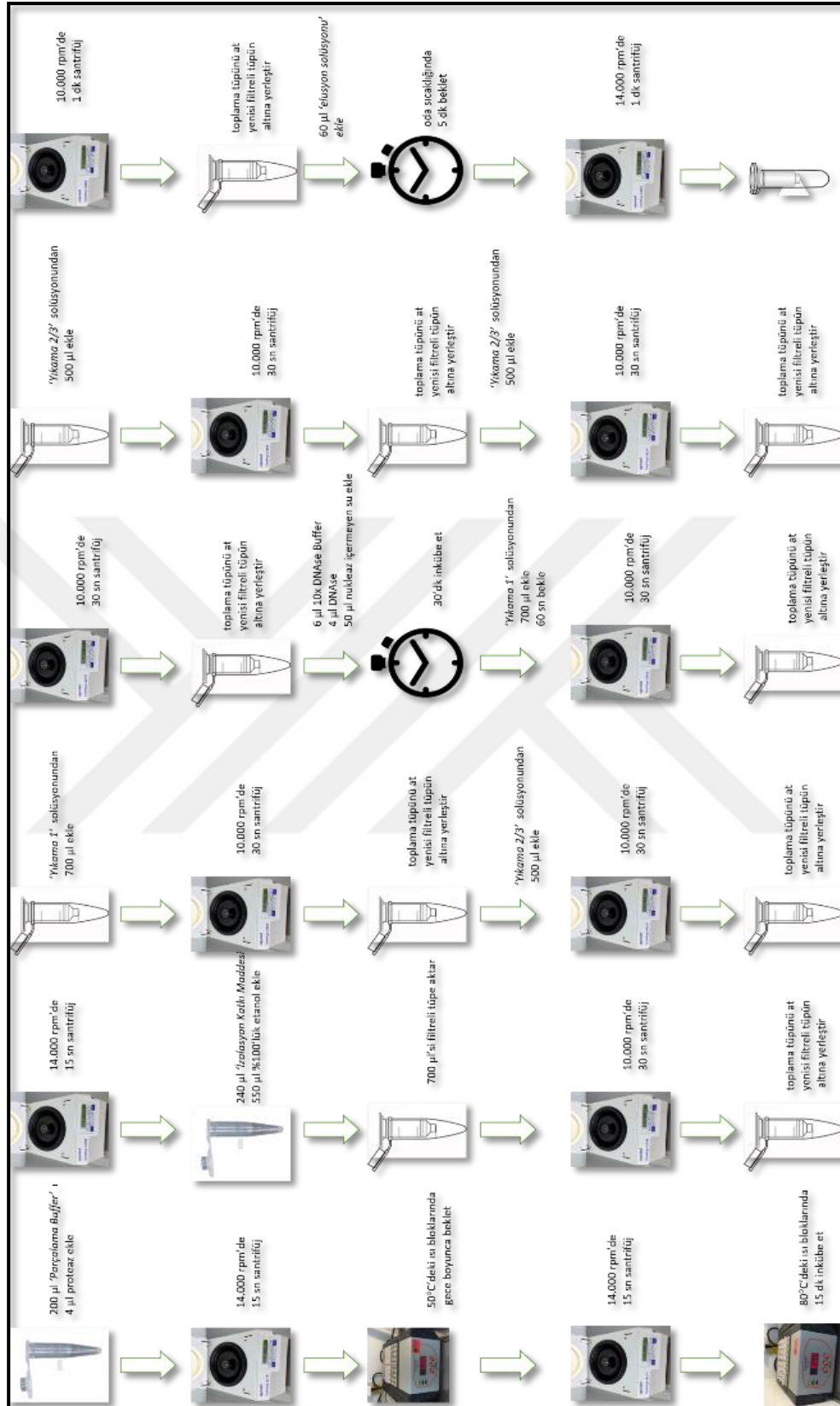
Bu karışımların 700'er µl'si hazırlanan her bir filtreli tüpe aktarıldı ve 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak, yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi. Mikrosantrifüj tüpü içerisindeki karışımın kalanı, filtreli tüpe aktarılarak bu işlem tekrarlandı. Daha sonra filtrenin yıkanması aşamasına geçildi.

Toplama tüpündeki filtreli tüpün merkezine ekstraksiyon kiti içerisinde bulunan '*Yıkama 1*' adlı solüsyondan 700 µl eklendi ve 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atıldı ve yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi.

Filtreli tüpün merkezine ekstraksiyon kiti içerisinde bulunan '*Yıkama 2/3*' adlı solüsyondan, 500 µl eklendi ve 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atıldı. Yeni toplama tüpü, filtreli tüpün altına yerleştirildi. Filtre içerisinde kalan sıvının tamamen uzaklaştırılması için toplama tüpü ve filtreli tüp tekrar 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atıldı. Yeni toplama tüpü, filtreli tüpün altına yerleştirildi.

Her tüp içerisine DNA bulaşımı engellemek için ekstraksiyon kiti içerisinde bulunan; 6 µl 10x DNaz Buffer, 4 µl DNaz ve 50 µl nukleaz içermeyen su ile hazırlanmış, toplamda 60 µl hacmindeki karışım filtreli tüpün merkezine eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yıkama aşamasına geçildi. Filtreli tüpler üzerine '*Yıkama 1*' adlı solüsyondan, 700 µl eklendi ve oda sıcaklığında 60 sn bekletildi. Toplama tüpü ve filtreli tüp 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atıldı. Yeni toplama tüpü, filtreli tüpün

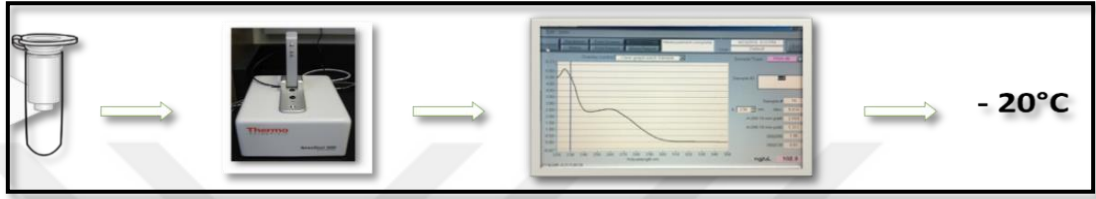




Şekil 5: RNA izolasyonu akış şeması\*

\*Narlı, Akciğer ve Baş Boyun Bölgesi Skuamöz Hücreli Karsinomlarında miRNA Ekspresyon Profiline Anatomik Lokalizasyonunun Tespitine Katkısı, 85

Elde edilen RNA'ların konsantrasyonunun belirlenmesi için 'Nanodrop 1000, Thermo Scientific, USA' spektrofotometre cihazı kullanıldı. Ölçüm için 1,5 µl RNA kullanıldı. 260, 230 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapıldı. RNA saflığını değerlendirmek için OD 260 nm/ OD 280 oranına bakıldı. Bu oranın 1,9-2,1 arasında bulunduğu RNA'lar saflık açısından çalışmaya elverişli kabul edildi. Her bir örneğe ait RNA konsantrasyonları ölçülüp tüplerin üzerine not edildi. Bu aşamadan sonra RNA'lar -20°C'de muhafaza edildi (Şekil 6).



Şekil 6: RNA konsantrasyonunun belirlenmesi\*

\*Narlı, *Akciğer ve Baş Boyun Bölgesi Skuamöz Hücreli Karsinomlarında miRNA Ekspresyon Profilinin Anatomik Lokalizasyonunun Tespitine Katkısı*,85

### 3.2.3. Total RNA'dan Komplementer DNA Sentezi

Her bir örneğe ait 10 nanogram total RNA'dan 'TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit Thermo Fisher Scientific Inc, USA, katalog no. 4366596' kullanarak revers transkripsiyon işlemi ile c-DNA sentezi gerçekleştirildi. Her bir örnekten; miRNA-21 ve miRNA-210 hedef miRNA'larına ve RNU6b endojen kontrol miRNA'sına yönelik, 3 ayrı c-DNA sentezi yapıldı.

*TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit* içinde bulunan 100 mM dNTPs, 50 U/µL MultiScribe™ Revers Transkriptaz enzimi, 10X revers transkriptaz buffer, 20 U/µL RNaz inhibitör, DNAaz/ RNAaz içermeyen distile su ile poliprolen tüp içerisine son hacmi 7 µL olacak şekilde Tablo 5'de belirtilen hacimler baz alınarak, pipetleme sırasında oluşabilecek kayıplar da göz önünde bulundurularak, ihtiyaç duyulan revers transkripsiyon master miks hacminin, %10 fazlasını içeren master miksi hazırlandı.

Tablo 5: 15 µl'lik revers transkripsiyon reaksiyonu için hazırlanan revers transkripsiyon master miks içeriği

<b>Solüsyon</b>	<b>15 µl'lik revers transkripsiyon reaksiyonu için kullanılacak miktar</b>
100mM dNTPs (dTTP ile birlikte)	0.15 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL	1.00 µL
10× Reverse Transcription Buffer	1.50 µL
RNase Inhibitor, 20 U/µL	0.19 µL
DNAaz/ RNAaz içermeyen distile su	4.16 µL
<b>Total miktar</b>	<b>7 µL</b>

Hazırlanan master miksler 96 kuyucuk içeren pleytlerde belirlenmiş alanlara dağıtıldı (Şekil 7). 'TaqMan™ MicroRNA Assay Thermo Fisher Scientific Inc, USA, katalog no. 4440887' kiti içerisinde bulunan 5X RT primerden 3 µL ve total RNA örneklerinden 5 µL her bir kuyucuğa eklendi. Kontaminasyon kontrolü için; her pleyte her bir hedefe yönelik, 1.00 µL DNAaz/ RNAaz içermeyen distile su içeren karışımlar da hazırlandı.

Hazırlanan pleytler hafifçe vortekslendi ve santrifüj edildi. Revers transkripsiyon işlemi, Veriti 96 kuyucuklu termal döngü cihazında (ABI, Applied Biosystems, USA), reaksiyon hacmi 15 µl'e ayarlanarak, Tablo 6'da belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. Sentezlenen c-DNA'lar kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Istanbul Sultan 2. Abdulhamid Han E.A.H. Moleküler Patoloji Laboratuvarı						
miRNA-RT-cDNA-Worksheet Date: 19/01/20						
		1 REACTION			MASTER MIX	
Reagent					38	
	Nuclease free water	4,16			158,08	
	10X RT Buffer	1,5			57	
	100mM dNTPs	0,15			5,7	
	MultiScribe™	1			38	
	5X RT primer	3			114	
	RNase Inhibitor	0,19			7,22	
	RNA (10 ng) + H2O	5				
	<b>Total</b>	<b>15</b>			<b>570</b>	
	21/210/RNU6B	conc	ma	su	3 x 12lik MİX	
1	57-T				84 MİX	
2	57-N				36 PRİMER	
3	58-T				10'ar dağıt	
4	58-N					
5	59-T				5X RT Primer sulandır	
6	59-N				25 ul 20X RT primer	
7	60-T				75 ul su	
8	60-N					
9	61-T				16 C	30 min 1 cycle
10	61-N				42 C	30 min 1 cycle
11	NTC				85 C	5 min 1 cycle
					4 C	∞

Şekil 7: RT-cDNA çalışma şablonu örneği

### 3.2.4. Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile miRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu 7500 real time PCR sisteminde (ABI, Applied Biosystems, USA) gerçekleştirildi. Her bir hastanın tümörlü ve tümörsüz örneklerine ait miRNA-21 ve miRNA-210 hedef miRNA'larına yönelik PCR karışımları, RNU6b endojen kontrol ve RNA içermeyen kontaminasyon örnekleri ile beraber aynı anda 96 kuyucuklu pleytlerde hazırlandı.

Tablo 6: Revers Transkripsiyon için süre-sıcaklık programı

Basamak	Süre	Sıcaklık
Bekleme	30 dk	16 °C
Bekleme	30 dk	42 °C
Bekleme	5 dk	85 °C
Bekleme	∞	4



1 µl ‘*TaqMan™ MicroRNA Assay, Thermo Fisher Scientific Inc, USA, katalog no. 4440887*’)’ de bulunan floresan işaretli 20X primer, 10 µl *TaqMan Universal PCR Master Miks (Thermo Fisher Scientific Inc, USA, katalog no. 4304437)*, 7.67 µL DNAaz/ RNAaz içermeyen distile su ve her bir hedef miRNA’ya ait 1.33 µl c-DNA ürünü ile son hacmi 20 µL olacak şekilde, PCR karışımları hazırlandı. Aynı örnekler 3 defa (*triplicate*) çalışıldı. Pipetleme sırasında oluşabilecek kayıplar göz önünde bulundurularak, ihtiyaç duyulan hacmin, %10 fazlasını içeren PCR karışımı hazırlandı (Tablo 7).

Tablo 7: 20 µl’lik qRT-PCR reaksiyonu için kullanılacak solüsyon miktarları

Solüsyon	20 µl’lik qRT-PCR reaksiyonu için kullanılacak solüsyon miktarları	
	Tek reaksiyon	Üç reaksiyon
TaqMan® Small RNA Assay (20×)	1.00 µL	3.60 µL
Revers transkripsiyon ile sentez edilen c-DNA ürünü	1.33 µL	4.80 µL
TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2×)	10.00 µL	36.00 µL
Nükleaz içermeyen steril su	7.67 µL	27.61 µL
<b>Toplam hacim</b>	<b>20.00 µL</b>	<b>72.01 µL</b>

Hazırlanan qRT-PCR karışımları 96 kuyucuklu pleytlerin, çalışma şablonunda belirlenmiş alanlarına eklendi. Revers transkriptaz pleytinde, her bir hedefe yönelik kontaminasyon kontrolü için kullanılan, distile su içeren c-DNA örneklerinin 1,33 µL’si de qRT-PCR pleytine eklendi (Şekil 8). Pleytler *NF 800/R santrifüj* cihazında 1 dk santrifüj edildi ve qRT-PCR reaksiyonu için real time PCR cihazına yüklendi. 7500 real time PCR cihazı reaksiyon hacmi 20 µl ayarlanarak Tablo 8’de belirtildiği gibi amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. 7500 real time PCR cihazında *7500 software v2.0.6* ile floresan ışımaya miktarları, 40 siklus boyunca ölçüldü (Şekil 9).



### 3.2.5. Hedef miRNA Ekspresyon Verilerinin Normalizasyonu ve Ekspresyon Profillerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi

7500 real time PCR cihazında, 7500 software v2.0.6 ile her örnek için  $\Delta RN$ 'de önemli artışın olduğu ilk siklus, yani floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri geçtiği döngü olan  $C_T$  (cycle threshold) değeri tespit edildi. qRT-PCR uygulamalarında, verilerin kantitatif olarak birbiriyle karşılaştırılabilir olması için, her dokuda eşit miktarda ekspresyonu olduğu düşünülen referans genlere olan farkının alınması ve bunun PCR uygulamasındaki logaritmik c-DNA kopya sayısı artışıyla, ilişkilendirilmesi gerekir. Bu işleme normalizasyon denir. Çalışmada qRT-PCR normalizasyonu için  $\Delta\Delta CT$  yöntemi kullanılmıştır. Endojen kontrol için tüm hücrelerde eşit düzeyde ekspresyonu olduğu düşünülen referans miRNA olarak seçilen RNU6b kullanılmıştır.

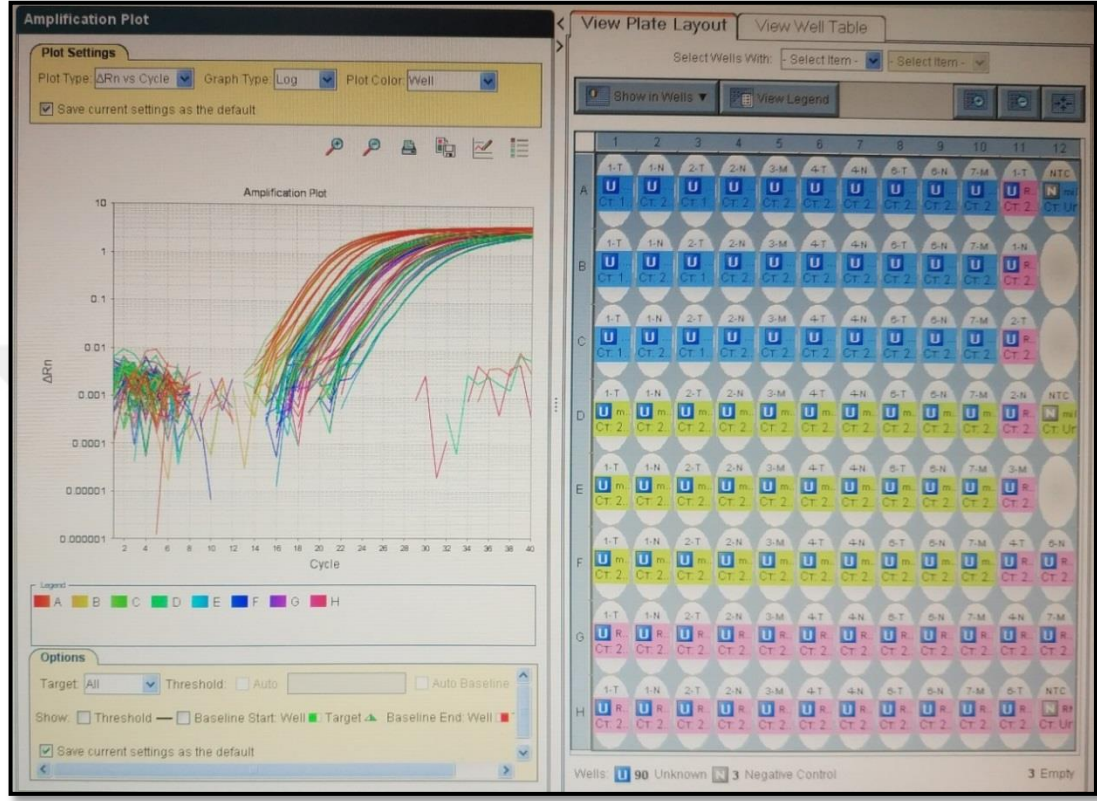
Elde edilen  $C_T$  değerleri kullanılarak, örneklerle ait  $\Delta\Delta CT$  ( $\Delta\Delta CT = (\text{Tümörlü dokuya ait hedef miRNA'nın } C_T \text{ değeri} - \text{Tümörlü dokuya ait endojen kontrol miRNA'nın (RNU6b) } C_T \text{ değeri}) - (\text{Normal dokuya ait hedef miRNA'nın } C_T \text{ değeri} - \text{Normal dokuya ait endojen kontrol miRNA'nın (RNU6b) } C_T \text{ değeri})$ ) değeri hesaplandı. Metastatik odaklarda ise normal böbrek dokusuna göre ;  $\Delta\Delta CT$  ( $\Delta\Delta CT = (\text{Metastatik odağa ait hedef miRNA'nın } C_T \text{ değeri} - \text{Metastatik odağa ait endojen kontrol miRNA'nın (RNU6b) } C_T \text{ değeri}) - (\text{Normal Böbrek dokusuna ait hedef miRNA'nın } C_T \text{ değeri} - \text{Normal Böbrek dokusuna ait endojen kontrol miRNA'nın (RNU6b) } C_T \text{ değeri})$ ) değeri ayrıca hesaplandı.

Tümörlü ve metastatik dokuda, normal dokuya göre hedef miRNA'nın ekspresyon seviyesindeki değişiklik olan "fold change" ise  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formülü ile hesaplandı (189, 190).

### 3.2.6. İstatistik Analiz

Çalışmada, tüm istatistiksel analiz için SPSS v15.0 kullanıldı. Tümörlü ve metastatik dokuda, normal dokuya göre hedef miRNA'nın ekspresyon seviyesindeki değişiklik olan "fold change" değerlerinin log2 dönüşümü uygulandı. İstatistiksel analizlerin tamamında bu dönüştürülmüş veriler kullanıldı.

MikroRNA 21 ve miRNA 210'un ekspresyon düzeylerinin normal dağılıma uygunluğu ve varyansların homojenliği sırası ile Kolmogorov-Smirnov ve Levene test ile değerlendirildi.



Şekil 9: Real time PCR sonrası örneklerdeki miRNA amplifikasyon değerleri (sol) ve PCR örneklerinin 96 kuyuluk pletlerdeki yerleşimleri (sağ)

Histolojik alt tiplere göre miRNA ekspresyon düzeyindeki farklılık analizi tek yönlü ANOVA ve Tukey's HSD testleri ile yapıldı. Primer tümör ve metastatik odak arasında miRNA ekspresyon farklılığı paired-t-test ile incelendi. Parametrik verilerde korelasyon değerlendirmesi Pearson testi ile yürütüldü. Histolojik alt tip ve metastaz varlığı belirlemede miRNA ekspresyon düzeylerinin ayırt edici değeri ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisi analizi ile incelendi. Genel sağkalım ve miRNA ekspresyonu arasındaki ilişki Cox regresyon testi ile değerlendirildi.

İstatiksel anlamlılık %95 güven düzeyinde test edildi ( $\alpha=0,05$ ).

## 4. BULGULAR

### 4.1. DEMOGRAFİK VE KLİNİK BULGULAR

Hastaların 38'i erkek (%69,1), 17'si kadın (%30,9)' idi. Hastaların tanı anındaki yaş aralığı 38-81, yaş ortalaması  $62,27 \pm 11,70$ , ortanca değeri ise 65 olarak saptandı. Erkek ve kadın yaş ortalamaları sırası ile  $63,00$  ( $61,32 \pm 12,13$ ) ve  $67,00$  ( $64,41 \pm 10,70$ ) olarak hesaplanmıştır ( $p=0,391$ , Mann-Whitney U test). Erkek ve kadın hastalar arasında tanı anındaki yaş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Vakalardan 10 tanesine cerrahi prosedür olarak parsiyel nefrektomi, 45 vakaya ise radikal nefrektomi uygulanmış olup operasyon sonrası takip süreleri ortalama  $40,08 \pm 22,23$  aydır. 27 vakada tümör sağ böbrek yerleşimli, 28 vakada ise sol böbrek yerleşimliydi. Tümör yerleşimi böbrek üzerinde üst-alt kutup ve orta bölge yerleşimi olmak üzere benzer dağılım göstermekteydi. Tümör çap aralığı 1,5-13,5 cm olup çap ortalaması  $5,56 \pm 2,51$  cm; ortanca değer 4,7 cm olarak saptandı. 4 olguda birden fazla odakta tümör izlenmiş olup bunlardan 3'ü BHBHK diğeri ise PBHK'idi.

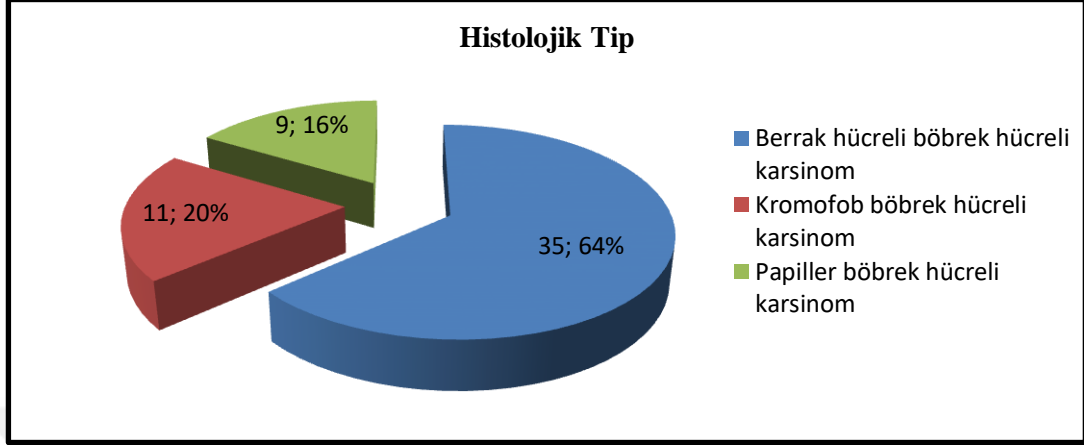
Berrak hücreli böbrek hücreli karsinomların 2'sine ve PBHK'lerin 1'ine papiller adenom; BHBHK'lerin 1'ine basit kist; PBHK'lerin 1'ine metanefrik adenom ve böbrek taşları eşlik etmekteydi.

Hastaların takiplerinde ölüm oranı erkeklerde %18, kadınlarda %12 olup (ortalama %16) istatistiksel olarak cinsiyetler arasında anlamlı ölüm oranı farkı saptanmadı ( $p=0,705$ , Chi-square test). Ölen hastaların ortalama operasyon sonrası yaşam süresi  $29,78 \pm 25,28$  ay olarak saptandı. Hastalarda klinik takip sürecinde %27 oranında (14 BHBHK 1 PBHK hastasında) metastaz geliştiği görüldü. Hastaların %5,5'inde ise takip sürecinde ikincil kanser gelişimi görüldü (parotis, akciğer, meme kaynaklı). Ölen hastaların %91'inde ölüm nedeni kanser metastazına bağlı idi.

### 4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

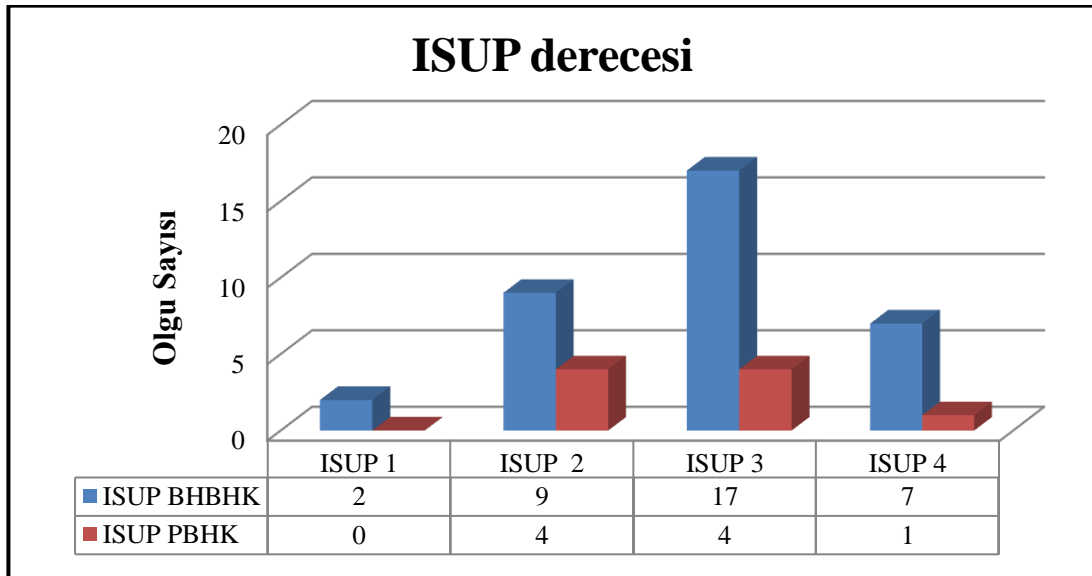
Otuz beş BHBHK, 11 KBHK ve 9 PBHK tanı vaka olmak üzere toplam 55 olgu çalışmaya dahil edildi (Şekil 10). Bunlara ek olarak BHBHK grubunda mevcut metastaz dokusuna ulaşılabilen 2 akciğer, 1 kolon, 1 pankreas, 1 beyin, 1 medulla

spinalis, 1 kemik, 1 böbrek üstü bezi ve 1 adet deri metastazı olmak üzere toplam 9 olgu metastaz dokusu grubunu oluşturmak üzere çalışmaya dahil edildi.



Şekil 10: Histolojik tiplerin dağılımı

Histolojik tiplerden bağımsız olarak WHO/ ISUP derecesi ile değerlendirilebilen 44 olgudan (BHBHK ve PBHK vakaları) 2 tanesi WHO/ ISUP derece 1, 13 tanesi WHO/ ISUP derece 2, 21 tanesi WHO/ ISUP derece 3 ve 8 tanesi WHO/ ISUP derece 4 olarak saptandı (Şekil 11).



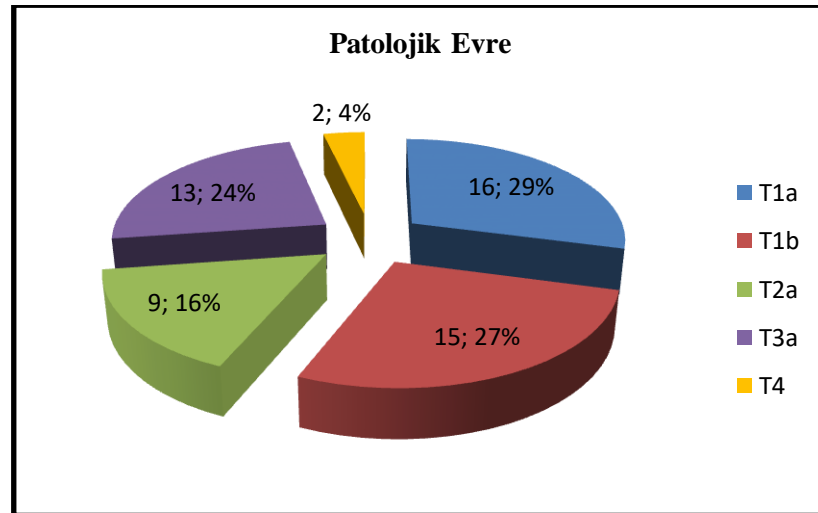
Şekil 11: WHO/ ISUP derecelerinin berrak hücreli böbrek hücreli karsinom (BHBHK) ve papiller böbrek hücreli karsinom (PBHK) vakalarındaki dağılımı

Histolojik tip dağılımlarına göre olgulara baktığımızda BHBHK'lerde 2 olgu WHO/ ISUP derece 1, 9 olgu WHO/ ISUP derece 2, 17 olgu WHO/ ISUP derece 3, 7 olgu WHO/ ISUP derece 4; PBHK'lerde 4 olgu WHO/ ISUP derece 2, 4 olgu WHO/ ISUP derece 3, 1 olgu WHO/ ISUP derece 4 olarak değerlendirildi.

WHO/ ISUP derece 4 tümör olgularının 1'inde sadece sarkomatoid diferansiyasyon, 4'ünde ise sadece rabdoid diferansiyasyon mevcuttu. Bu olgulardan 3'ünde değişen oranlarda hem sarkomatoid hem de rabdoid diferansiyasyon bir arada mevcuttu. Sarkomatoid ve rabdoid diferansiyasyonlar çoğunlukla BHBHK'de izlenirken, 1 olguda rabdoid diferansiyasyon PBHK'de izlenmekteydi. Olgularda sarkomatoid diferansiyasyon oranı % 5-30 arasında, rabdoid diferansiyasyon oranı ise % 5-80 arasında değişmekteydi.

Berrak hücreli böbrek hücreli karsinomlardan 15 tanesinde, PBHK'lerden 5 tanesinde, KBHK'lerden 1 tanesinde nekroz izlendi. Tümör içerisinde izlenen nekroz oranları %2-90 arasında değişmekte idi. Lenfovasküler invazyon BHBHK olgularının 7'sinde mevcutken, KBHK ve PBHK olgularında izlenmedi.

BHBHK'lerin 2'sinde, PBHK'lerin 1'inde ise renal ven ve dallarında tümör trombüsü mevcuttu. BK'lerde patolojik evre dağılımlarına bakıldığında 16'sı T1a, 15'i T1b, 9'u T2a, 13'ü T3a ve 2'si T4 olarak saptandı (Şekil 12).



Şekil 12: Çalışma grubundaki vakaların patolojik evrelerinin yüzdelik dilime göre dağılımı

Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom ve PBHK’lerde vakaların WHO/ ISUP derecelerine ve patolojik evrelere göre dağılımları Tablo 9’da verilmiştir (Tablo 9). KBHK’lerde ise patolojik evreler T1a: 3; T1b: 2; T2a: 5; T3a: 1 şeklinde dağılım göstermekte idi.

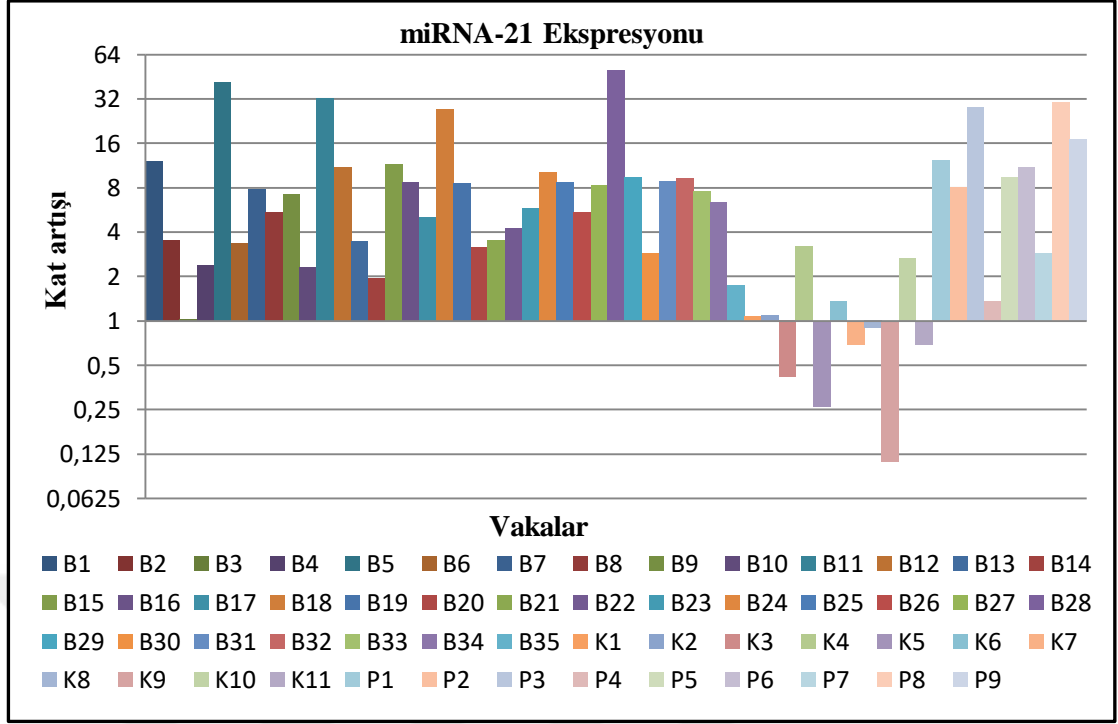
Tablo 9: Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom ve papiller böbrek hücreli karsinomlarda vakaların WHO/ ISUP derecelerine ve patolojik evrelere göre dağılımları

HİSTOLOJİK TİP		WHO/ ISUP DERECEİ				TOPLAM	
		1	2	3	4		
<b>Berrak Hücreli Böbrek Hücreli Karsinom</b>	<b>Patolojik</b>	<b>T1a</b>	2	5	6	0	13 (%37,1)
		<b>T1b</b>	0	3	5	0	8 (%22,9)
		<b>T2a</b>	0	0	1	0	1 (%2,9)
	<b>Evre</b>	<b>T3a</b>	0	1	5	5	11 (%31,4)
		<b>T4</b>	0	0	0	2	2 (%5,7)
<b>Toplam</b>			2 (%5,7)	9 (%25,7)	17 (%48,6)	7 (%20)	35 (%100)
<b>Papiller Böbrek Hücreli Karsinom</b>	<b>Patolojik</b>	<b>T1b</b>		4	1	0	5 (%55,6)
		<b>T2a</b>		0	2	1	3 (%33,3)
	<b>Evre</b>	<b>T3a</b>		0	1	0	1 (%11,1)
	<b>Toplam</b>			4 (%44,4)	4 (%44,4)	1 (%11,2)	9 (%100)
<b>Toplam</b>	<b>Patolojik</b>	<b>T1a</b>	2	5	6	0	13 (%29,5)
		<b>T1b</b>	0	7	6	0	13 (%29,5)
	<b>Evre</b>	<b>T2a</b>	0	0	3	1	4 (%9,1)
		<b>T3a</b>	0	1	6	5	12 (%27,3)
		<b>T4</b>	0	0	0	2	2 (%4,6)
<b>Toplam</b>			2 (%4,6)	13(%29,5)	21 (%47,7)	8 (%18,2)	44 (%100)

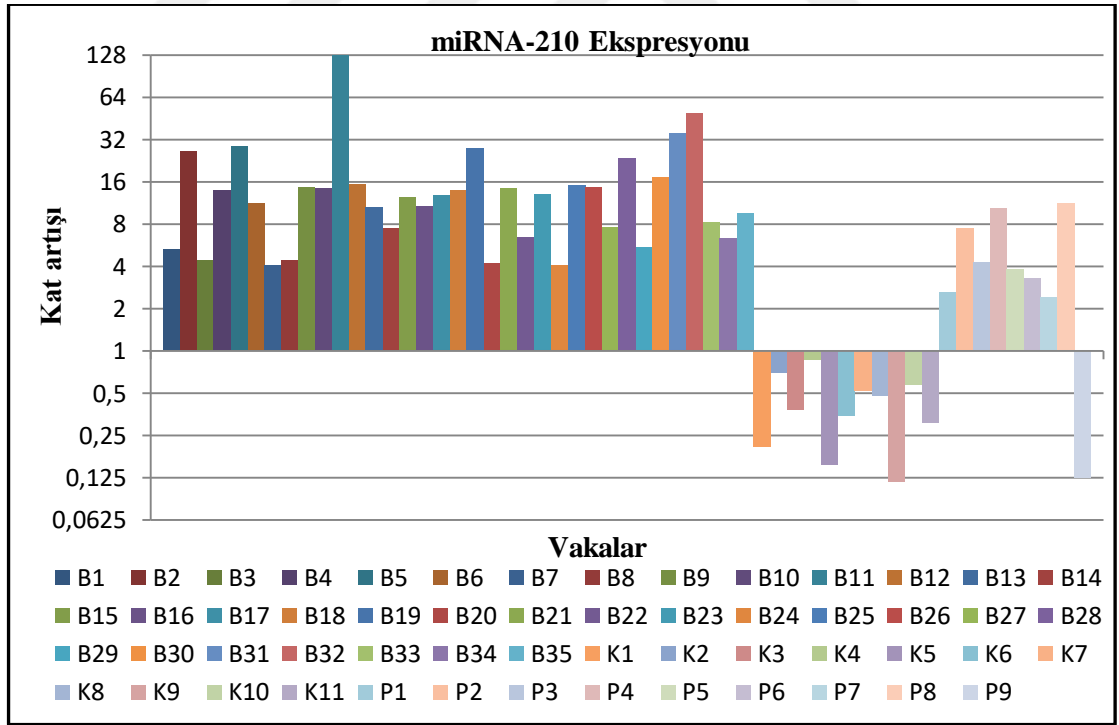
### 4.3. MOLEKÜLER BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen 35 BHBHK, 11 KBHK ve 9 PBHK olgusunun tümör dokularında sağlıklı böbrek dokularına göre miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon kat artışları Şekil 13 ve 14’ de ayrıntılı olarak verilmiştir.



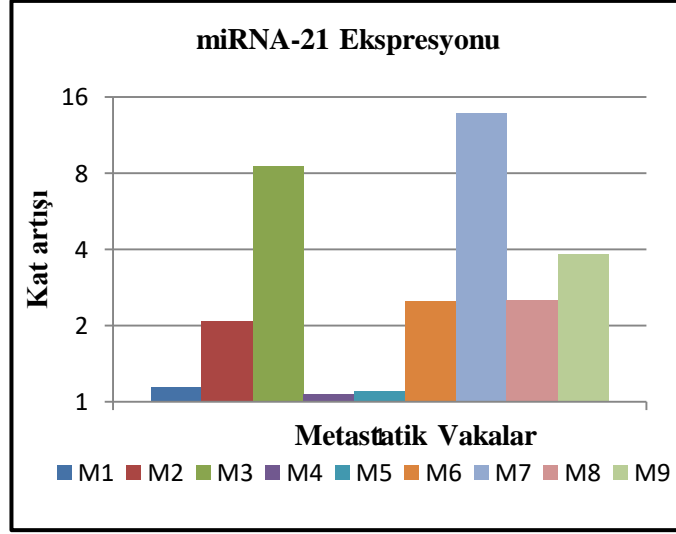


Şekil 13: Histolojik tiplere göre miRNA-21 ekspresyonlarının kat artışları

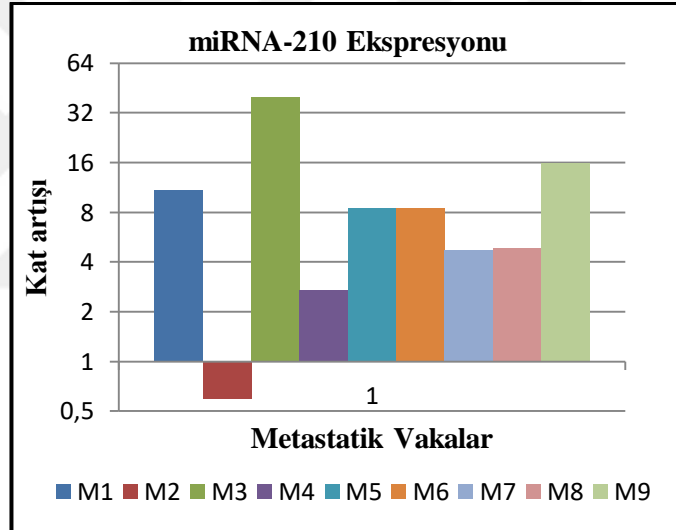


Şekil 14: Histolojik tiplere göre miRNA-210 ekspresyonlarının kat artışları

Çalışmamıza dahil edilen BHBHK'lere ait metastatik odakların miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon kat artışları Şekil 15 ve 16'da ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 15: Metastatik odaklardaki miRNA-21 ekspresyonlarının kat artışları



Şekil 16: Metastatik odaklardaki miRNA-210 ekspresyonlarının kat artışları

Berrak hücreli böbrek hücreli karsinomlarda sağlıklı böbrek dokusuna göre miRNA-21 ekspresyonları 34 olguda artmakta olup, ekspresyon artışı anlamlı olarak farklıdır ( $p < 0,001$ ). PBHK'lerde sağlıklı böbrek dokusuna göre olguların tümünde miRNA-21 ekspresyon artışı mevcuttu. KBHK'lerde sağlıklı böbrek dokusuna göre miRNA-21 ekspresyonları 5 olguda artmakta, 6 olguda ise azalmakta olup ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 0,763$ ) (Tablo 10).

Tablo 10: Sağlıklı böbrek dokusuna göre histolojik alt tiplerde miRNA-21 ekspresyon durumları

Histolojik tip	Ekspresyon Durumu	Olgu sayısı	Yüzde	P Değeri
<b>Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom</b>	Artan ekspresyon	34	97,1	<b>&lt;0,001</b>
	Değişmeyen ekspresyon	1	2,9	
	Toplam	35	100,0	
<b>Papiller böbrek hücreli karsinom</b>	Artan ekspresyon	9	100,0	
<b>Kromofob böbrek hücreli karsinom</b>	Artan ekspresyon	5	45,5	<b>0,763</b>
	Azalan ekspresyon	6	54,5	
	Toplam	11	100,0	

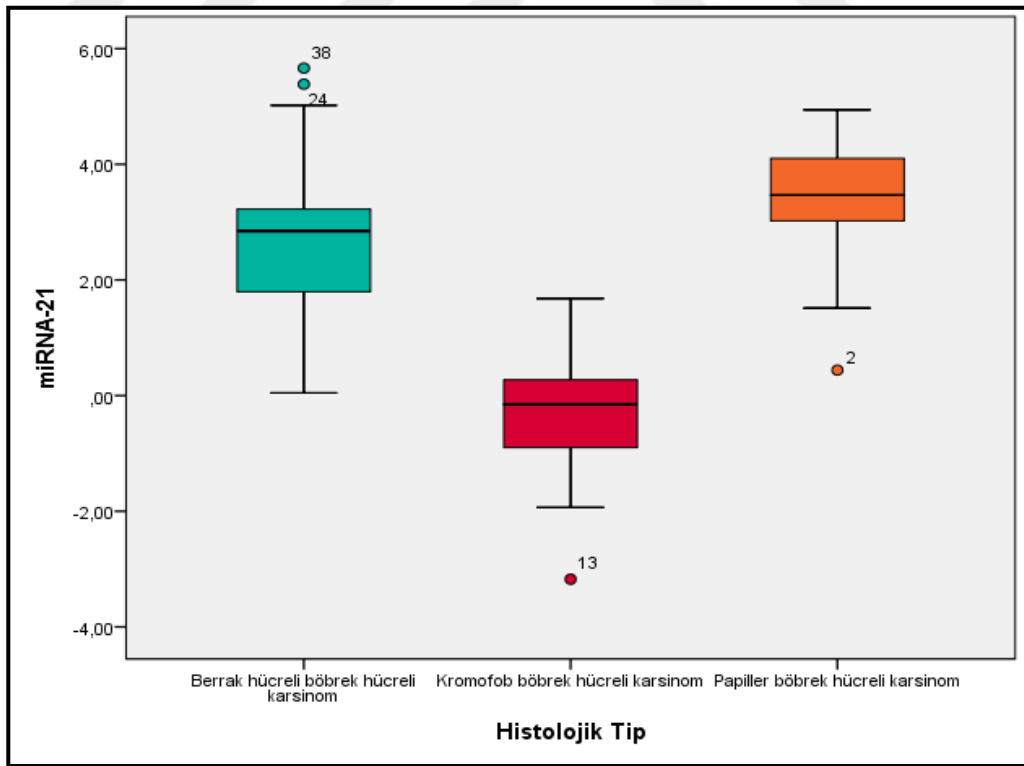
Berrak hücreli böbrek hücreli karsinomlarda sağlıklı böbrek dokusuna göre olguların tümünde miRNA-210 ekspresyon artışı mevcuttu. PBHK'lerde sağlıklı böbrek dokusuna göre miRNA-210 ekspresyonları 8 olguda artmakta, 1 olguda ise azalmakta olup ekspresyon artışı anlamlı olarak farklıdır (p=0,02). KBHK'lerde ise sağlıklı böbrek dokusuna göre olguların tümünde miRNA-210 ekspresyon azalışı mevcuttu (Tablo 11).

Tablo 11: Sağlıklı böbrek dokusuna göre histolojik alt tiplerde miRNA-210 ekspresyon durumları

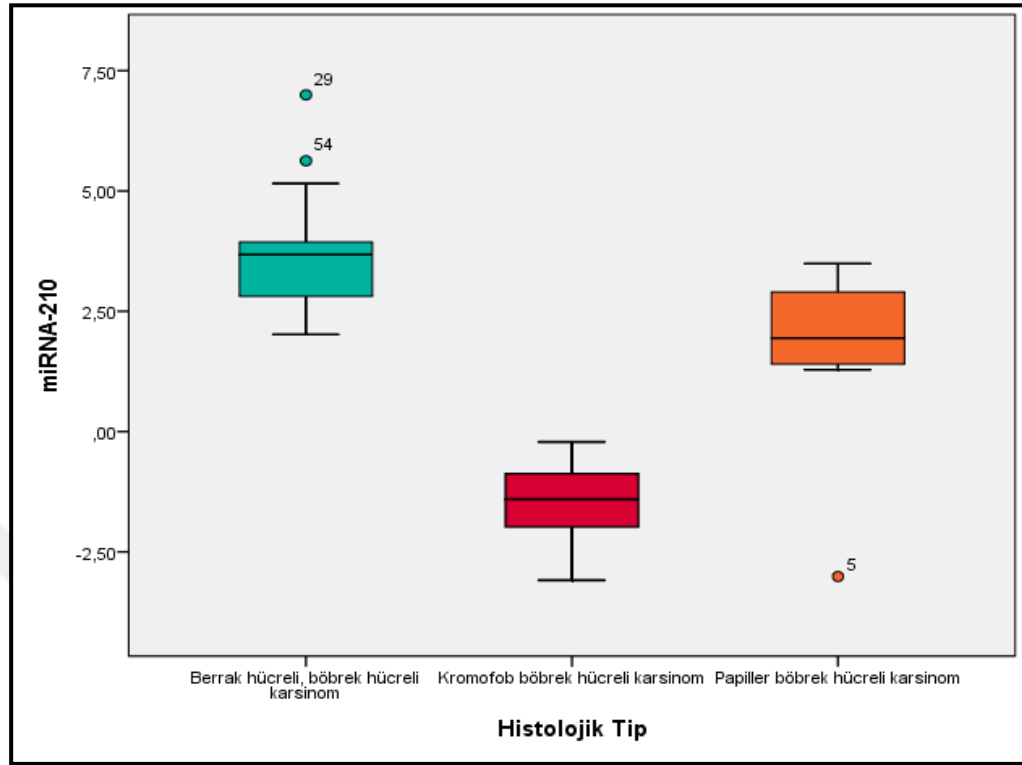
Histolojik Tip	Ekspresyon Durumu	Olgu Sayısı	Yüzde	P Değeri
<b>Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom</b>	Artan ekspresyon	35	100,0	
<b>Kromofob böbrek hücreli karsinom</b>	Azalan ekspresyon	11	100,0	
<b>Papiller böbrek hücreli karsinom</b>	Artan ekspresyon	8	88,9	<b>0,02</b>
	Azalan ekspresyon	1	11,1	
	Toplam	9	100,0	

MikroRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri ile hastaların yaşları, cinsiyetleri, tümör çapları, WHO/ ISUP dereceleri, lenfovasküler invazyon, sarkomatoid ya da rabdoid diferansiyasyona varlığı ve diferansiyasyon oranları, nekroz varlığı ve oranı ile istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ( $p>0,05$ ). Ayrıca WHO/ ISUP derece 1 ve 2 olgular “ düşük dereceli”, WHO/ ISUP derece 3 ve 4 olgular “ yüksek dereceli” şeklinde gruplanıp miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyonları karşılaştırıldı. Buna göre düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ( $p>0,05$ ).

Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom, PBHK ve KBHK histolojik alt tipleri arasında miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon farklarının anlamlılığı tek yönlü ANOVA testi ile karşılaştırıldı. Bu teste göre histolojik alt tipler arasında miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ ). ANOVA testinde kullanılan miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeylerinin log2 dönüşümü sonrası histolojik alt tiplere göre dağılımı (Şekil 17 ve 18) ve ANOVA testinin özeti verilmiştir (Tablo 12).



Şekil 17: Histolojik alt tiplerde log2 dönüşümü sonrası miRNA-21 dağılımları



Şekil 18: Histolojik alt tiplerde log2 dönüşümü sonrası miRNA-210 dağılımları

Tablo 12: Histolojik alt tiplere göre miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon farklarının anlamlılığı analizi (ANOVA)

		Olgu Sayısı	Ortalama	Standart Deviasyon	P Değeri
<b>miRNA-21</b> Ekspresyonu	<b>BHBHK</b>	35	2,7	1,3	<b>&lt;0.001</b>
	<b>KBHK</b>	11	-0,3	1,4	
	<b>PBHK</b>	9	3,2	1,5	
	<b>Toplam</b>	55	2,2	1,8	
<b>miRNA-210</b> Ekspresyonu	<b>BHBHK</b>	35	3,6	1,1	<b>&lt;0.001</b>
	<b>KBHK</b>	11	-1,5	0,9	
	<b>PBHK</b>	9	1,7	1,9	
	<b>Toplam</b>	55	2,3	2,4	

ANOVA analizi sonucu BK histolojik alt tiplerindeki miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeylerinde saptanan anlamlı farklılık Tukey's HSD testi ile ayrıntılı olarak incelenerek hangi histolojik alt tipler arasında fark olduğu belirlendi. Bu teste göre;

- BHBHK ile KBHK olguları arasında miRNA-21 ekspresyon düzeyleri karşılaştırması anlamlı olarak farklıdır ( $p<0,001$ ).
- PBHK ve KBHK olguları arasında miRNA-21 ekspresyon düzeyleri karşılaştırması anlamlı olarak farklıdır ( $p<0,001$ ).
- BHBHK ile PBHK olguları arasında miRNA-21 ekspresyon düzeyleri karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,530$ ).
- BHBHK ile KBHK olguları arasında miRNA-210 ekspresyon düzeyleri karşılaştırması anlamlı olarak farklıdır ( $p<0,001$ ).
- PBHK ile KBHK olguları arasında miRNA-210 ekspresyon düzeyleri karşılaştırması anlamlı olarak farklıdır ( $p<0,001$ ).
- BHBHK ve PBHK olguları miRNA-210 ekspresyon düzeyleri karşılaştırması anlamlı olarak farklıdır ( $p<0,001$ ).

miRNA-21 ve miRNA-210 için Tukey' HD testi Tablo 13' de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 13: Post Hoc Çoklu Karşılaştırma, Tukey's HSD

Bağımlı Değişken	Birincil Histolojik	İkincil Histolojik	P değeri
	Tip	Tip	
miRNA-21	BHBHK	KBHK	<0.001
	PBHK	KBHK	<0.001
	BHBHK	PBHK	0,530
miRNA-210	BHBHK	KBHK	<0.001
	PBHK	KBHK	<0.001
	BHBHK	PBHK	<0.001

Dokuz BHBHK metastaz dokusundan alınan örnek ile aynı hastaya ait 9 BHBHK primerinden alınan örnek miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla  $p=0,053$ ,  $p=0,237$ ). Yapılan Paired T Test Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14: Primer- metastatik tümör dokusu arasında miRNA-21 ve miRNA-210 anlamlılığı

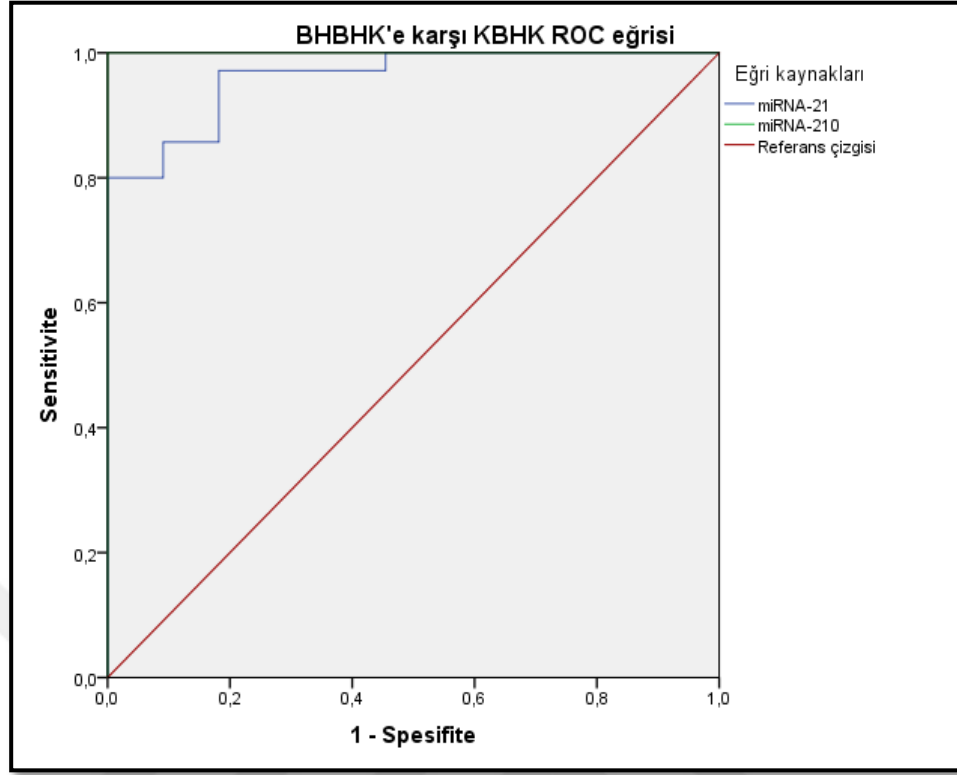
	Fark Ortalaması	Standart Sapma	95% CI	P değeri
<b>miRNA-21</b>	1,25296	1,65257	-,01732 - 2,52323	<b>0,053</b>
<b>miRNA-210</b>	,86321	2,02483	-,69322 - 2,41963	<b>0,237</b>

Metastaz yapmayan 21 BHBHK olgusuna ait primer dokular ile metastaz yapan 14 BHBHK olgusuna ait primer dokular miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla p=0,875, p=0,236). Yapılan T Test Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15: Metastaz yapmayan BHBHK ile metastaz yapan BHBHK olgularına ait primer dokular arasında miRNA-21 ve miRNA-210 anlamlılığı

	Metastaz	n	Ortalama	Standart Deviasyon	P değeri
<b>miRNA-21</b>	Pozitif	21	2,7321	1,05916	<b>0,875</b>
	Negatif	14	2,6619	1,56069	
<b>miRNA-210</b>	Pozitif	21	3,4131	,87054	<b>0,236</b>
	Negatif	14	3,8698	1,37502	

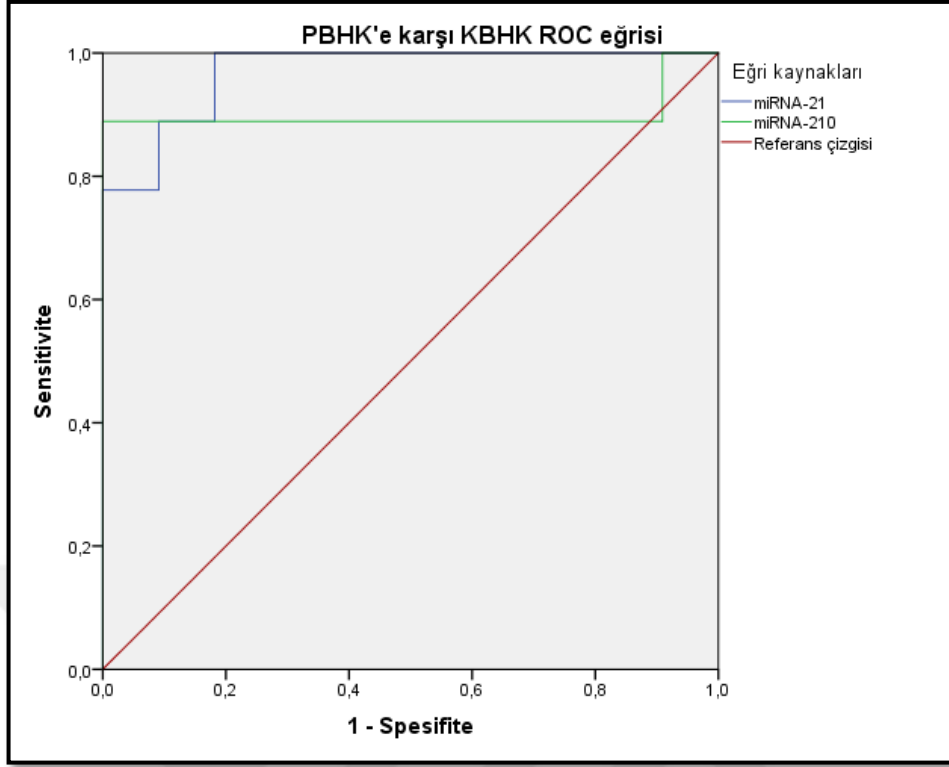
Berrak hücreli böbrek hücreli karsinomlar ile KBHK’ler arasında miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri bakımından anlamlı farklılık ayırımında kullanılabilir *cut-off* değeri ROC eğrisi analizi ile belirlendi. Bu analize göre BHBHK ile KBHK arasında hem miRNA-21 hem de miRNA-210 tanısal değeri bakımından anlamlı fark mevcut idi. BHBHK olgularını KBHK olgularından ayırmak için kullanılabilir miRNA-21 ekspresyon düzeyi için en uygun *cut-off* değeri 1,72 olarak saptandı (AUROC= 0,961, %95 CI, 0,909-1,000; p<0,001). BHBHK olgularını KBHK olgularından ayırmak için kullanılabilir miRNA-210 ekspresyon düzeyi için en uygun *cut-off* değeri 0,90 olarak saptandı (AUROC= 1, %95 CI,1,000-1,000; p<0,001). ROC analizi grafikleri Şekil 19’da ayrıntılı olarak verilmiştir. Belirlenen *cut-off* değerleri için BHBHK ile KBHK olguları arasında miRNA-21’in %80 sensitivite %100 spesifite; miRNA-210’un %100 sensitivite ve spesifite gösterdiği saptandı.



Şekil 19: BHBHK ile KBHK ayırımında miRNA-21 ve miRNA-210 için ROC eğrileri

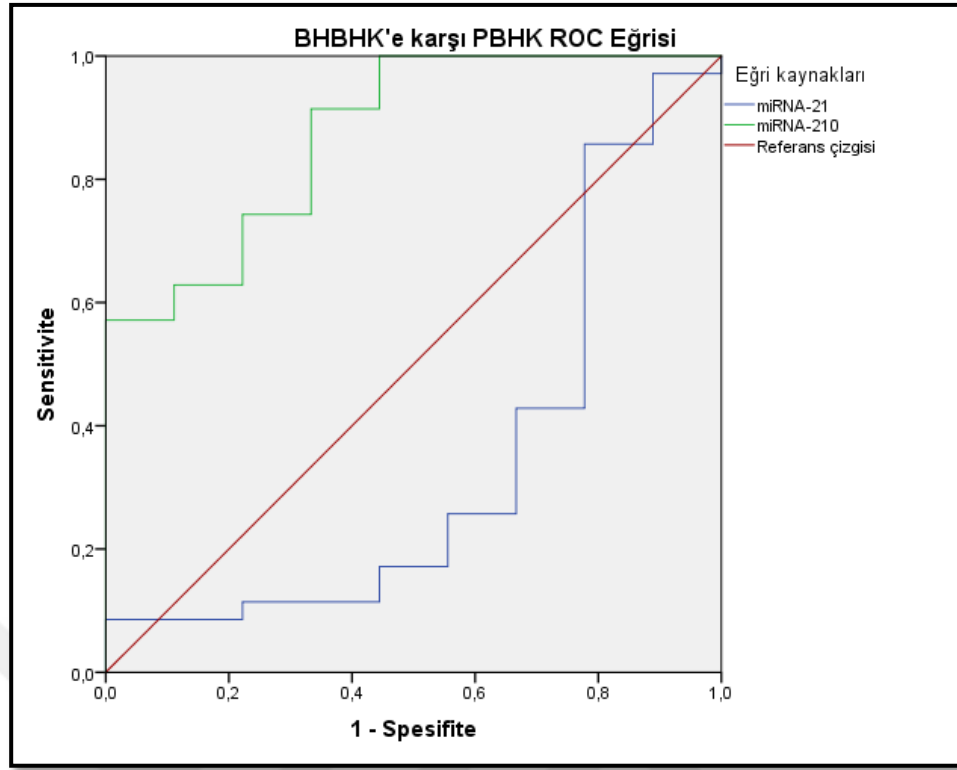
Papiller böbrek hücreli karsinomlar ile KBHK'ler arasında miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılık ayırımında kullanılacak *cut-off* değeri ROC eğrisi analizi ile belirlendi. Bu analize göre PBHK ile KBHK arasında hem miRNA-21 hem de miRNA-210 tanısal değeri bakımından anlamlı fark mevcut idi. PBHK olgularını KBHK olgularından ayırmak için kullanılacak miRNA-21 ekspresyon düzeyi için en uygun *cut-off* değeri 0,44 olarak saptandı (AUROC= 0,970, %95 CI, 0,906-1,000;  $p < 0,001$ ). PBHK olgularını KBHK olgularından ayırmak için kullanılacak miRNA-210 ekspresyon düzeyi için en uygun *cut-off* değeri 0,54 olarak saptandı (AUROC=0,899, %95 CI, 0,711-1,000;  $p=0,003$ ). ROC analizi grafikleri Şekil 20'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Belirlenen *cut-off* değerleri için PBHK ile KBHK olguları arasında miRNA-21'in %100 sensitivite %82 spesifite; miRNA-210'un %88 sensitivite ve %100 spesifite gösterdiği saptandı.





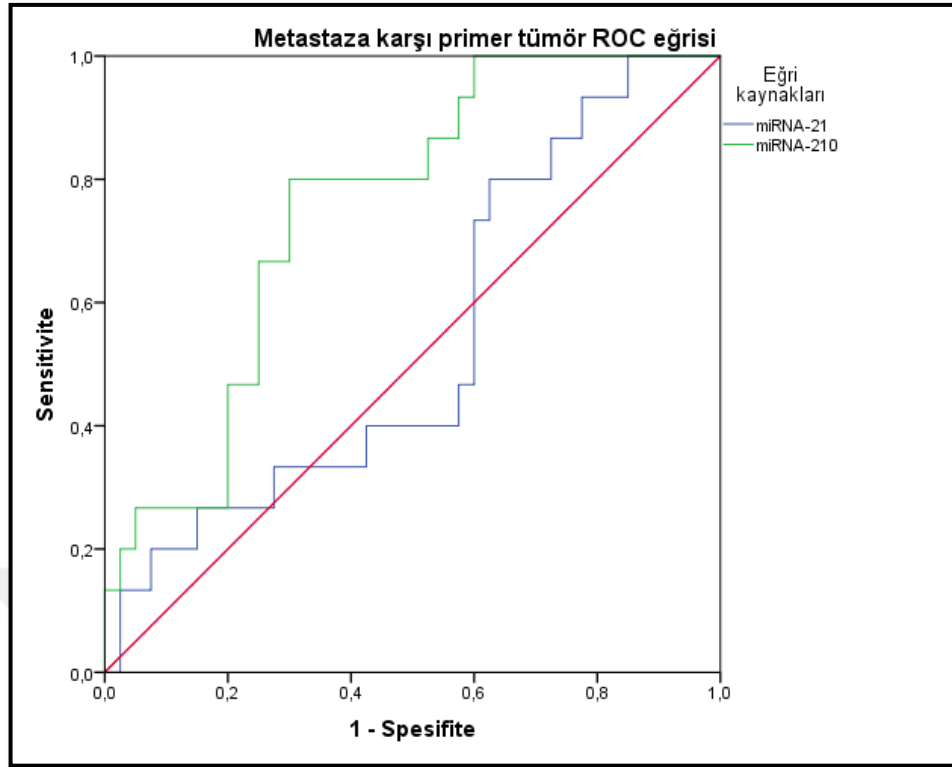
Şekil 20: PBHK ile KBHK ayırımında miRNA-21 ve miRNA-210 için ROC eğrileri

Berrak hücreli böbrek hücreli karsinomlar ile PBHK'ler arasında miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılık ayırımında kullanılacak *cut-off* değeri ROC eğrisi analizi ile belirlendi. Bu analize göre BHBHK ile PBHK arasında miRNA-210 tanısal değeri bakımından anlamlı fark mevcut idi. miRNA-21 ise bu ayırmda istatistiksel olarak anlamlı tanısal değere sahip değildi ( $p=0,150$ ). BHBHK olgularını PBHK olgularından ayırmak için kullanılacak miRNA-210 ekspresyon düzeyi için en uygun *cut-off* değeri 2,12 olarak saptandı (AUROC= 0,873 %95 CI, 0,749-0,997;  $p=0,001$ ). ROC analizi grafikleri Şekil 21'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Belirlenen *cut-off* değeri için BHBHK ile PBHK olguları arasında miRNA-210'un %91 sensitivite %67 spesifite gösterdiği saptandı.



Şekil 21: BHBHK ile PBHK ayırımında miRNA-21 ve miRNA-210 için ROC eğrileri

Metastaz izlenen olgulara ait primer BK olgularının miRNA ekspresyon düzeyleri ile tüm primer BK miRNA ekspresyon düzeylerinin metastazı öngörme açısından belirlenen *cut-off* değeri ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisi analizi ile belirlendi. Buna göre metastaz yapması beklenen primer BK için miRNA-210 tanısal değeri bakımından anlamlı fark mevcut idi. miRNA-21 ise istatistiksel olarak anlamlı tanısal değere sahip değildi ( $p=0,664$ ). Metastaz yapması beklenen ve beklenmeyen olguları ayırmak için kullanılabilecek miRNA-210 ekspresyon düzeyi için en uygun *cut-off* değeri 3,32 olarak saptandı (AUROC= 0,752 %95 CI, 0,619-0,884;  $p=0,004$ ). ROC analizi grafikleri Şekil 22’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Belirlenen *cut-off* değeri için metastaz yapması beklenen ve beklenmeyen olgular arasında miRNA-210’un %80 sensitivite, %70 spesifite gösterdiği saptandı. Metastaz yapması beklenen ve beklenmeyen olgular BHBHK histolojik alt tipi açısından ROC eğrisi analizi ile incelendiğinde miRNA-21 ve miRNA-210 istatistiksel olarak anlamlı tanısal değere sahip değildi (sırasıyla  $p=0,667$  ,  $p= 0,770$ ).



Şekil 22: Metastaz ile primer BK ayırımında miRNA-21 ve miRNA-210 için ROC eğrileri

Böbrek tümörü rezeksiyonu sonrası takipleri hastanemizde yapılan, takip süresi ve bilgisine ulaşılabilen 52 hastada, miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri ile genel sağkalım süreleri Cox regresyon testi ile karşılaştırılmıştır. Test sonucuna göre sadece miRNA-210 genel sağkalım üzerinde anlamlı etkiye sahipti ( $p=0,034$ ). Buna göre miRNA-210 ekspresyonu arttıkça histolojik tipten bağımsız olarak ölüm riski 1,7 kat artmakta idi ( $HR=1,729$ ). miRNA-21'in ise genel sağkalım üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,489$ ). Cox regresyon testi verileri Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16: miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri için genel sağkalım analizleri

	B	SE	Wald	df	P değeri	HR(95,0% CI)
<b>miRNA-21</b>	-,210	,304	,479	1	<b>0,489</b>	0,810(0,447-1,470)
<b>miRNA-210</b>	,547	,258	4,512	1	<b>0,034</b>	1,729(1,043-2,864)

## 5. TARTIŞMA

Böbrek karsinomları histolojik olarak sınıflandırılmakla birlikte, bazı durumlarda morfolojik ayrımın yapılması zor olabilmektedir. Böyle durumlarda ayırıcı tanıya katkı sağlayabilecek yöntemler arasında genetik araştırmalar yanı sıra miRNA ekspresyon profillerinin ortaya konması önerilmektedir (183). Bu çalışmada, sık karşılaşılan malign BK histolojik alt tipleri olan BHBHK, PBHK ve KBHK'lerde, miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeylerini araştırmayı ve klinikopatolojik veriler ile ilişkilerini ortaya koymayı amaçladık.

Çalışmamızda, miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeylerinin, BHBHK ve PBHK olgularında sağlıklı böbrek dokularına göre anlamlı düzeyde arttığını saptadık. KBHK'lerde ise miRNA-21 ekspresyon düzeyleri değişkenlik göstermekte olup, bazı olgularda ekspresyonda artış, bazı olgularda ise ekspresyonda azalma gösteriyordu. Bir başka deyişle, KBHK'lerde, miRNA-21 ekspresyon düzeyi bakımından anlamlı bir sonuca ulaşamadık. İlginç olarak tüm KBHK olgularında miRNA-210 ekspresyon düzeyleri sağlıklı böbrek dokularına göre belirgin şekilde azalmış idi. Bu çalışmada ayrıca, tümüyle BHBHK olgularından oluşan metastatik dokulardaki miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeylerini, primer BHBHK olgularına ait tümör dokuları ile karşılaştırdık. Metastatik odak ve primer tümör odağında, miRNA-210 ekspresyon düzeyleri bakımından fark saptanmadı; miRNA-21 ekspresyonu ise metastatik dokularda primer tümörlere göre artış gösterdi, ancak bu artış istatistiksel incelemede anlamlı fark oluşturmadı. Fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da anlamlılığa yakındı ( $p=0,053$ ).

MikroRNA-21, üzerinde en fazla çalışılan ve onkojenik etki gösterdiği bilinen miRNA'lardan biridir. Çeşitli çalışmalarda, meme kanseri (161) ve glioblastomda (165) miRNA-21 ekspresyonunda, sağlıklı referans dokulara göre artış olduğu gösterilmiştir.

Hipoksidede patofizyolojik olaylar ile ilişkili olduğu bilinen bir miRNA olan miRNA-210 ise bir çok solid tümörde ekspresyon artışı göstermektedir. Gee ve arkadaşlarına ait bir çalışmada, baş boyun kanserlerinde, miRNA-210 ekspresyonunda sağlıklı referans dokulara göre ekspresyon artışı gösterilmiştir (191).

Literatürde, böbrek karsinomlarında, özellikle BHBHK ve PBHK histolojik alt tiplerinde olmak üzere miRNA-21 ve miRNA-210'un önemini araştıran çeşitli çalışmalar mevcuttur (169, 170, 179, 192-211).

PI-3 kinaz-Akt/PTEN sinyal yolağı bozukluklarının BHK gelişiminde önemli olduğu, miRNA-21'in PTEN tümör süpresör genini hedefleyerek onkojenik etki gösterdiği bildirilmektedir (169). Bizim çalışmamızda da BHBHK olgularında sağlıklı böbrek dokusuna göre miRNA-21 ekspresyon artışı bu nedenle şaşırtıcı değildir. Diğer yandan literatürde, PBHK'lerde miRNA-21 ekspresyonunda artış bildiren genetik temelli bir çalışmaya ulaşamamıştır. Bu çalışmada PBHK'lerde tespit ettiğimiz miRNA-21 ekspresyon artışı, PBHK'lerde sıklıkla izlenen trizomiler ya da ekspresyon artışını baskılayacak bir gene sahip kromozom kayıpları (76) olabilir. Bu çalışmada, literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, KBHK'lerde eksprese edilen miRNA-21 ekspresyon düzeyleri, sağlıklı böbrek dokusuna göre anlamlı fark göstermemiştir. KBHK'lerdeki bu dalgalı miRNA-21 ekspresyon ifadesi, KBHK olgularında çok sayıda farklı kromozomal değişikliğin (94) bulunması ile ilişkili olabilir. Nitekim Chow ve arkadaşlarına ait çalışmada, kromozomal değişikliklerin, KBHK olgularında olmasa bile BHBHK olgularında, önceden eksprese olduğu bilinen miRNA'larda ekspresyon değişikliklerine yol açabileceği bildirilmiştir (196).

Literatürde, çalışmamıza ters olarak miRNA-21 ekspresyonunun BK'lerde azalabildiğine dair tek bir çalışma bulunmaktadır (212). Bu çalışmada, BK içeren böbreklerin sağlıklı dokularında da, tümörde izlenen metilasyon vb. değişiklikler nedeniyle farklı miRNA ekspresyonları olabileceği ve bu durumun sonuçları etkileyebileceği savunulmuştur. Bu çalışmada saptanan farklı sonucun nedeni, literatürdeki diğer tüm çalışmalardan farklı olarak, kontrol olarak kullanılan doku örneğinin, üst ürotelyal karsinom nedeniyle opere olmuş BK içermeyen olgulara ait sağlıklı böbrek dokularının kullanılmış olması olabilir. Ayrıca sağlıklı doku örneği sayısının, miRNA ekspresyonunu değerlendirmede kullanılan doku örneği sayısından az olması ve bu örneğin karşılaştırma yapılan hastaya ait olmaması, uygun bir normalizasyonun yapılmasını kısıtlamış olabilir. Bir diğer olası neden, miRNA ekspresyonu normalizasyonunda farklı formüllerin kullanılması ile açıklanabilir. Bu

bakımdan normalizasyon işlemi için hangi dokuların “normal/ sağlıklı” olarak seçileceği önemli bir konudur.

Von Hippel Lindau tümör süpresör geninde ya da bu genin fonksiyonunda meydana gelen kayba bağlı olarak hücre içinde biriken *Hypoxia-Inducible Factors (HIFs)* (*Hipoksi ile uyarılabilir faktörler*)’in, özellikle BHBHK tümörögenesinde rol oynadığı bilinmektedir (179, 180). miRNA-210 artışı tam olarak açıklanmış olmasa da, HIFs birikiminin bu mekanizmaya katkı sağladığı bildirilmiştir (178). Bazı çalışmalarda ise miRNA-210 ekspresyonunun apoptozu engellediği bildirilmiştir (177). Çalışmamızda, BHBHK’lerde gösterdiğimiz miRNA-210 ekspresyon artışı, literatürde yer alan BHBHK’lerdeki miRNA-210 ekspresyon artışı ile uyumludur. Öte yandan, literatürde PBHK’lerde de bildirilen miRNA-210 ekspresyon artışı, PBHK’lerde VHL geninde fonksiyon kaybı nadir olduğundan kafa karıştırıcıdır. Bir çalışmada, artan miRNA-210 ekspresyon düzeyleri anti-miRNA inhibitörleri ile azaltılmış ve sonrasında, miRNA-210’un apoptoz ve/veya proliferasyon artışı ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Bu sonuca dayanarak BHBHK gelişiminde farklı başka yolların da etkili olabileceği öne sürülmüştür (200).

Bilgimiz dahilinde literatürde sadece KBHK’ler ile yapılmış miRNA ekspresyonları ile ilgili tek bir çalışma bulunmaktadır (205). Ge ve arkadaşlarına ait bu çalışmada, 58 olgudan oluşan KBHK grubu, 22 olgudan oluşan KBHK çevresi sağlıklı böbrek dokusu ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, 25 ayrı miRNA ekspresyonunda artış, 80 miRNA ekspresyonunda ise azalma saptanmıştır. Ekspresyon artışı bildirilen miRNA’lardan biri miRNA-210’dur (205). Bizim çalışmamızda ise literatürdeki bu bulgunun tersine, tüm KBHK olgularında sağlıklı böbrek dokusuna göre miRNA-210 ekspresyon seviyelerinde azalma belirledik. Bu farklılık, bir diğer çalışmada (213) belirtildiği üzere, kanserlerde saptanan kromozomal kayıpların, genellikle tümör süpresör genlerin olduğu bölgeler ile ilişkili olmasından kaynaklanabilir. Literatürde BHBHK, PBHK ve KBHK histolojik alt tiplerde ekspresyon artışı gösteren miRNA-210; bizim çalışmamızda BHBHK ve PBHK grubunda artış, KBHK grubunda ise azalma göstermiştir. KBHK grubunda saptadığımız miRNA-210 ekspresyon kaybı, ilgili miRNA ekspresyonunda görevli kromozom bölgesinin silinmiş olmasıyla ilişkili olabilir. KBHK olgularında bildirilen çok sayıda kromozom kaybı (94) bu konudaki görüşümüzü destekleyebilir.

Böbrek karsinomlarında en önemli prognostik faktörlerden biri tümörün anatomik yayılımı, bir başka deyişle tümör evresidir. Metastatik hastalarda ise prognoz için çeşitli klinik parametreler kullanılmaktadır. Literatürde, miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik parametreleri karşılaştıran çalışmalarda birbirinden farklı bulgular mevcuttur. Ayrıca bu çalışmalardaki karşılaştırmalar genellikle BHBHK histolojik tipi için uygulanmış olup, PBHK ve KBHK alt tiplerine ait bilgilerimiz sınırlıdır. Bir çalışmada, BHBHK'lerde, miRNA-21 ve miRNA-210'daki ekspresyon artışı tümörün histolojik derecesi ve patolojik evresi ile ilişkili bulunmamıştır (195). Bir diğer çalışmada, BHBHK'lerde miRNA-210 ekspresyon düzeyindeki artışın, tümör çapı, tümörün histolojik derecesi ve patolojik evresini etkilemediği bildirilmiştir (207). BK'lerde miRNA-21 ekspresyonunda azalma bildiren bir başka çalışmada, miRNA-21 ekspresyon düzeyi ile yaş, cinsiyet, tümör histolojik derecesi ve patolojik evre arasında ilişki gösterilememiştir (212). Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyonları düzeyleri ile yaş, cinsiyet, tümör histolojik derecesi, patolojik evre, lenfovasküler invazyon ve nekroz varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptamadık. Bu konuyla ilgili farklı bir sonuç, Zaman ve arkadaşları ile Verghe ve arkadaşlarına ait çalışmalarda bildirilmiştir (169, 193). Buna göre BHBHK'lerde miRNA-21 ekspresyonu arttıkça, tümörün patolojik evresi artmaktadır. Faragalla ve arkadaşlarına göre ise miRNA-21 ekspresyonunda artış, hem tümörün histolojik derecesi hem de tümör evresi ile pozitif korelasyon göstermektedir (192). Bir başka çalışmada, BHBHK'lerde miRNA-210 ekspresyonu arttıkça, tümör histolojik derecesi ve lenf nodu metastazı riski artmış olarak bildirilmiştir (199). McCormick ve arkadaşları ise, BHBHK'lerde miRNA-210 ekspresyon artışının daha düşük tümör histolojik derecesi ve tümör evresi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (179). Çalışmalar arasındaki bu farklı sonuçlar, miRNA'ların çok sayıda biyolojik olayda rol almasından kaynaklanıyor olabilir. Bu bakımdan tüm histolojik alt tipleri kapsayan geniş serilerde yapılmış yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Youssef ve arkadaşları, taze dondurulmuş dokularda mikroarray yöntemi ile yaptıkları dört basamaktan oluşan çalışmalarında, miRNA-21'in de içinde bulunduğu 15 miRNA için farklı ekspresyon düzeyleri bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucu, BK'ler, sağlıklı böbrek dokusundan belirlenen miRNA'lar yardımıyla %97

sensitivite ile; BK alt tipleri ise kendi aralarında %100 sensitivite ile ayrılabilir (214). Bu çalışmada kullanılan yöntem ve basamakların oldukça uzun, zahmetli ve maliyetli oluşu, çalışmanın klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Bir diğer çalışmada, miRNA-21 ekspresyonu yardımıyla, BHBHK ve PBHK ile KBHK ve onkositom arasında %83 sensitivite %90 spesifite ile ayırım yapılabileceği gösterilmiştir. Histolojik alt tipler arasında daha net ayırım yapabilmek için daha fazla miRNA'ya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (192). Silva-Santos ve arkadaşları ise miRNA-21'in BHBHK- KBHK ile PBHK-KBHK ayırımında kullanılabileceği fakat BHBHK- PBHK ayırımında ise yeterli olmadığını ifade etmişlerdir (212). Faragalla ve arkadaşları ile Silva-Santos ve arkadaşlarının çalışmalarında, histolojik alt tipleri ayırt etme bakımından benzer sonuçlar bildirilmiştir. Bizde çalışmamızda miRNA-21 ekspresyon düzeyi ile BHBHK-KBHK ve PBHK-KBHK ayırımı yapılabildiğini fakat BHBHK-PBHK ayırımı için yeterli olmadığını saptadık.

Valera ve arkadaşlarına ait bir çalışmada miRNA-210 ekspresyon artışının histolojik alt tip açısından BHBHK ve BHBHK olmayan tümörleri ayırabileceği gösterilmiştir (199). Diğer bir çalışmada, BHBHK'lerde artmış miRNA-210 ekspresyonunun benign-malign ayırımında %87 sensitivite, %94 spesifite ile kullanılabileceği saptanmıştır (203). Bir diğer çalışmada, miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon artışı ile BHBHK'yı sağlıklı böbrek dokusundan sırasıyla %100 sensitivite, %96 spesifite ve %100 sensitivite, %95 spesifite ile ayırmak mümkündür (215). Wach ve arkadaşları ise, BK alt tipleri arasında ayırım yapmayı sağlayacak miRNA setleri oluşturmuş ve bu setlerden miRNA-145, miRNA-210, miRNA-200c ve miRNA-502-3p yardımıyla, BK ve sağlıklı böbrek dokusunu %86,5 doğruluk payıyla ayırabildiklerini göstermişlerdir. Bu miRNA'lar arasında özellikle miRNA-210'un ayırında önemli olduğu belirtilmiştir. BHBHK- PBHK ayırımında miRNA-145 ve miRNA-520-3p'in %77,6 doğruluk payıyla; PBHK alt tipleri olan Tip1 ve Tip2 ayırımında ise miRNA-210 ve let-7c kombinasyonunun %86,4 doğruluk payıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (202). Kendi çalışmamızda, literatür bilgilerinden yola çıkarak seçtiğimiz iki farklı miRNA ile (miRNA-21 ve miRNA-210), üç farklı histolojik alt tip ve ayrıca metastatik BHBHK olgularında, seçtiğimiz miRNAlar bakımından farklılıkları ortaya koymak ve klinikopatolojik veriler ile ilişkisini araştırmak istedik. Buna göre çalışmamız literatür bilgileri ile benzer doğrultuda olup



sadece iki farklı miRNA kullanımı ile histolojik alt tipler arasında yüksek sensitivite ve spesifite ile ayırım yapabilmenin mümkün olduğunu gösterdik. Önceki çalışmalarda (214, 216, 217) bildirildiği üzere, BHBHK ve PBHK'ler, böbrek korteksinde bulunan proksimal tübüllerden köken almaktadır ve bu ortak özellik nedeniyle benzer miRNA imzalarına sahiplerdir. Bu özellik her iki histolojik alt tip arasındaki ayırımı kısıtlayabilmektedir. Bu çalışmada da, seçtiğimiz miRNA tiplerinin özellikle BHBHK ve PBHK olguları arasında ayırım gücünün düşük kalması, az önce belirtilen nedene ve vaka sayısının azlığına bağlı olabilir.

Böbrek karsinomlarında metastaz riski yanı sıra tümörde saptanan diferansiyasyon alanlarının miRNA'lar ile ilişkisinin önemini araştıran çeşitli çalışmalar mevcuttur. Reis ve arkadaşları, translayon sonrası düzeyde miRNA-21 ile kontrol edilen bir tümör süpresör olan PDCD4 geninin, miRNA-21 ekspresyon düzeyindeki artış sonucu baskılanması yoluyla, oral skuamöz hücreli karsinomlarda metastaz ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (218). Bir başka çalışmada, miRNA-21 ekspresyonunun, BHBHK, PBHK, KBHK ve sarkomatoid diferansiyasyon gösteren BK'lerde arttığı; ve bu artış ile ilişkili olarak metastaz riskinin de arttığı gösterilmiştir (209). Wotschofsky ve arkadaşlarına ait çalışmada, metastatik BHBHK'ler ile metastatik olmayan BHBHK'ler çeşitli miRNA ekspresyon düzeyleri bakımından karşılaştırılmıştır. Buna göre metastatik BHBHK'lerde metastatik olmayanlara göre, artışı gösterilen miRNA-122'in azaldığı, azaldığı gösterilen miRNA-514'ün ise azalma eğiliminin ivme kazanarak devam ettiği bildirilmiştir. miRNA-210'un da aralarında bulunduğu diğer bazı miRNA'larda ise anlamlı düzeyde bir ekspresyon artışı gösterilememiştir (203). Çalışmamızda literatürden farklı olarak metastatik olan ve olmayan BHBHK'ler arasında, miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyonları bakımından anlamlı fark saptamadık. Bununla birlikte, tüm histolojik grupları bir arada değerlendirdiğimizde, belli bir *cut-off* değeri üzerindeki miRNA-210 ekspresyonunun BK'lerde metastaz riskini arttırdığını belirledik. Metastaz riskini yansıtması bakımından anlamlı bir fark durumunu, miRNA-21 ekspresyon düzeyi için saptamadık. Metastaz durumuyla ilgili elde ettiğimiz verilerin literatürden farklı olması, miRNA ekspresyonunun kişiye bağlı biyolojik olaylar ile değişim gösterebilmesine, tümör heterojenitesine bağlı farklılık gösterebilmesine ve olgu sayısının azlığına bağlı olabilir. Ayrıca bu tümörlerde

metastaz mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte bu çalışmada belirttiğimiz üzere, miRNA-210 düzeylerindeki artışın, hastaların yakın klinik takibi adına uyarıcı bir bulgu olabileceğini düşünmekteyiz. En çok metastaz yapan histolojik alt tip olan BHBHK için, metastaz yapması beklenen olgular bakımından *cut-off* değeri, olgu sayısının azlığı nedeniyle belirlenememiştir. Bu aşamada, daha fazla sayıda metastatik olgu içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde, miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeylerindeki artış, çeşitli solid tümörlerde kötü prognosis ile ilişkili bildirilmiştir (219, 220). Benzer şekilde, bir çalışmada, miRNA-21 ekspresyon artışının BHBHK'lerde kötü prognostik faktör olduğu ve bu artışın özellikle kanser spesifik sağkalımı azalttığı vurgulanmıştır (221). Silva-Santos ve arkadaşlarına ait çalışmada, yüksek miRNA-21 ve miRNA-155 ile düşük miRNA-141 ekspresyon düzeylerinin, düşük kanser spesifik sağkalım ile korele olduğu gösterilmiştir (212). Diğer bazı çalışmalarda ise, miRNA-21 ekspresyon artışının genel sağkalım üzerinde negatif etkisi olduğu, kanser spesifik sağkalım ile ilişki göstermediği bildirilmiştir (11, 193, 209, 210). Ge ve arkadaşlarının sadece KBHK'lerden oluşan olgularda yaptığı çalışmada, miRNA-210 ekspresyonundaki artış, düşük genel sağkalım ile ilişkili bildirilmiştir. Bununla birlikte, artan miRNA210'un, esasen hastalısız sağkalım üzerinde daha yüksek etkiye sahip bağımsız bir kötü prognostik faktör olduğu vurgulanmıştır (205). Bir diğer çalışmada, miRNA-210 ekspresyon artışının düşük sağkalım ve kötü prognosisla ilişkili olduğu belirtilmiştir (207). Öte yandan, miRNA-21 ve miRNA-210'un da içinde bulunduğu miRNA profillerinin değerlendirildiği diğer bazı çalışmalarda, ekspresyon artışının sağkalımla ilişki göstermediği (195) veya daha iyi prognosisla ilişkili olduğuna dair veriler de mevcuttur (179). Redova ve arkadaşlarına ait çalışmada, Anti-miR-210 ile tranfekte edilen hücre kümelerinde, azalan miRNA-210 nedeniyle hücrelerin canlılığında azalma ve mitoz siklusunun G2 evresinde kümelenmede artış gözlenmiştir. miRNA-210 seviyesindeki düşüş ile birlikte, metastatik tümör hücrelerinde invazyon ve göç yeteneğinde azalma meydana gelmiştir (180). Çalışmamızda, literatüre benzer şekilde, miRNA-210 ekspresyon artışı, histolojik alt tipten bağımsız olarak, düşük genel sağkalım ile ilişkili saptanmıştır; miRNA-21 ekspresyonu ile genel sağkalım üzerinde anlamlı sonuç elde edilmemiştir. miRNA-21 ekspresyon düzeyleri ile sağkalım arasında anlamlı bir

bulgu saptamayışımız, vaka sayımızın azlığı nedeniyle histolojik alt tip ayrımı yapmaksızın genel sağkalım hesabı yapmamıza bağlı olabilir. Böyle bir değerlendirme, dahil edilen KBHK olgularındaki değişken miRNA-21 düzeyleri nedeniyle anlamlı sonuca ulaşmamızı zorlaştırmış olabilir. Olgu sayımız sınırlı olduğu için histolojik alt tiplere özel sağkalım değerlendirmesi uygulanamamıştır.

nemli bir diğer bilgi, serum miRNA seviyelerinin dokulardan elde edilen miRNA düzeyleri ile uyumluluk gösterdiğidir (204, 222-224). Asangani ve arkadaşlarına ait çalışmada, Anti-miR-21 ile transfekte edilen birçok kanserde, tümör hücrelerinde çoğalma, invazyon ve g yeteneğinde azalma gösterilmiştir (225). Benzer şekilde bir diğer çalışmada, Anti-miR-21 ile transfekte edilen glioblastom hücrelerinde apoptozda artış gösterilmiştir (226). Anti-miR-21 ile tedavi edilen metastatik meme kanseri hastalarının incelendiği bir diğer çalışmada ise, akciğer metastazları sayısında azalma tespit edilmiştir (227). Mevcut bilgiler, BK olgularında değişikliğe uğramış miRNA profili ortaya koyulduğu, buna yönelik miRNA temelli tedavi yaklaşımlarını gündeme getirmektedir. Bu yaklaşım, BK tanılı olguların aynı zamanda serum miRNA seviyeleri ile klinik olarak takip edilmesini, olası rekürrens veya metastazların önceden saptanmasını kolaylaştırabilir.

Tüm literatür verilerini ve kendi çalışmamızın sonuçlarını birlikte değerlendirdiğimizde miRNA'ların gelecekte böbrek tümörlerinin histolojik alt tiplerini ayırt etmemizde, olası agresif seyiri ve metastaz yapabilme olasılığını öngörmede, ve metastatik olgularda hedefe yönelik tedavi programını planlamada klinisyene yardımcı potansiyel biyobelirteç olabilecekleri görülmektedir.

Bu konuda daha fazla hasta sayısı içeren çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızda 2012-2018 yılları arasında İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde böbrek karsinomu tanısı almış 55 olgu (35 adet BHBHK, 11 adet KBHK, 9 adet PBHK) ve mevcut olgulardan 9'una ait metastatik odağın doku örnekleri miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri belirlenmek üzere kullanıldı. Bu çalışmanın sonuçlarına göre:

- MikroRNA-21 ekspresyonu BHBHK'lerin %97,1'inde artmış, KBHK'lerin %54,5'inde artmış, %45,5'inde azalmış, ve PBHK'lerin %100'ünde artmış olarak saptandı.
- MikroRNA-210 ekspresyonu BHBHK'lerin %100'ünde artmış, KBHK'lerin %100'ünde azalmış ve PBHK'lerin %88,9'unda artmış olarak saptandı.
- Metastatik odakların %100'ünde miRNA-21 ekspresyonu artmış, %88,9'unda ise miRNA-210 ekspresyonu artmış olarak saptandı.
- Metastaz tespit edilmemiş 21 primer BHBHK olgusu ile metastaz tespit edilmiş 14 adet primer BHBHK olgusunda miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı.
- MikroRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri ile hasta yaşı, cinsiyet, tümör çapı, WHO/ ISUP derecesi, düşük ve yüksek WHO/ ISUP derecelerine sahip olma durumu, lenfovasküler invazyon, sarkomatoid ya da rabdoid diferansiyasyona varlığı ya da diferansiyasyon oranları, nekroz varlığı ya da oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.
- Histolojik alt tiplere göre miRNA-21 ve miRNA-210 ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptandı.
  - Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom ile KBHK arasında anlamlı farklılık açısından *cut-off* değeri miRNA-21 için 1,72, miRNA-210 için 0,90 olarak belirlendi. Bu iki histolojik tip sırasıyla %80 ve %100 sensitivite, %100 spesifite ile ayrılabilmekteydi.
  - Papiller böbrek hücreli karsinom ile KBHK arasında anlamlı farklılık açısından *cut-off* değeri miRNA-21 için 0,44, miRNA-210 için ise 0,54 olarak belirlendi. Bu iki histolojik tip sırasıyla %100 ve %88 sensitivite, %82 ve %100 spesifite ile ayrılabilmekteydi.

- Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom ile PBHK arasında anlamlı farklılık açısından *cut-off* değeri miRNA-210 için 2,12'idi. Bu iki histolojik tip arasında %91 sensitivite, %67 spesifite ile ayrılabilmekteydi. miRNA-21 ise iki tip arasında ayırım için kullanılamayacak nitelikte idi.
- Böbrek karsinomları arasında metastaz yapması beklenen olguları, metastaz yapması beklenmeyen olgulardan ayırım için kullanılabilecek miRNA-210 *cut-off* değeri 3,32 idi. Buna göre miRNA-210 %80 sensitivite, %70 spesifite ile metastaz yapması beklenen olguları ayırabilmekteydi. miRNA-21 için bu açıdan tanısal değer saptanmadı.
- BHBHK alt tipinden oluşan grupta metastazı öngörme açısından yapılan ROC eğrisi analizinde miRNA-21 ve miRNA-210'un anlamlı değere sahip olmadığı görüldü.
- Genel sağkalımı belirlemede histolojik alt tipten bağımsız olarak miRNA-210 ekspresyon düzeyinin kullanılabileceği saptanmıştır. Buna göre miRNA-210 ekspresyon düzeyi arttıkça ölüm riski 1,7 kat artmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Moch H, Amin MB, Argani P, Chevillie J, Delahunt B, Martignoni G, et al. Renal cell tumours, Introduction. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4 ed. Lyon, France: IARC; 2016. p. 14-7.
2. Zhou M, Hattab MA, Eble JN, Cheng L. Neoplasms of the Kidney. In: Zhou M, Magi-Galluzzi C, editors. Genitourinary Pathology. Foundations in Diagnostic Pathology. 2 ed. Philadelphia, PA: Saunders, Elsevier; 2015. p. 306-77.
3. Crispen PL, Breau RH, Allmer C, Lohse CM, Chevillie JC, Leibovich BC, et al. Lymph node dissection at the time of radical nephrectomy for high-risk clear cell renal cell carcinoma: indications and recommendations for surgical templates. *Eur Urol.* 2011;59(1):18-23.
4. Wang J, Zhao J, Shi M, Ding Y, Sun H, Yuan F, et al. Elevated expression of miR-210 predicts poor survival of cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(2):e89223.
5. Qin Q, Furong W, Baosheng L. Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33:50.
6. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2999-3004.
7. Gordanpour A, Nam RK, Sugar L, Seth A. MicroRNAs in prostate cancer: from biomarkers to molecularly-based therapeutics. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2012;15(4):314-9.
8. Li M, Wang Y, Song Y, Bu R, Yin B, Fei X, et al. MicroRNAs in renal cell carcinoma: a systematic review of clinical implications (Review). *Oncol Rep.* 2015;33(4):1571-8.
9. Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, Posorski N, Steiner T, Wunderlich H, et al. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World J Urol.* 2011;29(3):367-73.
10. Heinzelmann J, Unrein A, Wickmann U, Baumgart S, Stapf M, Szendroi A, et al. MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma: a comparison of primary tumors and distant metastases. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(3):1046-54.
11. Ge YZ, Wu R, Xin H, Zhu M, Lu TZ, Liu H, et al. A tumor-specific microRNA signature predicts survival in clear cell renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(7):1291-9.
12. Türkyılmaz M, Hacıkamiloğlu E, Baran Deniz E, Boztaş G, Dündar S, Kavak Ergün A, ve ark. Türkiye Kanser İstatistikleri 2015. Kara F, İlter H, Keskinçelik B, editors. Ankara: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu; 2018.
13. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2011;60(4):615-21.

14. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet*. 2008;371(9612):569-78.
15. Renehan AG, Soerjomataram I, Tyson M, Egger M, Zwahlen M, Coebergh JW, et al. Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. *Int J Cancer*. 2010;126(3):692-702.
16. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. 2005;114(1):101-8.
17. Cho E, Adami HO, Lindblad P. Epidemiology of renal cell cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25(4):651-65.
18. McLaughlin JK, Lindblad P, Møller A, McCredie M, Mandel JS, Schlehofer B, et al. International renal-cell cancer study. I. Tobacco use. *Int J Cancer*. 1995;60(2):194-8.
19. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*. 2008;167(4):438-46.
20. Denton MD, Magee CC, Ovuworie C, Mauryedi S, Pascual M, Colvin RB, et al. Prevalence of renal cell carcinoma in patients with ESRD pre-transplantation: A pathologic analysis. *Kidney International*. 2002;61:2201-9.
21. Scott CS, Jinot J. Trichloroethylene and cancer: systematic and quantitative review of epidemiologic evidence for identifying hazards. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8(11):4238-72.
22. Eble JN, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I. WHO Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 3 ed. Lyon: IARC; 2004.
23. Gibbons RP, Montie JE, Correa J, R. J. , Mason JT. Manifestations of Renal Cell Carcinoma. *Urology*. 1976;8:201-6.
24. Palapattu GS, Kristo B, Rajfer J. Paraneoplastic Syndromes in Urologic Malignancy: The Many Faces of Renal Cell Carcinoma. *Reviews in Urology*. 2002;4:163-70.
25. Delahunt B, Eble JN. History of the development of the classification of renal cell neoplasia. *Clin Lab Med*. 2005;25(2):231-46, v.
26. Delahunt B, Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, Jordan TW, Magi-Galluzzi C, Zhou M, et al. Grading of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Should be Based on Nucleolar Prominence. *American Journal of Surgical Pathology*. 2011;35:1134-9.
27. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Grading System for Renal Cell Carcinoma and Other Prognostic Parameters. *American Journal of Surgical Pathology*. 2013;37:1490-504.

28. Rini BI, McKiernan JM, Chang SS, Choueiri TK, Kenney PA, Landman J, et al. Kidney. In: Mahul BA, editor. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8 ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG; 2017. p. 739-48.
29. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4 ed. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. Lyon: IARC; 2016.
30. Moch H, Bonsib SM, Delahunt B, Eble J, Egevad L, Grignon DJ, et al. Clear cell renal cell carcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon: IARC; 2016. p. 18-21.
31. Yoshida SO, Imam A, Olson CA, Taylor CR. Proximal renal tubular surface membrane antigens identified in primary and metastatic renal cell carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 1986;110(9):825-32.
32. Bonsib SM. The renal sinus is the principal invasive pathway: a prospective study of 100 renal cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(12):1594-600.
33. Bonsib SM. Renal veins and venous extension in clear cell renal cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2007;20(1):44-53.
34. Hoffmann NE, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML. Differences in organ system of distant metastasis by renal cell carcinoma subtype. *J Urol*. 2008;179(2):474-7.
35. Parker A. Studies on the main posterior lymph channels of the abdomen and their connections with the lymphatics of the genito-urinary system. *American Journal of Anatomy*. 1935;56:409-43.
36. Weiss L, Harlos JP, Torhorst J, Gunthard B, Hartveit F, Svendsen E, et al. Metastatic patterns of renal carcinoma: an analysis of 687 necropsies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1988;114(6):605-12.
37. Wyler L, Napoli CU, Ingold B, Sulser T, Heikenwalder M, Schraml P, et al. Brain metastasis in renal cancer patients: metastatic pattern, tumour-associated macrophages and chemokine/chemoreceptor expression. *Br J Cancer*. 2014;110(3):686-94.
38. Neumann HP, Bender BU, Berger DP, Laubenberger J, Schultze-Seemann W, Wetterauer U, et al. Prevalence, morphology and biology of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease compared to sporadic renal cell carcinoma. *Journal of Urology*. 1998;160:1248-54.
39. de Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, Tamboli P, Hailemariam S, Mihatsch M, et al. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(3):275-84.
40. Sangoi AR, Karamchandani J, Kim J, Pai RK, McKenney JK. The use of immunohistochemistry in the diagnosis of metastatic clear cell renal cell carcinoma: a review of PAX-8, PAX-2, hKIM-1, RCCma, and CD10. *Adv Anat Pathol*. 2010;17(6):377-93.



41. Sangoi AR, Fujiwara M, West RB, Montgomery KD, Bonventre JV, Higgins JP, et al. Immunohistochemical distinction of primary adrenal cortical lesions from metastatic clear cell renal cell carcinoma: a study of 248 cases. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(5):678-86.
42. Al-Ahmadie HA, Alden D, Qin LX, Olgac S, Fine SW, Gopalan A, et al. Carbonic anhydrase IX expression in clear cell renal cell carcinoma: an immunohistochemical study comparing 2 antibodies. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(3):377-82.
43. Genega EM, Ghebremichael M, Najarian R, Fu Y, Wang Y, Argani P, et al. Carbonic anhydrase IX expression in renal neoplasms: correlation with tumor type and grade. *Am J Clin Pathol.* 2010;134(6):873-9.
44. Reuter VE, Tickoo SK. Differential diagnosis of renal tumours with clear cell histology. *Pathology.* 2010;42(4):374-83.
45. Shen SS, Truong LD, Scarpelli M, Lopez-Beltran A. Role of immunohistochemistry in diagnosing renal neoplasms: when is it really useful? *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136(4):410-7.
46. Tan PH, Cheng L, Rioux-Leclercq N, Merino MJ, Netto G, Reuter VE, et al. Renal tumors: diagnostic and prognostic biomarkers. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(10):1518-31.
47. Boysen G, Bausch-Fluck D, Thoma CR, Nowicka AM, Stiehl DP, Cima I, et al. Identification and functional characterization of pVHL-dependent cell surface proteins in renal cell carcinoma. *Neoplasia.* 2012;14(6):535-46.
48. Moch H, Presti JC, Jr., Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56(1):27-30.
49. Young AN, Amin MB, Moreno CS, Lim SD, Cohen C, Petros JA, et al. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am J Pathol.* 2001;158(5):1639-51.
50. Kim MK, Kim S. Immunohistochemical profile of common epithelial neoplasms arising in the kidney. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2002;10(4):332-8.
51. Langner C, Wegscheider BJ, Ratschek M, Schips L, Zigeuner R. Keratin immunohistochemistry in renal cell carcinoma subtypes and renal oncocytomas: a systematic analysis of 233 tumors. *Virchows Arch.* 2004;444(2):127-34.
52. Zhou M, Roma A, Magi-Galluzzi C. The usefulness of immunohistochemical markers in the differential diagnosis of renal neoplasms. *Clin Lab Med.* 2005;25(2):247-57.
53. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet.* 1994;7(1):85-90.
54. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(21):9700-4.

55. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*. 2003;425(6955):307-11.
56. Velickovic M, Delahunt B, Storkel S, Grebem SK. VHL and FHIT locus loss of heterozygosity is common in all renal cancer morphotypes but differs in pattern and prognostic significance. *Cancer Res*. 2001;61(12):4815-9.
57. Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Liao A, Leng N, Pavia-Jimenez A, Wang S, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet*. 2012;44(7):751-9.
58. Pavlovich CP, Walther MM, Eyler RA, Hewitt SM, Zbar B, Linehan WM, et al. Renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(12):1542-52.
59. Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med*. 2006;355(13):1345-56.
60. Ricketts CJ, Shuch B, Vocke CD, Metwalli AR, Bratslavsky G, Middleton L, et al. Succinate dehydrogenase kidney cancer: an aggressive example of the Warburg effect in cancer. *J Urol*. 2012;188(6):2063-71.
61. Delahunt B. Advances and controversies in grading and staging of renal cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2009;22 Suppl 2:S24-36.
62. Trpkov K, Grignon DJ, Bonsib SM, Amin MB, Billis A, Lopez-Beltran A, et al. Handling and staging of renal cell carcinoma: the International Society of Urological Pathology Consensus (ISUP) conference recommendations. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(10):1505-17.
63. Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer*. 2000;89(3):604-14.
64. Renshaw AA, Cheville JC. Quantitative tumour necrosis is an independent predictor of overall survival in clear cell renal cell carcinoma. *Pathology*. 2015;47(1):34-7.
65. Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de-Peralta Venturina M, et al. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(3):281-91.
66. Ng CS, Wood CG, Silverman PM, Tannir NM, Tamboli P, Sandler CM. Renal cell carcinoma: diagnosis, staging, and surveillance. *AJR Am J Roentgenol*. 2008;191(4):1220-32.
67. Delahunt B, Algaba F, Eble J, Cheville J, Amin MB, Argani P, et al. Papillary renal cell carcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon: IARC; 2016. p. 23-5.
68. Grignon DJ, Eble JN. Papillary and metanephric adenomas of the kidney. *Semin Diagn Pathol*. 1998;15(1):41-53.
69. Tickoo SK, dePeralta-Venturina MN, Harik LR, Worcester HD, Salama ME, Young AN, et al. Spectrum of epithelial neoplasms in end-stage renal disease: an experience from 66 tumor-

- bearing kidneys with emphasis on histologic patterns distinct from those in sporadic adult renal neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(2):141-53.
70. Zbar B, Tory K, Merino M, Schmidt L, Glenn G, Choyke P, et al. Hereditary Papillary Renal Cell Carcinoma. *Journal of Urology.* 1994;151(3):561-6.
  71. Gudbjartsson T, Hardarson S, Petursdottir V, Thoroddsen A, Magnusson J, Einarsson GV. Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients. *Eur Urol.* 2005;48(4):593-600.
  72. Renshaw AA, Zhang H, Corless CL, Fletcher JA, Pins MR. Solid variants of papillary (chromophil) renal cell carcinoma: clinicopathologic and genetic features. *Am J Surg Pathol.* 1997;21(10):1203-9.
  73. Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol.* 1997;10(6):537-44.
  74. Delahunt B, Eble JN, McCreddie MR, Bethwaite PB, Stewart JH, Bilous AM. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol.* 2001;32(6):590-5.
  75. Ordonez NG. The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between mesothelioma and renal cell carcinoma: a comparative study. *Hum Pathol.* 2004;35(6):697-710.
  76. Sanders ME, Mick R, Tomaszewski JE, Barr FG. Unique Patterns of Allelic Imbalance Distinguish Type 1 from Type 2 Sporadic Papillary Renal Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology.* 2002;161(3):997-1005.
  77. Przybycin CG, Magi-Galluzzi C, McKenney JK. Hereditary syndromes with associated renal neoplasia: a practical guide to histologic recognition in renal tumor resection specimens. *Adv Anat Pathol.* 2013;20(4):245-63.
  78. Zhuang Z, Park WS, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E, et al. Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet.* 1998;20(1):66-9.
  79. Lohse CM, Chevillat JC. A review of prognostic pathologic features and algorithms for patients treated surgically for renal cell carcinoma. *Clin Lab Med.* 2005;25(2):433-64.
  80. Paner G, Amin MB, Moch H, Störkel S. Chromophobe renal cell carcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 4 ed. Lyon: IARC; 2016. p. 27-8.
  81. Storkel S, Steart PV, Drenckhahn D, Thoenes W. The human chromophobe cell renal carcinoma: its probable relation to intercalated cells of the collecting duct. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1989;56(4):237-45.
  82. Amin MB, Paner GP, Alvarado-Cabrero I, Young AN, Stricker HJ, Lyles RH, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 145 cases. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(12):1822-34.

83. Przybycin CG, Cronin AM, Darvishian F, Gopalan A, Al-Ahmadie HA, Fine SW, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: a clinicopathologic study of 203 tumors in 200 patients with primary resection at a single institution. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(7):962-70.
84. Cheville JC, Lohse CM, Sukov WR, Thompson RH, Leibovich BC. Chromophobe renal cell carcinoma: the impact of tumor grade on outcome. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(6):851-6.
85. Delahunt B, Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, McCredie MR, Martignoni G, Eble JN, et al. Fuhrman grading is not appropriate for chromophobe renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(6):957-60.
86. Pavlovich CP, Grubb RL, 3rd, Hurley K, Glenn GM, Toro J, Schmidt LS, et al. Evaluation and management of renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *J Urol.* 2005;173(5):1482-6.
87. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(10):1469-89.
88. Tickoo SK, Lee MW, Eble JN, Amin M, Christopherson T, Zarbo RJ, et al. Ultrastructural observations on mitochondria and microvesicles in renal oncocytoma, chromophobe renal cell carcinoma, and eosinophilic variant of conventional (clear cell) renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(9):1247-56.
89. Martignoni G, Pea M, Chilosi M, Brunelli M, Scarpa A, Colato C, et al. Parvalbumin is constantly expressed in chromophobe renal carcinoma. *Mod Pathol.* 2001;14(8):760-7.
90. Mathers ME, Pollock AM, Marsh C, O'Donnell M. Cytokeratin 7: a useful adjunct in the diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma. *Histopathology.* 2002;40(6):563-7.
91. Petit A, Castillo M, Santos M, Mellado B, Alcover JB, Mallofre C. KIT expression in chromophobe renal cell carcinoma: comparative immunohistochemical analysis of KIT expression in different renal cell neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(5):676-8.
92. Skinnider BF, Folpe AL, Hennigar RA, Lim SD, Cohen C, Tamboli P, et al. Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(6):747-54.
93. Kuehn A, Paner GP, Skinnider BF, Cohen C, Datta MW, Young AN, et al. Expression analysis of kidney-specific cadherin in a wide spectrum of traditional and newly recognized renal epithelial neoplasms: diagnostic and histogenetic implications. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(10):1528-33.
94. Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, Schrock E, Ried T, Cremer T, et al. Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol.* 1994;145(2):356-64.
95. Suzigan S, Lopez-Beltran A, Montironi R, Drut R, Romero A, Hayashi T, et al. Multilocular cystic renal cell carcinoma : a report of 45 cases of a kidney tumor of low malignant potential. *Am J Clin Pathol.* 2006;125(2):217-22.

96. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 2002;30(4):406-10.
97. Stewart L, Glenn GM, Stratton P, Goldstein AM, Merino MJ, Tucker MA, et al. Association of germline mutations in the fumarate hydratase gene and uterine fibroids in women with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Arch Dermatol.* 2008;144(12):1584-92.
98. Merino MJ, Linehan WM. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma-associated renal cell carcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 4 ed. Lyon: IARC; 2016. p. 25-6.
99. Merino MJ, Torres-Cabala C, Pinto P, Linehan WM. The morphologic spectrum of kidney tumors in hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC) syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(10):1578-85.
100. Grubb RL, 3rd, Franks ME, Toro J, Middleton L, Choyke L, Fowler S, et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: a syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer. *J Urol.* 2007;177(6):2074-9; discussion 9-80.
101. Fleming S, Amin MB, Störkel S. Collecting duct carcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 4 ed. Lyon: IARC; 2016. p. 29-30.
102. Karakiewicz PI, Trinh QD, Rioux-Leclercq N, de la Taille A, Novara G, Tostain J, et al. Collecting duct renal cell carcinoma: a matched analysis of 41 cases. *Eur Urol.* 2007;52(4):1140-5.
103. Fleming S, Lewi HJ. Collecting duct carcinoma of the kidney. *Histopathology.* 1986;10(11):1131-41.
104. Wright JL, Risk MC, Hotaling J, Lin DW. Effect of collecting duct histology on renal cell cancer outcome. *J Urol.* 2009;182(6):2595-9.
105. Amin MB, Smith SC, Agaimy A, Argani P, Comperat EM, Delahunt B, et al. Collecting duct carcinoma versus renal medullary carcinoma: an appeal for nosologic and biological clarity. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(7):871-4.
106. Amin MB, Merino MJ. Renal medullary carcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 4 ed. Lyon: IARC; 2016. p. 31-2.
107. Gupta R, Billis A, Shah RB, Moch H, Osunkoya AO, Jochum W, et al. Carcinoma of the collecting ducts of Bellini and renal medullary carcinoma: clinicopathologic analysis of 52 cases of rare aggressive subtypes of renal cell carcinoma with a focus on their interrelationship. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(9):1265-78.
108. Rao P, Tannir NM, Tamboli P. Expression of OCT3/4 in renal medullary carcinoma represents a potential diagnostic pitfall. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(4):583-8.

109. Liu Q, Galli S, Srinivasan R, Linehan WM, Tsokos M, Merino MJ. Renal medullary carcinoma: molecular, immunohistochemistry, and morphologic correlation. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(3):368-74.
110. Maroja Silvino MC, Venchiarutti Moniz CM, Munhoz Piotto GH, Siqueira S, Galapo Kann A, Dzik C. Renal medullary carcinoma response to chemotherapy: a referral center experience in Brazil. *Rare Tumors.* 2013;5(3):e44.
111. Argani P, Cheville J, Ladanyi M. MiT family translocation renal cell carcinomas. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 4 ed. Lyon: IARC; 2016. p. 33-4.
112. Komai Y, Fujiwara M, Fujii Y, Mukai H, Yonese J, Kawakami S, et al. Adult Xp11 translocation renal cell carcinoma diagnosed by cytogenetics and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2009;15(4):1170-6.
113. Argani P, Antonescu CR, Illei PB, Lui MY, Timmons CF, Newbury R, et al. Primary Renal Neoplasms with the ASPL-TFE3 Gene Fusion of Alveolar Soft Part Sarcoma. *The American Journal of Pathology.* 2001;159(1):179-92.
114. Argani P, Antonescu CR, Couturier J, Fournet JC, Sciort R, Debiec-Rychter M, et al. PRCC-TFE3 renal carcinomas: morphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular analysis of an entity associated with the t(X;1)(p11.2;q21). *Am J Surg Pathol.* 2002;26(12):1553-66.
115. Argani P, Hawkins A, Griffin CA, Goldstein JD, Haas M, Beckwith JB, et al. A Distinctive Pediatric Renal Neoplasm Characterized by Epithelioid Morphology, Basement Membrane Production, Focal HMB45 Immunoreactivity, and t(6;11)(p21.1;q12) Chromosome Translocation. *The American Journal of Pathology.* 2001;158(6):2089-96.
116. Argani P, Lal P, Hutchinson B, Lui MY, Reuter VE, Ladanyi M. Aberrant nuclear immunoreactivity for TFE3 in neoplasms with TFE3 gene fusions: a sensitive and specific immunohistochemical assay. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(6):750-61.
117. Argani P, Lae M, Hutchinson B, Reuter VE, Collins MH, Perentesis J, et al. Renal carcinomas with the t(6;11)(p21;q12): clinicopathologic features and demonstration of the specific alpha-TFEB gene fusion by immunohistochemistry, RT-PCR, and DNA PCR. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(2):230-40.
118. Gill AJ, Hes O, Papathomas T, Sedivcova M, Tan PH, Agaimy A, et al. Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient renal carcinoma: a morphologically distinct entity: a clinicopathologic series of 36 tumors from 27 patients. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(12):1588-602.
119. Williamson SR, Eble JN, Amin MB, Gupta NS, Smith SC, Sholl LM, et al. Succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma: detailed characterization of 11 tumors defining a unique subtype of renal cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2015;28(1):80-94.

120. Gill AJ, Pachter NS, Clarkson A, Tucker KM, Winship IM, Benn DE, et al. Renal tumors and hereditary pheochromocytoma-paraganglioma syndrome type 4. *N Engl J Med.* 2011;364(9):885-6.
121. Fine SW, Argani P, DeMarzo AM, Delahunt B, Sebo TJ, Reuter VE, et al. Expanding the histologic spectrum of mucinous tubular and spindle cell carcinoma of the kidney. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(12):1554-60.
122. Shen SS, Ro JY, Tamboli P, Truong LD, Zhai Q, Jung SJ, et al. Mucinous tubular and spindle cell carcinoma of kidney is probably a variant of papillary renal cell carcinoma with spindle cell features. *Ann Diagn Pathol.* 2007;11(1):13-21.
123. Thway K, du Parc J, Larkin JM, Fisher C, Livni N. Metastatic renal mucinous tubular and spindle cell carcinoma. Atypical behavior of a rare, morphologically bland tumor. *Ann Diagn Pathol.* 2012;16(5):407-10.
124. Bulimbasic S, Ljubanovic D, Sima R, Michal M, Hes O, Kuroda N, et al. Aggressive high-grade mucinous tubular and spindle cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2009;40(6):906-7.
125. Pillay N, Ramdial PK, Cooper K, Batuule D. Mucinous tubular and spindle cell carcinoma with aggressive histomorphology--a sarcomatoid variant. *Hum Pathol.* 2008;39(6):966-9.
126. Kuroda N, Paner G, Srigley JR. Mucinous tubular and spindle cell carcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 4 ed. Lyon: IARC; 2016. p. 37.
127. Amin MB, MacLennan GT, Gupta R, Grignon D, Paraf F, Vieillefond A, et al. Tubulocystic carcinoma of the kidney: clinicopathologic analysis of 31 cases of a distinctive rare subtype of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(3):384-92.
128. Comp erat E, Cheville J, Rioux-Leclercq N. Tubulocystic renal cell carcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 4 ed. Lyon: IARC; 2016. p. 38.
129. Bhullar JS, Thamboo T, Esuvaranathan K. Unique case of tubulocystic carcinoma of the kidney with sarcomatoid features: a new entity. *Urology.* 2011;78(5):1071-2.
130. Enoki Y, Katoh G, Okabe H, Yanagisawa A. Clinicopathological features and CD57 expression in renal cell carcinoma in acquired cystic disease of the kidneys: with special emphasis on a relation to the duration of haemodialysis, the degree of calcium oxalate deposition, histological type, and possible tumorigenesis. *Histopathology.* 2010;56(3):384-94.
131. Nouh MA, Kuroda N, Yamashita M, Hayashida Y, Yano T, Minakuchi J, et al. Renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease: relationship between histological type and duration of dialysis. *BJU Int.* 2010;105(5):620-7.
132. Kuroda N, Tamura M, Hamaguchi N, Mikami S, Pan CC, Brunelli M, et al. Acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma with sarcomatoid change and rhabdoid features. *Ann Diagn Pathol.* 2011;15(6):462-6.

133. Aydin H, Chen L, Cheng L, Vaziri S, He H, Ganapathi R, et al. Clear cell tubulopapillary renal cell carcinoma: a study of 36 distinctive low-grade epithelial tumors of the kidney. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(11):1608-21.
134. Zhou H, Zheng S, Truong LD, Ro JY, Ayala AG, Shen SS. Clear cell papillary renal cell carcinoma is the fourth most common histologic type of renal cell carcinoma in 290 consecutive nephrectomies for renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2014;45(1):59-64.
135. Strigley JR, Cheng L, Grignon DJ, Tickoo SK. Clear cell papillary renal cell carcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 4 ed. Lyon: IARC; 2016. p. 40-1.
136. Kuroda N, Ohe C, Kawakami F, Mikami S, Furuya M, Matsuura K, et al. Clear cell papillary renal cell carcinoma: a review. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(11):7312-8.
137. Lopez-Beltran A, Kirkali Z, Montironi R, Blanca A, Algaba F, Scarpelli M, et al. Unclassified renal cell carcinoma: a report of 56 cases. *BJU Int.* 2012;110(6):786-93.
138. Cheng L, Amin MB, Lopez-Beltran A, Montironi R. Unclassified renal cell carcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 4 ed. Lyon: IARC; 2016. p. 41.
139. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522-31.
140. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
141. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(47):16961-6.
142. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell.* 2005;120(5):623-34.
143. Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* 2006;20(7):759-71.
144. Aravin A, Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett.* 2005;579(26):5830-40.
145. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
146. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D109-11.
147. Wang Y, Stricker HM, Gou D, Liu L. MicroRNA: past and present. *Front Biosci.* 2007;12:2316-29.
148. Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(3):223-9.
149. Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell.* 2005;122(1):17-20.



150. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62.
151. Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*. 2002;9(6):1327-33.
152. Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(10):827-35.
153. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by *Let-7* MicroRNA in human cells. *Science*. 2005;309(5740):1573-6.
154. Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(1):360-5.
155. Nelson PT, Hatzigeorgiou AG, Mourelatos Z. miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA*. 2004;10(3):387-94.
156. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem*. 2009;55(4):623-31.
157. Hornstein E, Mansfield JH, Yekta S, Hu JK, Harfe BD, McManus MT, et al. The microRNA *miR-196* acts upstream of *Hoxb8* and *Shh* in limb development. *Nature*. 2005;438(7068):671-4.
158. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. 2005;7(7):719-23.
159. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
160. Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* MicroRNA *Mir-14* Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. *Current Biology*. 2003;13(9):790-5.
161. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(16):7065-70.
162. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of *miRNA-21* in health and disease. *RNA Biol*. 2011;8(5):706-13.
163. Hong L, Han Y, Zhang Y, Zhang H, Zhao Q, Wu K, et al. MicroRNA-21: a therapeutic target for reversing drug resistance in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(9):1073-80.
164. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2257-61.
165. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005;65(14):6029-33.
166. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2007;120(5):1046-54.

167. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007;26(19):2799-803.
168. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006;130(7):2113-29.
169. Vergho DC, Kneitz S, Kalogirou C, Burger M, Krebs M, Rosenwald A, et al. Impact of miR-21, miR-126 and miR-221 as prognostic factors of clear cell renal cell carcinoma with tumor thrombus of the inferior vena cava. *PLoS One*. 2014;9(10):e109877.
170. Li X, Xin S, He Z, Che X, Wang J, Xiao X, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor PDCD4 and promotes cell transformation, proliferation, and metastasis in renal cell carcinoma. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(6):1631-42.
171. Neal CS, Michael MZ, Rawlings LH, Van der Hoek MB, Gleadle JM. The VHL-dependent regulation of microRNAs in renal cancer. *BMC Med*. 2010;8:64.
172. Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomed Rep*. 2016;5(4):395-402.
173. Bavelloni A, Ramazzotti G, Poli A, Piazzini M, Focaccia E, Blalock W, et al. MiRNA-210: A Current Overview. *Anticancer Res*. 2017;37(12):6511-21.
174. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem*. 2009;107(6):1053-62.
175. Huang X, Zuo J. Emerging roles of miR-210 and other non-coding RNAs in the hypoxic response. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014;46(3):220-32.
176. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2007;27(5):1859-67.
177. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*. 2008;283(23):15878-83.
178. Kelly TJ, Souza AL, Clish CB, Puigserver P. A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like. *Mol Cell Biol*. 2011;31(13):2696-706.
179. McCormick RI, Blick C, Ragoussis J, Schoedel J, Mole DR, Young AC, et al. miR-210 is a target of hypoxia-inducible factors 1 and 2 in renal cancer, regulates ISCU and correlates with good prognosis. *Br J Cancer*. 2013;108(5):1133-42.
180. Redova M, Poprach A, Besse A, Iliev R, Nekkvindova J, Lakomy R, et al. MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2013;34(1):481-91.
181. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer--a brief overview. *Adv Biol Regul*. 2015;57:1-9.

182. Dang K, Myers KA. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):6353-72.
183. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-8.
184. Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene.* 2006;25(46):6220-7.
185. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1793-801.
186. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4677-84.
187. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):189-98.
188. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120(5):635-47.
189. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
190. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
191. Gee HE, Camps C, Buffa FM, Patiar S, Winter SC, Betts G, et al. hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer.* 2010;116(9):2148-58.
192. Faragalla H, Youssef YM, Scorilas A, Khalil B, White NM, Mejia-Guerrero S, et al. The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma. *J Mol Diagn.* 2012;14(4):385-92.
193. Zaman MS, Shahryari V, Deng G, Thamminana S, Saini S, Majid S, et al. Up-regulation of microRNA-21 correlates with lower kidney cancer survival. *PLoS One.* 2012;7(2):e31060.
194. Tang K, Xu H. Prognostic value of meta-signature miRNAs in renal cell carcinoma: an integrated miRNA expression profiling analysis. *Sci Rep.* 2015;5:10272.
195. Jung M, Mollenkopf HJ, Grimm C, Wagner I, Albrecht M, Waller T, et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med.* 2009;13(9B):3918-28.
196. Chow TF, Youssef YM, Lianidou E, Romaschin AD, Honey RJ, Stewart R, et al. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis. *Clin Biochem.* 2010;43(1-2):150-8.
197. Juan D, Alexe G, Antes T, Liu H, Madabhushi A, Delisi C, et al. Identification of a microRNA panel for clear-cell kidney cancer. *Urology.* 2010;75(4):835-41.

198. Powers MP, Alvarez K, Kim HJ, Monzon FA. Molecular classification of adult renal epithelial neoplasms using microRNA expression and virtual karyotyping. *Diagn Mol Pathol.* 2011;20(2):63-70.
199. Valera VA, Walter BA, Linehan WM, Merino MJ. Regulatory Effects of microRNA-92 (miR-92) on VHL Gene Expression and the Hypoxic Activation of miR-210 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Cancer.* 2011;2:515-26.
200. Osanto S, Qin Y, Buermans HP, Berkers J, Lerut E, Goeman JJ, et al. Genome-wide microRNA expression analysis of clear cell renal cell carcinoma by next generation deep sequencing. *PLoS One.* 2012;7(6):e38298.
201. Zaravinos A, Radojicic J, Lambrou GI, Volanis D, Delakas D, Stathopoulos EN, et al. Expression of miRNAs involved in angiogenesis, tumor cell proliferation, tumor suppressor inhibition, epithelial-mesenchymal transition and activation of metastasis in bladder cancer. *J Urol.* 2012;188(2):615-23.
202. Wach S, Nolte E, Theil A, Stohr C, T TR, Hartmann A, et al. MicroRNA profiles classify papillary renal cell carcinoma subtypes. *Br J Cancer.* 2013;109(3):714-22.
203. Wotschovsky Z, Busch J, Jung M, Kempkensteffen C, Weikert S, Schaser KD, et al. Diagnostic and prognostic potential of differentially expressed miRNAs between metastatic and non-metastatic renal cell carcinoma at the time of nephrectomy. *Clin Chim Acta.* 2013;416:5-10.
204. Iwamoto H, Kanda Y, Sejima T, Osaki M, Okada F, Takenaka A. Serum miR-210 as a potential biomarker of early clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2014;44(1):53-8.
205. Ge YZ, Xin H, Lu TZ, Xu Z, Yu P, Zhao YC, et al. MicroRNA expression profiles predict clinical phenotypes and prognosis in chromophobe renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 2015;5:10328.
206. Petrozza V, Carbone A, Bellissimo T, Porta N, Palleschi G, Pastore AL, et al. Oncogenic MicroRNAs Characterization in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):29219-25.
207. Samaan S, Khella HW, Girgis A, Scorilas A, Lianidou E, Gabril M, et al. miR-210 is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *J Mol Diagn.* 2015;17(2):136-44.
208. Szabo Z, Szegedi K, Gombos K, Mahua C, Flasko T, Harda K, et al. Expression of miRNA-21 and miRNA-221 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and their possible role in the development of ccRCC. *Urol Oncol.* 2016;34(12):533 e21- e27.
209. Lokeshwar SD, Talukder A, Yates TJ, Hennig MJP, Garcia-Roig M, Lahorewala SS, et al. Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma: A Potential Three-MicroRNA Prognostic Signature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(4):464-72.
210. Yu L, Xiang L, Feng J, Li B, Zhou Z, Li J, et al. miRNA-21 and miRNA-223 expression signature as a predictor for lymph node metastasis, distant metastasis and survival in kidney renal clear cell carcinoma. *J Cancer.* 2018;9(20):3651-9.

211. Petrozza V, Costantini M, Tito C, Giammusso LM, Sorrentino V, Cacciotti J, et al. Emerging role of secreted miR-210-3p as potential biomarker for clear cell Renal Cell Carcinoma metastasis. *Cancer Biomark.* 2020;27(2):181-8.
212. Silva-Santos RM, Costa-Pinheiro P, Luis A, Antunes L, Lobo F, Oliveira J, et al. MicroRNA profile: a promising ancillary tool for accurate renal cell tumour diagnosis. *Br J Cancer.* 2013;109(10):2646-53.
213. Dong JT. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2001;20(3-4):173-93.
214. Youssef YM, White NM, Grigull J, Krizova A, Samy C, Mejia-Guerrero S, et al. Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature. *Eur Urol.* 2011;59(5):721-30.
215. Zaravinos A, Lambrou GI, Mourmouras N, Katafygiotis P, Papageorgiou G, Giannikou K, et al. New miRNA profiles accurately distinguish renal cell carcinomas and upper tract urothelial carcinomas from the normal kidney. *PLoS One.* 2014;9(3):e91646.
216. Fridman E, Dotan Z, Barshack I, David MB, Dov A, Tabak S, et al. Accurate molecular classification of renal tumors using microRNA expression. *J Mol Diagn.* 2010;12(5):687-96.
217. Petillo D, Kort EJ, Anema J, Furge KA, Yang XJ, Teh BT. MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes. *Int J Oncol.* 2009;35(1):109-14.
218. Reis PP, Tomenson M, Cervigne NK, Machado J, Jurisica I, Pintilie M, et al. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2010;9:238.
219. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med.* 2009;13(1):39-53.
220. Li M, Ma X, Li M, Zhang B, Huang J, Liu L, et al. Prognostic role of microRNA-210 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Dis Markers.* 2014;2014:106197.
221. Vergho D, Kneitz S, Rosenwald A, Scherer C, Spahn M, Burger M, et al. Combination of expression levels of miR-21 and miR-126 is associated with cancer-specific survival in clear-cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2014;14:25.
222. Cheng T, Wang L, Li Y, Huang C, Zeng L, Yang J. Differential microRNA expression in renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2013;6(3):769-76.
223. Zhao A, Li G, Peoc'h M, Genin C, Gigante M. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2013;94(1):115-20.
224. Fedorko M, Stanik M, Iliev R, Redova-Lojova M, Machackova T, Svoboda M, et al. Combination of MiR-378 and MiR-210 Serum Levels Enables Sensitive Detection of Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):23382-9.
225. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene.* 2008;27(15):2128-36.

226. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(2):647-58.
227. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007;282(19):14328-36.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

### 1. Bireysel Bilgileri

**Adı- Soyadı:** Taha Cumhan Şavlı

**Doğum tarihi ve yeri:** 4 Şubat 1991, İstanbul

**Telefon numarası:** 0535 320 00 76

**E-mail adresi:** cumhan@hotmail.com

**Yabancı dili:** İngilizce, Almanca

### 2. Öğrenim Durumu

Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi (2009-2015)

Hüseyin Avni Sözen Anadolu Lisesi (2005-2009)

Göztepe Etüt ve Beslenme İlkokulu (1998-2005)

### 3. Mesleki Deneyimi

SBÜ, İstanbul SUAM (2016-2020)

Üsküdar Toplum Sağlığı Merkezi (2015-2016)

### 4. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

European Society of Pathology

Türk Patoloji Derneği

Türk Patoloji Derneği Federasyonu

### 5. Katıldığı Kurslar, Kongreler ve Toplantılar

1. Akciğer Kanseri Kursu, İstanbul, 16-17 Kasım 2019
2. Akciğer Patolojileri Kursu, İstanbul, 22-23 Haziran 2019
3. 28. Ulusal Patoloji Kongresi, Ankara, 27-30 Ekim 2018
4. Mukozis Fungoides ve Ayrıcı Tanısı Kursu, İstanbul, 06-07 Ekim 2018
5. Kemik Tümörlerine Yaklaşım, İstanbul, 11 Mayıs 2018
6. Yumuşak Doku Tümörlerine Yaklaşım, İstanbul, 23 Mart 2018
7. Patoloji Kış Okulu, Ankara, 17-18 Şubat ve 14-15 Nisan 2018

8. 27.Ulusal Patoloji Kongresi, Antalya, 15-18 Kasım 2017 (Burslu)
9. Jinekoloji Dışı Sitoloji Kursu, İstanbul, 25 Şubat 2017
10. 6. Patoloji Kış Okulu, Ankara, 18-19 Şubat 2017
11. Böbrek ve Mesane Tümörleri Kursu, İstanbul, 2016
12. Baş Boyun Patolojisi Kursu, İstanbul, 11-12 Haziran 2016
13. Sıvı Bazlı Jinekoloji Sitolojisi Kursu, İstanbul, 23-24 Nisan 2016

## 6. Bilimsel İlgi Alanları

### 6.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Kelten Talu C. , *Savli T. C.* , Erdem Huq G. , Lelebici C. ‘Histopathological and Clinical Differences Between Primary Breast Carcinomas With Neuroendocrine Features and Primary Breast Carcinomas Mimicking Neuroendocrine Features’. International Journal of Surgical Pathology. (2019)
2. Lelebici C. , *Savli T. C.* , Yeni B. , Cin M. , Koku Aksu A.E. ‘Palisaded Encapsulated (Solitary Circumscribed) Neuroma: A Review of 30 Cases’. International Journal of Surgical Pathology. (2019)
3. Lelebici C. , Yeni B. , *Savli T. C.* , Aydın O. , Pembegul G. , Cinel L. , Simsek B.C. , Yildiz P. ,Tuncel D. , Kayahan S. ‘A new immunohistochemical marker, insulinoma-associated protein 1(INSM1), for Merkel cell carcinoma: Evaluation of 24 cases’. Annals of Diagnostic Pathology. (2019)

### 6.2 Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler

1. Yeni B. , *Savli T. C.* , Baykal Koca S. Case Report: Dedifferentiated Liposarcoma (Oral presentation-Poster – 31. European Pathology Congress)
2. *Savli T. C.* , Dursun N. ,Yeni B. , Bolme Savli T. Mixed acinar neuroendocrine carcinoma present as a polyp in stomach (Poster – 31. European Pathology Congress)



3. Bolme Savli T. , Pasaoglu H. E. , **Savli T. C.** , Emre F. Incidental detected papillary fibroelastoma case (Eposter – 31. European Pathology Congress)
4. Savli T. C. , Okcu O. , Bolme Savli T. ,Yeni B. , Behzatoglu K. Plasmacytoid and nested variant invasive urothelial carcinoma: case report (Poster – 31. European Pathology Congress)
5. **Savli T. C.** , Dursun N. , Bolme Savli T. Invasive adenocarcinoma case in the background of intracholecystic tubulopapillary neoplasia originated from adenomyoma of gallbladder (Poster – 31. European Pathology Congress)
6. Bolme Savli T. , Tetikkurt U. S. , **Savli T. C.** , Yeni B. Unusual presentation of non-leukemic myeloid sarcoma in the Breast (Eposter – 30. European Pathology Congress)
7. **Savli T. C.** , Kelten Talu E. C. , Trabulus D. C. , Gursu U. Adenomyoepithelioma and malignancy in association with adenomyoepithelioma, 4 cases from a single center (Poster –30. European Pathology Congress)
8. Kelten Talu E. C. , **Savli T. C.** , Erdem Huq G. , Pasaoglu H. E. Histopathological findings contributing the differential diagnosis between primary breast carcinomas with neuroendocrine features (NEBC) and breast carcinomas suspicious for neuroendocrine features (Non-NEBC) (Poster –29. European Congress of Pathology )
9. **Savli T. C.** , Leblebici C. , Yildiz P. , Usul G. A case of pleomorphic dermal sarcoma metastatic to regional lymph node and parotid gland (Poster – 29. European Congress of Pathology )
10. Leblebici C. , **Savli T. C.** , Usul G. , Dursun N. Malign proliferating trichilemmal tumour: 2 case reports (Poster –29. European Congress of Pathology )
11. Usul G. , Behzatoglu K. , Cakir Y. , Hacıhasanoglu E. , **Savli T. C.** , Bozkurt E. R. Solitary fibrous tumours of the prostate: A case report (Poster – 29. European Congress of Pathology )

12. Bambul Sigirci B. , Behzatoglu K. , Hacıhasanoglu E. , *Savli T. C.* , Bozkurt E. R. Atypical spindle cell lipomas: Histological and immunohistochemical analysis of 11 cases (Poster – 29. European Congress of Pathology )

### 6.3 Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

*Savli T.C.* , Lelebici C. , Koku Aksu A.E. ‘Sebase Carcinoma In Situ: Case Report’. Journal of Current Pathology. (2019)

### 6.4. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. *Savli T. C.* , Dursun N. , Bolme Savli T. Midede polip olarak presente olan mikst asiner nöroendörin karsinom (Poster - 28. Ulusal Patoloji Kongresi)
2. *Savli T. C.* , Okcu O. , Bolme Savli T. , Behzatoglu K. Plazmasitoid ve nested varyant invaziv ürotelyal karsinom olgu sunumu (Poster – 28. Ulusal Patoloji Kongresi)
3. Yeni B. , Guzelbey B. , *Savli T. C.* Tiroide metastaz yapmış böbrek hücreli karsinomun ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) ile tanısı: 2 olgu sunumu(Poster – 8. Ulusal Sitopatoloji Kongresi)
4. *Savli T. C.* , Dursun N. , Bolme Savli T. , Lelebici C. Akut kolesistit zemininde gelişmiş invaziv safra kesesi karsinomu (Poster – 27. Ulusal Patoloji Kongresi)
5. Lelebici C. , *Savli T. C.* , Usul G. , Dursun N. Malign proliferere trikilemmal tümör: 2 olgu sunumu (Poster – 27. Ulusal Patoloji Kongresi)
6. *Savli T. C.* , Bambul Sigirci B. , Gunver F. , Kelten Talu E. C. , Antar V. Spinal paraganglioma (2 olgu sunumu) (Poster – 27. Ulusal Patoloji Kongresi)
7. *Savli T. C.* , Lelebici C. , Yildiz P. , Usul G. Metastatik pleomorfik dermal sarkom olgu sunumu (Poster – 27. Ulusal Patoloji Kongresi)
8. Okcu O. , Behzatoglu K. , Hacıhasanoglu E. , Usul G. , *Savli T. C.* , Bozkurt E. R. Mesane mikropapiller varyant ürotelyal karsinomlarının klinik ve histolojik özellikleri (Poster – 26. Ulusal Patoloji Kongresi)

