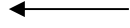
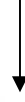
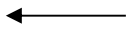


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



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



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**OVER KANSERLİ HASTALARDA MİR-16-5P, MİR-17-5P,
MİR-638'İN İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

MUKADDES AVŞAR SARAL

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YAZICI**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
KANSER GENETİĞİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kansere Genetiği Bilim Dalı Programında Doktora öğrencisi Mukaddes AVŞAR SARALI tarafından Prof.Dr.Hülya YAZICI'nın danışmanlığında hazırlanan "Over Kanseri Hastalarda MİR-16-5P, MİR-17-5P, MİR-638'in İfade Düzeylerinin Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 27 /08/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı
Prof.Dr.Pınar M.SAİP
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri
Prof.Dr.Semra DEMOKAN
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

Jüri-Danışman
Prof.Dr.Hülya YAZICI
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri
Doç.Dr.Meral YÜKSEL
Marmara Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu



Jüri
Doç.Dr.Hilal YAZICI MALKOÇOĞLU
TÜBİTAK-MAM-Gen Mühendisliği ve
Biyoteknoloji Enstitüsü

BEYAN

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



Mukaddes AVŞAR SARAL

İTHAF

Sevgili eşim Yunus ve biricik oğlum Kuzey'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarına gerekli rehberliği ile yön veren ve destek olan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Hülya YAZICI'ya,

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz Prof. Dr. Ahmet KİZİR'e,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanımız Hatice BİLGE BECERİR'e,

İstatistiksel analizler konusunda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Sevda ÖZEL'e,

Tez izleme aşamalarında destek olan Prof. Dr. Semra DEMOKAN ve Prof. Dr. Pınar M. SAİP'e,

Temel Onkoloji Anabilim Dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tez sağlıklı grubunu oluşturmamda katkıları olan İstanbul Aydın Üniversitesindeki çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi destekleri için annem Fatma AVŞAR ve babam Nurettin AVŞAR'a

Tez çalışmamın başından itibaren her zaman yanımda olan, anlayışıyla, desteğiyle, sevgisiyle bana güç veren eşim Yunus SARAL'a ve bu süreçte hamileliğim boyunca eşlik eden, benimle birlikte yorulan canım oğlum Kuzey SARAL'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-29694

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. OVER KANSERİ	3
2.1.1. Overlerin Anatomik Yapısı ve Karsinogenezi	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	4
2.1.3. Risk Faktörleri ve Koruyucu Faktörler	5
2.1.3.1. Kalıtsal Risk Faktörleri	5
2.1.3.2. Hormonal ve Reprodüktif Faktörler	6
2.1.4. FIGO Evrelendirmesi	7
2.1.5. Histopatolojisi	10
2.1.6. Over Kanserinde Görülen Moleküler Değişiklikler.....	11
2.1.7. Tanı ve Tedavi Yaklaşımları.....	12
2.2. MİKRORNA (miRNA)	13
2.2.1. MikroRNA'ların Keşfi.....	13
2.2.2. MikroRNA'ların Biyogenezi ve Fonksiyonu.....	13
2.2.3. MikroRNA'lar ve Kanser.....	15
2.2.3.1. Tümör Baskılayıcı mikroRNA'lar	16
2.2.3.2. Onkogenik mikroRNA'lar	17
2.2.3.3. MikroRNA'lar ve Over Kanseri.....	18
2.3. Tanıda Kullanılan Biyobelirteçler.....	20

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereç	23
3.1.1. Materyal	23
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	23
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	23
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	24
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu	25
3.2.2. RNA İzolasyonu.....	25
3.2.3. Agoroz Jelde RNA'ların Kontrolü.....	26
3.2.3.1. Agoroz Jelin Hazırlanması	27
3.2.3.2. Agoroz Jelde Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi	27
3.2.4. RNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	27
3.2.5. cDNA Sentezi	28
3.2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	29
3.2.7. İstatistiksel Analizler.....	30
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	59
HAM VERİLER	67
FORMLAR	68
ETİK KURUL KARARI	72
PATENT HAKKI İZNİ	75
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	76
ÖZGEÇMİŞ	77

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: 2014 FIGO Evreleme Sistemi	8
Tablo 2-2: İki tip over karsinomunda görülen moleküler genetik değişiklikler [42].	11
Tablo 2-3: Over kanserinde potansiyel belirteç olan miRNA'lar	19
Tablo 3-1: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri	28
Tablo 3-2: Ters Transkriptaz işlemi ve reaksiyon koşulları	28
Tablo 3-3: Gerçek-Zamanlı PZR reaksiyon karışımı	29
Tablo 3-4: Gerçek-Zamanlı PZR koşulları	29
Tablo 4-1: Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri	31
Tablo 4-2: Örneklerle Ait Nanodrop Ölçüm Değerleri	32
Tablo 4-3: miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638'in ifade düzeyleri	39
Tablo 4-4: Normallik Dağılımı Testi	42
Tablo 4-5: Hasta ve kontrol grupları arasında miRNA gen ifade düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	42
Tablo 4-6: Ekspresyon düzeyi artan miRNA'ların olası hedef molekülleri	43
Tablo 4-7: Hasta miRNA gen ifade düzeylerinin sigara içme durumları ile istatistiksel olarak karşılaştırılması	47
Tablo 4-8: : Hasta miRNA gen ifade düzeylerinin lokal ileri evre hastalık durumları ile istatistiksel olarak karşılaştırılması	47
Tablo 4-9: Hasta miRNA gen ifade düzeylerinin oral kontraseptif kullanımı ile istatistiksel olarak karşılaştırılması	47
Tablo 4-10: Hasta miRNA gen ifade düzeylerinin yaşa göre istatistiksel olarak karşılaştırılması	47
Tablo 4-11: miRNA ifade düzeyleri ile ailedeki over kanseri ve toplam kanser sayısı arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon istatistiği	48
Tablo 4-12: Sigara kullanımı ile lokal ileri hastalık-abdominal metastaz durumu arasında yapılan istatistiksel değerlendirmeye ilişkin vaka dağılımı	49
Tablo 4-13: Sigara kullanımı ile lokal ileri hastalık-abdominal metastaz varlığının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	49
Tablo 4-14: miRNA ifade düzeyleri ile sağkalım süresi arasındaki korelasyon istatistiği	49

Tablo 4-15: Over kanserli hasta ve sağlıklı grubun ayrılmasında miRNA'ların ROC-AUC değerleri.....	51
Tablo 4-16:miRNA ifade düzeyleri ile CA-125 değişkenleri arasındaki korelasyon istatistiği.....	51



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Tüm dünyada kadınlar arasında tahmin edilen yeni vakaların insidansı	4
Şekil 2-2: Türkiye’de 2018’de kadınlar arasında tahmin edilen yeni kanser vakalarının sayısal verileri.....	5
Şekil 2-3: Türkiye’de kadınlar arasında görülen kanser vakalarındaki tahmin edilen ölüm oranları.....	5
Şekil 2-4: Over kanserinde yeni FIGO evreleme sisteminin gösterimi	9
Şekil 2-5: miRNA'nın oluşum mekanizması [49].....	14
Şekil 2-6: miRNA'nın hedef mekanizması [68].....	15
Şekil 2-7: Tümör baskılayıcı ve onkogenik miRNA'lar [55].....	16
Şekil 2-8: Over karsinomunda ifadesi sıklıkla değişen miRNA'lar için bilinen hedeflerin	20
Şekil 4-1: İzole edilen RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi Sonrası Görüntüsü	32
Şekil 4-2: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen 5s rRNA’nın gerçek-zamanlı PZR eğrileri.....	33
Şekil 4-3: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen referans gen 5S rRNA’nın erime eğrileri	34
Şekil 4-4: Over Kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen referans gen 5S rRNA’nın erime eğrisi analizi	34
Şekil 4-5: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-16-5p’nin gerçek-zamanlı PZR eğrileri.....	35
Şekil 4-6: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-16-5p’nin erime eğrileri	35
Şekil 4-7: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen referans miR-16-5p’nin erime eğrisi analizi.....	36
Şekil 4-8: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-17-5p’nin gerçek-zamanlı PZR eğrileri.....	36
Şekil 4-9: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-17-5p’nin erime eğrileri	37
Şekil 4-10: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen referans miR-17-5p’nin erime eğrisi analizi.....	37

Şekil 4-11: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-638'nin gerçek-zamanlı PZR eğrileri	38
Şekil 4-12: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-638'in erime eğrileri	38
Şekil 4-13: Sağlıklı kontrol grubuna göre hastalarda miRNA gen ifade düzeylerini gösteren $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ortalamalarının karşılaştırılması	41
Şekil 4-14: miR-16-5p'nin hedef genleri için yapılan string analizi	44
Şekil 4-15: miR-17-5p'nin hedef genleri için yapılan string analizi	45
Şekil 4-16: miR-638'in hedef genleri için yapılan string analizi	46
Şekil 4-17: Over kanserli hasta ve sağlıklı grup arasındaki miR16-5p, miR17-5p, miR-638 ROC eğrileri.....	50

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Ark. : Arkadaşları
Bcl-2: B hücreli lenfoma 2
BFB: Brom Fenol Mavisi
BIC: B-cell integration cluster
BRCA1: Breast Cancer 1
BRCA2: Breast Cancer 1
CA-125: Kanser Antijeni-125
CCND1: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
cDNA: Tamamlayıcı DNA
Ct: Eşik döngüsü
ctDNA: Circulating tumor DNA
DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Protein
DNA: Deoksiribonükleik Asit
EOK: Epitelyal Over Kanseri
EtBr: Etidyum Bromür
FDA: Food and Drug Administration
FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics
GFR α : Growth factor receptor α
GTP: Guanazin Trifosfat
HE4: Human Epididimis Protein 4
HGSC: Yüksek Dereceli Seröz Karsinom
HNPCC: Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser
KLL: Kronik Lenfositik Lösemi
LGSC: Düşük Dereceli Seröz Karsinom
miRNA: mikroRNA
MLH1: MutL homolog 1
mRNA: Mesajcı RNA
MSH2: MutS homolog 2
MUC16: Mucin 16
ng: nanogram

OnkomiR: Onkogenik mikroRNA
ORF: Open Reading Frame
PBS: Fosfat Tamponu
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDCD4: Programlanmış Hücre Ölümü 4
pre-miRNA: Prekürsör miRNA
pri-miRNA: Primer miRNA
PTEN: Fosfataz ve Tensin Homoloğu
RAN: Ras İlişkili Nükleer Protein
RB1: Retinoblastoma 1
RBL2: Retinoblastoma-like protein 2
RISC: RNA indüklenmiş susturma kompleksi
RNA: Ribonükleik Asit
ROC: Receiver Operator Characteristic
ROC-AUC: ROC Eğrisi Altında Kalan Alan
ROMA: Risk of Ovarian Malignancy Algorithm
RPM: Dakikada Devir Sayısı
sncRNAs: Küçük kodlama yapmayan RNA'lar
TEB: Tris EDTA Borik Asit Tamponu
TGFB2: Transforming Growth Factor Beta Receptor II
TP53: Tümör Protein 53
TP53INP2: Tumour protein 53-induced nuclear protein 2
TPM1: Tropomiyosin 1
TRBP: Transactivating response RNA binding protein
TS-miR; Tümör baskılayıcı mikroRNA
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
 μ L: mikrolitre
%95 CI: %95 Confidence Interval-Güven Aralığı

ÖZET

Avşar Saral M. Over Kanserli Hastalarda miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638'in İfade Düzeylerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2019.

Over kanseri, kadınlar arasında ölümcül jinekolojik malignitelerden biridir. Over kanserli kadınların % 70'inden fazlası ileri evrelerde tanı alır ve bu vakaların çoğu tedavi edilemez. Hastaların çoğu primer kemoterapiye iyi yanıt vermesine rağmen, tümörler tedaviye dirençli hale gelmektedir. MikroRNA'lar (miRNA'lar) hedef mRNA'larının transkripsiyonel inhibisyonu ve degradasyonu yoluyla posttranskripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen 19-25 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan küçük RNA'lardır. Birçok miRNA'nın onkogenler, tümör baskılayıcılar ve hatta kanser kök hücreleri ve metastaz modülatörleri olarak görev yaptığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda daha önce ekibimiz tarafından yapılan mikroarray araştırmasından elde edilen bulgulara göre miR-16-5p, miR-17-5p ve miR-638 genlerinin over kanseri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Söz konusu miRNA'ların validasyonlarının yapılması ve yüksek riskli over kanserli hastaların erken tanısında ve hastalığın prognozunda kullanılabilecek birer biyobelirteç olup olmadıklarının belirlenmesi için 142 over kanserli hasta ile 97 sağlıklı kontrole ait periferik kan örneklerinde miR-16-5p, miR-17-5p ve miR-638 genlerinin ekspresyon düzeylerinin araştırılması amaçlandı. miRNA ekspresyon analizi periferik kan lenfositlerden RNA izolasyonunu takiben incelenen miRNA'lara özgü cDNA sentezi ve Real-Time PCR yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Çalışmanın sonucunda miRNA gen ifade düzeylerinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre 2 kattan fazla arttığı ve istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0,05$) olduğu görüldü. Her bir miRNA için elde edilen p değerleri; miR-16-5p, $p < 0,001$; miR-17-5p, $p < 0,001$ miR-638, $p = 0,005$ şeklindedir. Ayrıca miRNA ekspresyon seviyelerini hastaların klinik verileri ile karşılaştırdığımızda; hastaların sigara içme durumu ile miR-17-5p'nin artan ifade düzeyi arasında anlamlı bir fark saptandı ($p = 0,007$). Ayrıca miR-638'in artan ekspresyon düzeyi ile lokal ileri hastalığı olan abdominal metastazlı hastalar arasında anlamlı bir fark bulundu ($p = 0,03$). Elde edilen bulgular, incelenen miRNA'ların kanserli hastalarda onkogenik özellik gösterdiğini ve bu yolla lokal ileri evre hastalığı tetiklediğini düşündürmektedir. miR-16-5p, miR-17-5p ve miR-638 moleküllerinin over kanserini saptamak ve prognozunu göstermek açısından potansiyel biyobelirteçler olma olasılıklarının yüksek olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Over kanseri, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638, Biyobelirteç

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-29694.

ABSTRACT

Avşar Saral M. The Investigation of Expression Levels of miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 in Patients With Ovarian Cancer. İstanbul University, Institute of Health Science,, Department of Basic Oncology. Doctoral Thesis. İstanbul. 2019.

Ovarian cancer is a lethal gynecologic malignancy among women. More than 70% of women with ovarian cancer are diagnosed in advanced stages and most of these cases are incurable. Although most patients respond well to primary chemotherapy, tumors become resistant to treatment. MicroRNAs (miRNAs) are 19-25 nucleotide-long, small non-protein coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level through translational inhibition and degradation of their target mRNAs. Many miRNAs have been determined to act as oncogenes, tumor suppressors, and even modulators of cancer stem cells and metastasis.

Based on the findings obtained from the microarray study by our research team previously, we concluded that the miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 could be important in the etiology of ovarian cancer and had to be searched and validated in larger ovarian cancer cohort and healthy controls. The aim of the presented study was to determine whether they have a biomarker potential for the early diagnosis of patients with ovarian cancer and prognosis of the disease in larger ovarian cancer patients cohort and healthy controls. For this purpose, peripheral blood samples of 142 patients with ovarian cancer and 97 healthy controls which were ethnicity, age and gender-matched were used. For gene expression analysis, RNA isolation from lymphocytes, cDNA synthesis specific to miRNAs followed by Real-Time PCR methods were performed.

As a result of the study, it was seen that miRNA gene expression levels increased more than twice in the patient groups compared to healthy controls groups and it was statistically significant ($p < 0.05$). The p values obtained for each miRNA; miR-16-5p, $p < 0.001$; miR-17-5p, $p < 0.001$ miR-638, $p = 0.005$. In addition, when miRNA expression levels were compared with the clinical data of the patients; There was a significant difference between smoking status of patients and increased expression level of miR-17-5p ($p = 0.007$). There was also a significant difference between the increased expression level of miR-638 and patients with locally advanced disease ($p = 0.03$). The findings suggest that the miRNAs examined have an oncogenic character in cancer patients and thus, trigger the locally advanced disease. The miR-16-5p, miR-17-5p and miR-638 molecules are thought to be highly likely to be potential biomarkers for detecting ovarian cancer and demonstrating prognosis.

Key Words: Ovarian cancer, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638, Biomarker

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2018-29694

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Over kanseri ölümcül jinekolojik malignitelerden biri olup, serviks kanserinden sonra ikinci ölüm nedenidir [1].

Over kanseri hastalarının yaklaşık % 60-70'i abdominal metastaza sahip olup Evre III-IV olarak teşhis edilmektedir. Over kanseri, erken dönemde sıklıkla asemptomatiktir ve sonraki dönemlerde hastalarda abdominal şişkinlik, abdominal kitle, gastrointestinal semptomlar ve tümör infiltrasyonu veya kompresyonuyla ilişkili semptomlar görülmektedir [2]. Her ne kadar cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi yöntemleri sürekli geliştirilse de hastalığın 5 yıllık sağkalım oranı hala % 30'dur ve prognozu kötüdür . Evre I over kanseri olan hastaların 5 yıllık sağkalım oranları >% 90 gibi yüksek oranda olabilmekte ve çoğunluğu cerrahi ile tedavi edilebilmektedir. Bu nedenle hastaların 5 yıllık sağkalım oranını iyileştirmenin yolu over kanserinin erken teşhisidir. Dolayısıyla over kanserinin erken teşhis yöntemleri hala araştırılmakta olup, klinikte kullanılabilecek hassas ve spesifik biyolojik belirteçler bulunmamaktadır. Eğer, erken yaşta tanı ve tedavi için sağlıklı insanlarda over kanseri taraması yapılabilirse, over kanserli hastaların yaşam kalitesinin iyileştirilebileceği ve hayatta kalma süresinin uzayabileceği gösterilmiştir [1, 2].

MikroRNA'lar (miRNA) küçük kodlama yapmayan RNA'ların (small non-coding RNAs, sncRNAs) bir üyesi olan, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan RNA molekülleridir. miRNA'lar translasyonun baskılanmasını sağlayarak veya hedef mRNA'ların post-transkripsiyonel aktivitesini düzenleyerek kanser gelişim sürecinde rol almakta ve çoğalma, farklılaşma, apoptozise neden olarak malign dönüşüme katkı sağlamaktadır [3, 4].

Yapılan çalışmalarda farklı anlatım yapan ya da mutasyonlu miRNA'ların, hedef genine göre değişen yeni bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen sınıfı olarak kanser gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir [5]. İnsan tümörlerinin miRNA ekspresyon profilinin; tanı, evreleme, progresyon, prognoz ve tedaviye yanıt ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [6]. miRNA'ların over kanserindeki rolü, temelde diğer kanser çeşitlerindeki miRNA'ların ekspresyon profillemesi yoluyla keşfedilmiştir. miRNA'ların onkogenler ve tümör baskılayıcı genler gibi işlev yapmalarından dolayı over kanseri için de biyobelirteç olarak büyük bir potansiyele sahip oldukları

gösterilmiştir. Buna göre, miRNA biyobelirteçleri over kanserinin teşhisi ve prognozu için kontrol edilen diğer biyobelirteçlerden daha spesifik ve hassastır [1, 7, 8]

Ayrıca miRNA'ların sadece parafine fiske edilmiş dokularda veya hücre kültür soylarında değil, aynı zamanda tam kan, plazma ve serum da dahil olmak üzere insan kanında oldukça kararlı bir biçimde var olduğu gösterilmiştir [9].

Erken teşhisinin zor olması sebebi ile geç evrelerde tespit edilen over kanserini erken dönemde tespit edebilecek, invaziv olmayan ve kolaylıkla elde edilebilen bir materyal kullanılarak tespit eden biyobelirteçlere gerek vardır. Daha önce İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Kanser Genetiği Bilim dalında yapılan ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen proje (Proje No: TDK-2016-20140) yüksek riskli over kanserli vakalarda, miRNA mikroarray analizi ile 2549 adet miRNA'da ekspresyon farklılıkları belirlenerek, bunlar arasında anlamlı olarak gen ifade düzeyi değişen bazı miRNA'lar tespit edilmiştir. Planlanan tez çalışmasında, yüksek riskli over kanserli vakalarda daha önce yapılmış çalışmada over kanser etiyolojisinde önemli olduğunu düşündüğümüz miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 olmak üzere toplam 3 miRNA'nın daha geniş over kanserli hasta ve sağlıklı kontrol grubunda validasyonlarının yapılması, diyagnostik ve prognostik açıdan değerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Söz konusu 3 miRNA'nın 150 hasta ve hasta popülasyonu ile yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş 100 sağlıklı kontrole ait periferik kan lenfositlerinden oluşan deney grubunda araştırılması planlanmıştır. Çalışmanın sonunda söz konusu 3 miRNA'nın yüksek riskli over kanserli hastaların erken tanısında ve hastalığın prognozunda kullanılabilecek biyobelirteçler olup olmadıkları belirlenecektir. Tez çalışması sonucunda elde edilen bulgulara göre biyobelirteç olma potansiyeli belirlenen ve likit biyopsi biyobelirteci olduğu düşünülen miRNA'ların minimal rezidüel hastalığın belirlenmesi açısından kantitatif olarak değerlendirilme potansiyelleri konusunda daha ileri çalışmalar planlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OVER KANSERİ

2.1.1. Overlerin Anatomik Yapısı ve Karsinogenezi

Overler, pelvis yan duvarlarındaki arteria iliaca interna ile arteria iliaca externa arasında bulunan fossa ovarica'da yerleşmiş gri-pembe renkte, oval yapıda bir çift organdır. Yaklaşık 4-7 g ağırlığında ortalama 3,5 x 2,5 x 1,5 cm boyutlarındadır. Fallop tüpleri aracılığı ile uterusu bağlanırlar. Overlerden östrojen ve progesteron hormonları salgılanır ve ovum üretilir. Overlerde folikül içinde ovum olgunlaşırken, östrojen hormonu uterusu ovuma hazırlar. Endometrium kalınlaşır ve kan damarları yönünden zenginleşir. Folikül patlayıp ovum atıldıktan sonra corpus luteuma dönüşür. Corpus luteum progesteron salgılar. Ovum eğer döllenirse progesteron gebeliğin devamını ve memelerin gelişmesini sağlar [10].

Over kanseri patogenezinin aydınlatılmasındaki ana sorunlardan biri, klinikopatolojik özellikleri ve davranışları birbirine benzemeyen farklı tümör tiplerinden oluşan heterojen bir hastalık olmasıdır [11]. Over kanseri, yüzey epitel hücreleri, germ hücreleri ve seks kord veya stromal hücreler dahil olmak üzere overleri kapsayan hücrelerin transformasyonu ile başlamaktadır. Peri veya postmenopozal kadınlarda epitelyal hücre tümörleri daha sık ortaya çıkarken, genç kadınlarda germinal veya embriyonik tümörler daha belirgin görülmektedir [12].

Malign over tümörlerinin %80-90'ını overin yüzey epitelinden köken alan epitelyal over kanserleri (EOK) oluşturmaktadır. EOK'nin hücresel kökeni ve patogenezi karmaşık olup çeşitli hipotezlerle açıklanmaya çalışılmaktadır. Over yüzey epiteli, histolojik olarak pelvik ve karın boşluklarının içini döşeyen epitel olan mezotele benzemektedir. Aynı zamanda yüzey epitelinin ve mezotelin, ortak köken olarak çöломik epitelden geldiği bildirilmektedir [13]. Bu bilgilerden yola çıkan hipoteze göre; pluripotent çöломik epitel, overlerdeki kesintisiz ovulasyona bağlı inklüzyon kistleri oluşması ve somatik büyüme faktörleri etkisi ile metaplazik değişikliğe uğrayarak mezotelden, müllerian epiteline dönüşmekte ve EOK gelişimine yol açmaktadır. Diğer taraftan sekonder müllerian sisteme göre; EOK'nin alt tipleri olan seröz, endometrioid, müsinöz ve berrak hücreli karsinomların morfolojik olarak sırasıyla; fallop tüpü, endometrium, endoserviks ve vajinal epitele benzediği ve bu yapıların embriyogenez

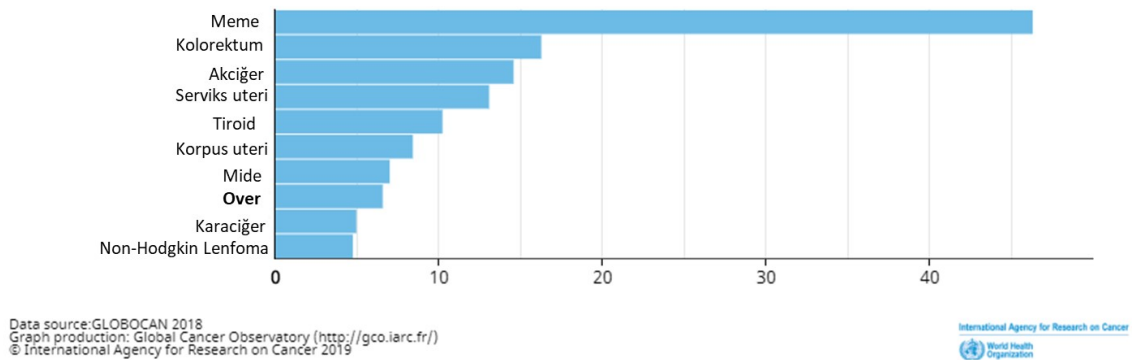
sırasında müller kanalından geliştiği bilinmektedir. Bu şekilde EOK'nin hücresel kökeni, müller fenotipine sahip tümörlerin embriyolojik kalıntılarına dayanarak açıklanmaktadır [14, 15].

Over kanserli hastalarda birçok genetik ve epigenetik değişikliğin bilinmesi ile birlikte, tümörigenez sırasında bu tür değişikliklerin nasıl seçildiği henüz net değildir [16].

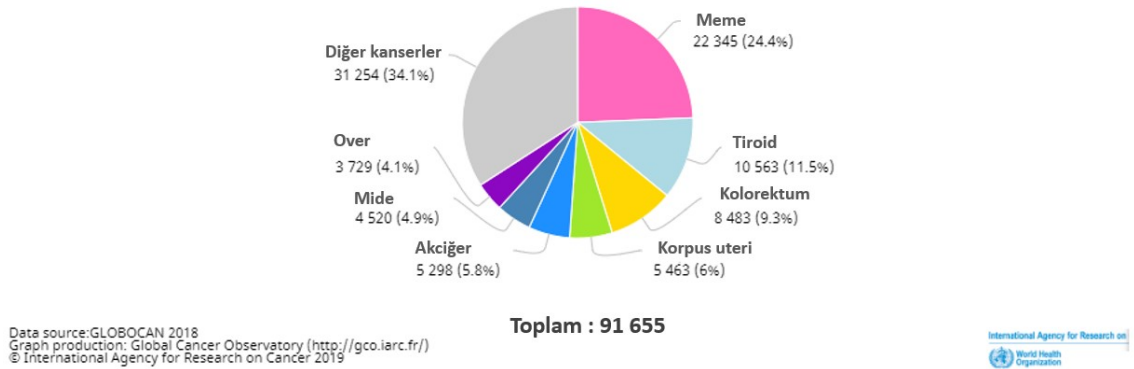
2.1.2. Epidemiyoloji

Over kanseri, tüm jinekolojik maligniteler içerisinde yüksek ölüm oranına sahip kanser çeşididir. Globocan 2018, Türkiye dahil 185 ülkenin kanser verilerini yayınlamıştır [17]. Sonuçlara göre over kanserinin görülme sıklığı tüm dünyada 8. sırada; Türkiye'de 7.sırada yer almaktadır. Over kanserleri dünya genelinde kansere bağlı ölüm sıralamasında 8. sırada yer alırken, jinekolojik kanserler arasında serviks kanserinden sonra, 2. ölüm nedenidir. Over kanseri dünya çapında 295.414 yeni vakadan ve 184.799 ölümden sorumludur. Ülkemizde 2018'de 3.729 kadının over kanseri teşhisi aldığı, 2.191 kadının bu kansere bağlı olarak hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir (Şekil 2-1, 2-2, 2-3) [18].

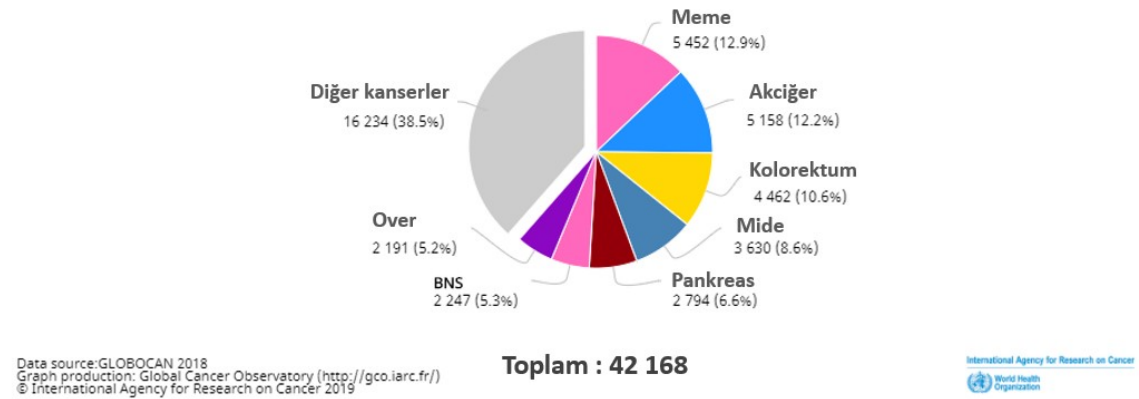
Bir kadında yaşam boyu over kanseri gelişme ihtimali %1,4, hastalıktan ölme riski %1'dir [19].



Şekil 2-1: Tüm dünyada kadınlar arasında tahmin edilen yeni vakaların insidansı



Şekil 2-2: Türkiye’de 2018’de kadınlar arasında tahmin edilen yeni kanser vakalarının sayısal verileri



Şekil 2-3: Türkiye’de kadınlar arasında görülen kanser vakalarındaki tahmin edilen ölüm oranları

2.1.3. Risk Faktörleri ve Koruyucu Faktörler

Over kanseri etiyolojisinde birçok faktör vardır. Aile öyküsü, ileri yaş, erken menarş, geç menopoz, nulliparite, infertilite, talk pudrası kullanımı gibi özellikler risk faktörleri kategorisinde iken, oral kontraseptif kullanımı, multiparite, emzirme, geçirilen cerrahi operasyonlar (histerektomi, tubal ligasyon ve bilateral salpingo-ooferektomi) koruyucu faktörlerdendir [19, 20].

2.1.3.1. Kalıtsal Risk Faktörleri

Kanserlerin genel olarak %10-15’i hereditör (kalıtsal) özellik göstermektedir. Over kanserleri için kalıtsal risk faktörleri olarak; Aile hikayesi, *BRCA1/2* mutasyon varlığı, Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC)/ Lynch II sendromu sayılabilir [21].

Ailede over kanseri öyküsü olan kadınların, hastalık riski altında oldukları iyi bilinmektedir. Over kanserinden etkilenen birinci derece akrabası olan kadınlar için risk, etkilenen akrabaları olmayanlara göre yaklaşık üç kat daha fazladır. Akrabası 50 yaşın altında teşhis edilenler için risk daha da yüksektir [22]. Ayrıca anneye göre, kız çocuğu ve kız kardeşlerde risk daha fazladır [23].

Moleküler genetik çalışmaları ile *BRCA1* ve *BRCA2* gen mutasyonlarının kalıtsal meme-yumurtalık kanser sendromuna yatkınlık kazandırdığı, yanlış eşleşme tamir genleri içinde en yaygın olan *MSH2* ve *MLH1* mutasyonlarının da Lynch sendromuna yol açtığı bilinmektedir [24] .

Kalıtsal kanserlerin yüksek bir oranı, *BRCA* genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Ancak *BRCA* mutasyonları, aile hikayesinde meme veya over kanseri öyküsü olmayan over kanserli kadınlar arasındada yaygındır. *BRCA1* mutasyon taşıyıcıları için 70 yaşına kadar over kanseri gelişme riskinin % 40-50, *BRCA2* için aynı riskin % 10-20 olduğu tahmin edilmektedir. *BRCA* mutasyonları ile en çok ilişkili olan over kanser türü, yüksek dereceli seröz tümörlerdir [22].

Sporadik over kanserlerinin büyük bir kısmı ileri tümör evreleri olarak görülürken, Lynch sendromu ile ilişkili over tümörlerinin % 35'i FIGO evre I tümörleri ile daha erken evrelerde ve erken yaşlarda ortaya çıkmaktadır. HNPCC ile en fazla ilişkili olan over kanseri alt tipleri endometrioid ve berrak hücreli karsinomdur [25] . HNPCC ile ilişkili mutasyonlara bağlı olarak, kadınlarda yaşam boyu over kanseri olma riskinin %12-20 olduğu tahmin edilmektedir [26] .

Ayrıca genetik epidemiyolojik çalışmalar, *BRIP1*, *RAD51C* ve *RAD51D* gibi DNA onarım genlerinde mutasyon olan kadınların yaşam boyu taşıdıkları riskin sırasıyla; % 5,8, % 5,2 ve % 12 olduğunu göstermekte ve herediter kanser sendromları ile ilişkilendirilmektedir [19, 27, 28].

2.1.3.2. Hormonal ve Reprodüktif Faktörler

Epidemiyolojik çalışmalar, over kanserinin patogeneğinde hormonal ve üreme faktörlerinin yerini açıkça göstermektedir. Over kanseri gelişiminde iki temel hipotez ortaya atılmıştır. Birincisi “kesintisiz ovulasyon” hipotezi; her bir yumurtlama döngüsünden sonra epitel yüzeyinde meydana gelen travmaya karşı, yüzey epiteli onarımı ile ilişkili hücrel bölünme oranının arttığını bu durumun da spontan

mutasyonlara neden olabileceğini öne sürmektedir [19, 29]. İkincisi "Gonadotropin hipotezi", luteinize edici hormon ve folikül uyarıcı hormonların over epitelinin, malign transformasyonunu ve hücre çoğalmasını uyardığını öne sürmektedir [19, 29, 30]. Bu hipotezler doğrultusunda oral kontraseptif kullanımı, gebelik ve emzirme gibi ovulasyonun baskılandığı durumların over kanserine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir [31].

Erken menarş, geç menopozun; kesintisiz ovulasyon hipotezine göre yumurtlama döngü sayısını artırarak riski de arttırdığı düşünülmektedir [19].

Gebelik ve paritenin (doğum sayısı) de over kanseri riskini önemli ölçüde azalttığı gösterilmekte ve her gebeliğin riski yaklaşık %15 azalttığı tahmin edilmektedir [19, 32].

Laktasyon, hipofizden gonadotropinlerin salınımını baskılamakta ve özellikle doğumdan sonraki ilk aylarda anovulasyona neden olmaktadır [19]. Metaanaliz çalışmalarında emziren kadınların, emzirmeyenlere göre %20-25 daha düşük risk taşıdıkları gösterilmiştir [22] .

Oral Kontraseptif kullanımı, over kanseri riskini anlamlı ölçüde azaltmaktadır. 21 ülkeden 45 çalışmanın verilerini toplayan bir analizde, over kanseri riskinin, oral kontraseptif kullananlarda, hiç kullanmayanlara göre yaklaşık %30 daha düşük olduğu gösterilmiştir [33].

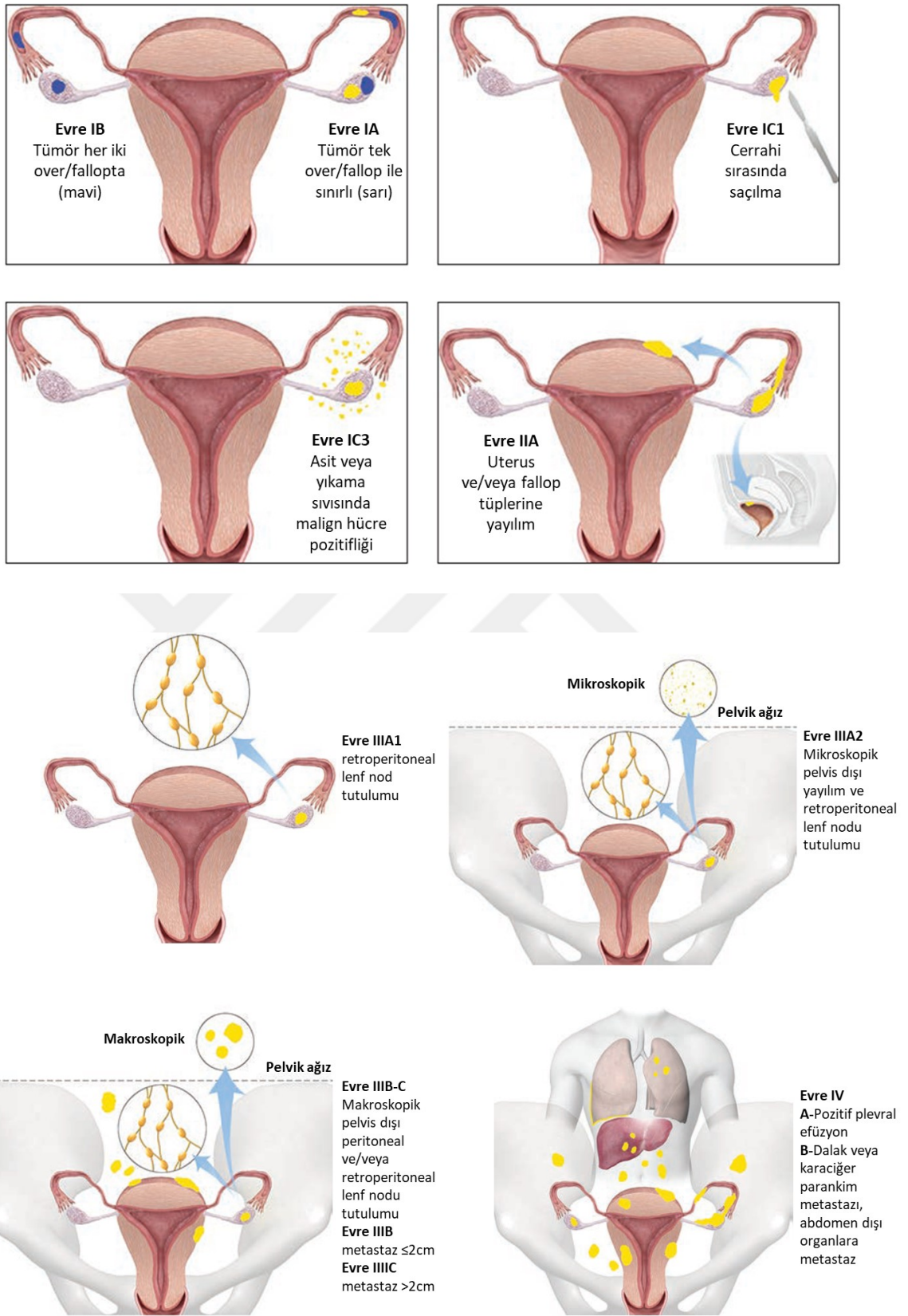
Hormon replasman tedavisinin özellikle menopoz sonrası kadınlarda over kanser riskini arttırdığı ve riskin uzun süreli kullanımla ilişkili olduğu gösterilmiştir [34, 35].

2.1.4. FIGO Evrelendirmesi

Over kanseri tüm jinekolojik maligniteler arasında en yüksek ölüm oranına sahiptir. Kanser evrelemesi prognozun değerlendirilmesi ve en uygun tedavinin planlanmasında kullanılan ilk ve en önemli adımlardan biridir. Over kanseri evreleme sistemi, Uluslararası Kadın Hastalıkları ve Doğum Federasyonu (FIGO) tarafından en son 2014 yılında revize edilmiştir [36].

Tablo 2-1: 2014 FIGO Evreleme Sistemi

EVRE I	Tümör overler veya fallop tüpleri ile sınırlıdır.
EVRE IA	Tümör tek over veya fallop tüpünde sınırlı, kapsül bozulmamış, yüzeyinde tümör yok, assit sıvısı veya peritoneal yıkantı sıvısında tümör hücresi yok
EVRE IB	Tümör her iki overde veya fallop tüpünde sınırlı, diğer özellikler Evre IA ile aynı.
EVRE IC	Tümör tek veya her iki overle sınırlı. Ancak;
IC1	Cerrahi sırasında saçılma
IC2	Cerrahi öncesi kapsül rüptürü veya over/ fallop tüp yüzeyinde tümör
IC3	Assit veya peritoneal yıkama sıvısında malign hücre pozitifliği
EVRE II	Tümör, primer peritoneal kanser veya pelvik yayılımı olan bir veya iki yumurtalık/ fallop tüpünü içerir.
EVRE IIA	Uterus ve/veya fallop tüplerine yayılım
EVRE IIB	Diğer pelvik intraperitoneal dokulara yayılım
EVRE III	Pelvis dışı yayılım; peritoneal implant ve/veya retroperitoneal lenf nodlarına metastaz
EVRE IIIA	Pelvis dışı mikroskopik metastaz ve/veya retroperitoneal lenf nodu tutulumu
IIIA1:	Yalnızca retroperitoneal lenf nod tutulumu IIIA1(i): Metastaz ≤ 10 mm IIIA1(ii): Metastaz >10 mm
IIIA2:	Mikroskopik pelvis dışı yayılım ve/veya retroperitoneal lenf nodu tutulumu
EVRE IIIB	Makroskopik pelvis dışı peritoneal metastaz ≤ 2 cm ve/veya retroperitoneal lenf nodu tutulumu (dalak veya karaciğer kapsülüne yayılım dahil).
EVRE IIIC	Makroskopik pelvis dışı peritoneal metastaz >2 cm ve/veya retroperitoneal lenf nodu tutulumu (dalak veya karaciğer kapsülüne yayılım dahil).
EVRE IV	Peritoneal metastaz dışı uzak metastaz
EVRE IVA	Pozitif plevral efüzyon
EVRE IVB	Dalak ve/veya karaciğer parankim metastazı, abdomen dışı organlara metastaz (inguinal lenf nodu ve abdomen dışı lenf nodları tutulumu dahil)



Şekil 2-4: Over kanserinde yeni FIGO evreleme sisteminin gösterimi

2.1.5. Histopatolojisi

2014 yılında “International Federation of Gynecology and Obstetrics” (FIGO) evrelendirme sisteminin güncellenmesi ile birlikte aynı yıl Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından over kanserlerinin histopatolojik sınıflandırması da daha tutarlı bir sınıflandırma amacı ile güncellenmiştir [37].

Eskiden malign seröz karsinomlar; adenokarsinoma ve papiller yüzey karsinoma şeklinde alt sınıflar içerirken, güncel sınıflandırmada yüksek dereceli ve düşük dereceli seröz karsinomlar şeklinde değiştirilmiştir. Eski sınıflandırmada yer alan transizyonel hücreli tümör sınıfı kaldırılmış olup, güncel sınıflandırmada sadece malign brenner tümörler şeklinde isimlendirilmektedir. Yine önceden yer alan skuamöz epitelyal tümörler de yeni sınıflandırmada yer almamaktadır. Ayrıca yeni bir sınıflandırma olan seromüsinöz tümörler alt tipine yer verilmiştir [37, 38].

Morfolojik olarak, yumurtalık kanseri iki kategoriye ayrılmaktadır:

-Non-Epitelyal Over Kanseri (NEOK): Over kanseri vakalarının % 10-15’ini oluştururlar. İki tip NEOK vardır: germ hücreli tümörler (GCT) ve seks kord stromal tümörleri (SCST) [39]. Seks kord-stromal tümörler, dört hücre tipinden (theca hücreleri, stromal hücreler, granüloza hücreleri veya sertoli-leydig hücreleri) birinden kaynaklanır ve tüm malign over tümörlerinin yaklaşık % 7’sini oluştururlar. Sıklıkla hormonal anormalliklerle ilişkilidirler [13, 36]. Germ hücreli tümörler ilkel germ hücrelerinden kaynaklanır ve tüm over tümörlerinin yaklaşık % 25’ini ve malign over tümörlerinin % 3-7’sini oluştururlar [36, 40].

-Epitelyal Over Kanseri (EOK), Epitelyal stromal tümörlerden gelişirler. Over kanserlerinin % 85-90’ı ile büyük çoğunluğunu oluştururlar. Moleküler ve genetik analizlerdeki son gelişmelerle birlikte Epitelyal Over Karsinomları (EOK); Tip I ve Tip II tümörler olarak ikiye ayrılmıştır [39].

Tip I tümörler; düşük dereceli seröz, endometrioid, berrak hücreli, müsinöz karsinomlar, malign brenner tümörler ve serömüsinöz tümörleri içerirler. Tip II tümörler; yüksek dereceli seröz karsinom (HGSC), karsinosarkom ve farklılaşmamış karsinomları kapsamaktadır. Tip I tümörleri, over üzerine implante olan ve daha sonra malign transformasyona maruz kalabilen genellikle iyi huylu ekstraovaryan lezyonlardan gelişirler. Buna karşılık birçok tip II karsinomu, fallop tüpündeki intraepitelyal karsinomlardan gelişir ve sonuç olarak over ve ekstraover bölgeleri içeren

karsinomlar olarak yayılır. Bu sebeplerle, Tip I over tümörleri genelde klinik olarak daha yavaş seyreden, genetik olarak daha stabil ve iyi prognozlu tümörlerdir. Tip II tümörler ise genetik olarak unstabil, geç evrede farkedilen ve daha agresif seyreden tümörlerdir [39, 41]. 5 yıllık sağkalım oranları; Tip I tümörlerde yaklaşık olarak %55, Tip II tümörlerde %30'dur [42].

Diğer taraftan daha genel olarak epitelyal over tümörleri, görülme sıklığına göre beş alt tipe ayrılmaktadır [36, 43]. Bu tümör tipleri şu şekildedir:

- Yüksek dereceli seröz karsinom (HGSC), %70
- Endometrioid karsinom, %10
- Berrak hücreli karsinom, % 10
- Müsinöz karsinom % 3
- Düşük dereceli seröz karsinom (LGSC), <% 5

2.1.6. Over Kanserinde Görülen Moleküler Değişiklikler

Tip 1 tümörler; *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *CTNNB1*, *PTEN*, *PIK3CA*, *ARID1A* ve *PPP1A* da dahil olmak üzere spesifik mutasyonlar ile karakterizedir. Çok nadir olarak *TP53* mutasyonu saptanmıştır. Tip II tümörlerde ise *TP53* mutasyonları sık görülmektedir. Ayrıca tip II tümörler, gen mutasyonu veya promotor metilasyonu ile *BRCA*'nın ekspresyonunu bozan moleküler değişikliklere sahiptir. *BRCA* inaktivasyonu tip I tümörlerde rapor edilmemiştir [11, 44]. Bu iki tip over tümöründe görülen genetik değişiklikler Tablo-2-2'de özetlenmiştir [42].

Tablo 2-2: İki tip over karsinomunda görülen moleküler genetik değişiklikler [42].

Genetik Değişiklikler	Tip I Tümörler	Tip II Tümörler
<i>PTEN</i> mutasyonları	% 15–20	Düşük
<i>HNF-1 β</i> aşırı ekspresyonu	% 90	Düşük
<i>ARID1A</i> mutasyonları	% 40–50	?
<i>CTNNB1</i> mutasyonları	% 30	Düşük
<i>PIK3CA</i>	% 20	Düşük
Mikrosatellit instabilitesi	% 50	% 8–28
<i>KRAS</i> mutasyonları	% 30–65	Düşük
<i>BRAF</i> mutasyonları	% 30–65	Düşük
<i>TP53</i> mutasyonları	Düşük	% 50–80
<i>HER2/neu</i> aşırı ekspresyonu	Düşük	% 20–67
<i>AKT</i> aşırı ekspresyonu	Düşük	% 12–30

<i>p16</i> inaktivasyonu	Düşük	% 15
<i>HLA-G</i> aşırı ekspresyonu	Düşük	% 61
<i>APO E</i> aşırı ekspresyonu	% 12	% 66
<i>BRCA1/BRCA2</i> mutasyonları	Düşük	Yüksek
<i>Ki67</i> proliferasyonu	% 10–15	% 50–75

2.1.7. Tanı ve Tedavi Yaklaşımları

Erken teşhis, over kanserinin tedavi başarısını arttırmaktadır. Over kanserinin sadece %15'inin overlerde lokalize olduğu, %17'sinin bölgesel, %62'sinin uzak yerleşimli hastalık olarak ortaya çıktığı tahmin edilmektedir [45].

Pelvik muayene sırasında adneksiyal bir kitlenin palpasyonu genellikle over kanseri için tanısal bir değerlendirme başlatır. Ultrason muayenesi, en kullanışlı invaziv olmayan tanı testidir. Çoğu iyi huylu tümör olmasına rağmen, şüpheli bir adneksiyal kitle nedeniyle ameliyat geçiren kadınların %13 ile %21'i over malignitesine sahip olabilmektedirler. Ameliyat önerisi, bu kitlenin malign olabilme ihtimaline bağlıdır. Yaş, menopoz durumu, aile öyküsü, kitlenin büyüklüğü ve karmaşıklığı, CA-125 seviyesi, kitlenin ünilateral veya bilateral olması ve ultrason bulguları göz önünde bulundurulması gereken faktörlerdendir [46].

Cerrahi ve kemoterapi ana tedavi yöntemlerindendir. Standart cerrahi işlemler; total abdominal histerektomi bilateral salpingo-ooferektomi (TAH-BSO), omentektomi, peritoneal yıkaması, pelvik/paraaortik lenf nodu biyopsileri ve çoklu periton biyopsileridir [47].

İleri evre over kanseri hastalar için tam kür şansı çok azdır. Hastaların çoğu ilk sitoredüktif cerrahi ve kombine kemoterapisinden sonra tam bir klinik remisyon elde etmektedir [46].

Erken evrede olan hastalar, orta veya yüksek riskli bir tümöre sahipse, hem uygun şekilde evrelendirilmekte hem de platin bazlı adjuvan kemoterapi ile tedavi edilmektedir. İleri evrede olan hastalar için şu anda önerilen tedavi, primer sitoredüktif cerrahi ve ardından platin-paklitaksel kombine kemoterapisidir [12].

Cerrahi uygulamalar ve kemoterapideki ilerlemeler sağ kalım oranlarını arttırsa da henüz beklenen seviyelere ulaşamamıştır. Erken evrede 5 yıllık sağ kalım oranları %90 civarındayken ileri evrede bu oran %30'lara düşmektedir [48].

2.2. MİKRORNA (miRNA)

MikroRNA'lar (miRNA'lar) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda küçük protein kodlamayan RNA ailelerinden biridir. Post-transkripsiyonel olarak gen ifadesini düzenleyen moleküllerdir. Translasyonun baskılanmasını veya mRNA'nın yıkımını, diziye özel gen düzenlenmesini sağlarlar. Böylece hücre proliferasyonu, metabolik olaylar, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol alırlar [49, 50]. miRNA genleri bağımsız olarak veya kümeler içinde ifade edilebilirler [51]. Çoğunlukla intronik bölgelerde bulunmakla birlikte, ekzonik veya intergenik yerleşimli olabilirler. İnsanlarda Y kromozomunda bulunmazlar [52, 53]. Tüm genlerin yaklaşık % 1-3'ünü miRNA genleri oluşturmakta ve protein kodlayan genlerin %30'unun miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir [54, 55]. Bugüne kadar, insan genomunda 2000'den fazla miRNA tanımlanmıştır [56]. Bir miRNA birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebilmekte ve mRNA'ların her biri birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilmektedir [57].

2.2.1. MikroRNA'ların Keşfi

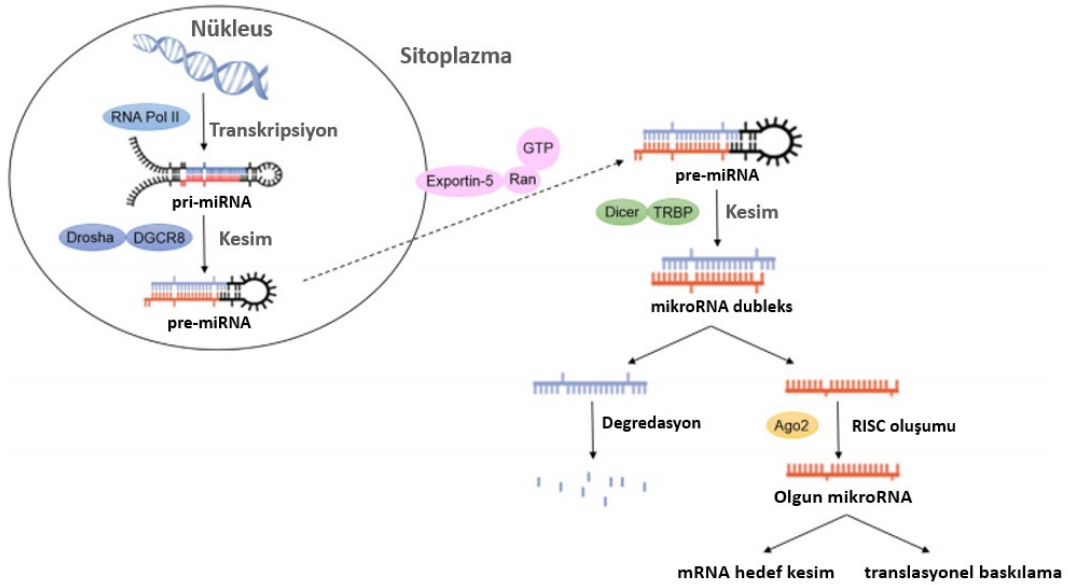
İlk mikroRNA (*lin-4*) 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans*'ın genetik yapısı araştırılırken keşfedilmiştir [58]. *Lin-4*; *lin-14*'ün ekspresyonunu düzenleyerek gelişimi etkileyen, protein kodlamayan küçük bir RNA olarak tanımlanmıştır. 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları heterokronik gen *lin-41*'in ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen bir başka miRNA olan *let-7*'yi gösterdiler [59]. İlk keşfedilen *lin-4* ve *let-7* molekülleri ve ardından çok sayıda tanımlanan bu küçük RNA molekülleri için miRNA ifadesi ilk defa 2001 yılında kullanılmaya başlandı [60].

2.2.2. MikroRNA'ların Biyogenezi ve Fonksiyonu

miRNA'ların oluşum mekanizması hem nüklear hem de sitoplazmik aşamaları kapsayan üç basamakta tamamlanmaktadır; İlk olarak RNA Polimeraz II tarafından transkripsiyon yoluyla primer miRNA'lar (pri-miRNA) oluşmaktadır. İkinci adımda pri-miRNA'lar bazı enzimler aracılığı ile nükleus içerisinde prekürsör RNA'lara (pre-miRNA) dönüştürülmekte ve son adımda sitoplazma içerisinde olgun miRNA'ların oluşumu gerçekleşmektedir [61] .

miRNA'lar çekirdekte RNA Polimeraz II (Pol II) veya RNA Polimeraz III (Pol III) tarafından transkripte edilmektedir [62]. Oluşan primer transkript (pri-miRNA), 5'

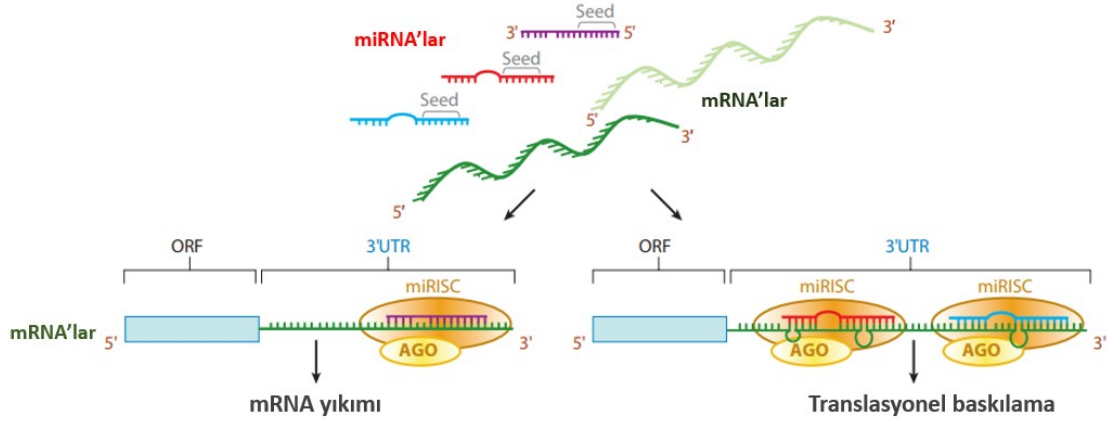
cap (başlık bölgesi) ve Poli A (Poliadenilat polimeraz) kuyruk yapısına sahiptir [50]. Daha sonra pri-miRNA'lar, RNA-bağlayıcı protein DGCR8 (DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8) ve tip III RNaz Drosha'dan oluşan bir kompleks ile kesilerek pre-miRNA olarak adlandırılan yaklaşık 85-nükleotidlik sap-ilmek yapısından oluşan bir moleküle dönüştürülür [63, 64]. Ardından pre-miRNA Exportin5 (Exp-5) /RanGTP ile sitoplazmaya taşınır. Exp-5 aynı zamanda pre-miRNA'nın stabilizasyonu için de önemlidir. Pre-miRNA'nın sap-ilmik yapısı başka bir RNaz III proteini olan Dicer ve Transaktive edici yanıt oluşturan RNA bağlanma proteini (TRBP) tarafından kesilerek yaklaşık 22 nükleotidlik miRNA dupleksine dönüştürülür. Bu çift zincirli yapının biri kılavuz iplik olarak isimlendirilir ve Argonaute (Ago) içeren, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) olarak bilinen bir efektör kompleksi içine dahil edilir [56, 65]. Anti-kılavuz olarak isimlendirilen diğer iplik ise degrade olur. RISC kompleksine dahil olan olgun miRNA'lar, hedef mRNA'nın 3'UTR (Çevrilmeyen bölge)'sine bağlanarak mRNA'nın yıkımına ya da translasyonun baskılanmasına yol açarlar (Şekil 2-5) [66].



Şekil 2-5: miRNA'nın oluşum mekanizması [49]

miRNA'nın 5' ucundaki yaklaşık 7 nükleotidlik bölge tohum bölgesi "seed region" olarak adlandırılır ve hedef mRNA'ları bu bölge aracılığı ile tanırlar [67]. Eğer mRNA'nın 3' UTR bölgesi ile miRNA arasındaki komplementerlik yüksek seviyede ise RISC hedef mRNA'ları yıkıma uğratar. Daha düşük seviyede ise hedef mRNA'dan translasyon baskılanır (Şekil 2-6) [49, 68]. miRNA'ların hedef mRNA'daki

komplementer diziyi tanıdıkları “miRISC” yapısı hedef mRNA’nın ORF (Açık Okuma Alanı) bölgesine de bağlanabilir. Bu bağlanma tam komplementerlik gerektirir ve Ago2 aracılığı ile mRNA yıkımı gerçekleştirilir [68].



Şekil 2-6: miRNA'nın hedef mekanizması [68]

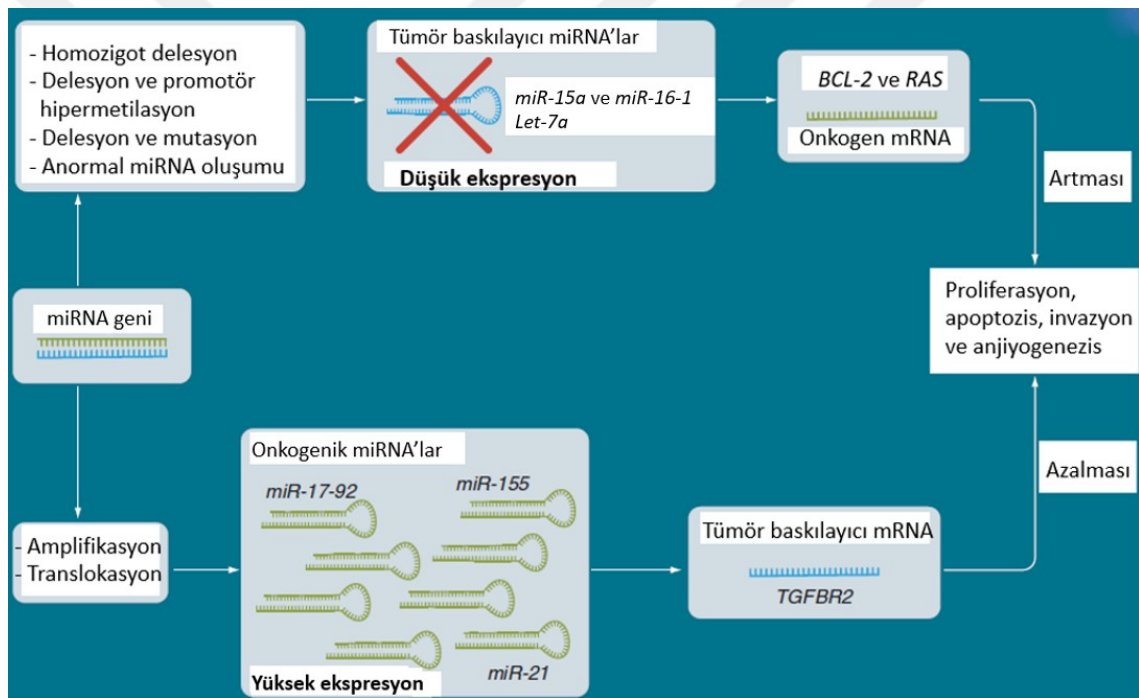
2.2.3. MikroRNA'lar ve Kanser

Birçok miRNA geninin kromozomun kırılğan yerleri, heterozigotluk kaybının olduğu bölgeler gibi kanserle ilişkili genomik bölgelerde bulunması, miRNA'ların kanserle bağlantılı olduğunu desteklemektedir [5, 69]. Son bulgular spesifik miRNA'ların, invazyon ve metastaz süreçlerinde, neoplastik transformasyonun erken ve ileri aşamaları boyunca önemli role sahip olduğunu göstermektedir [51].

Kanserin diagnozu, prognozu ve tedaviye yanıtının değerlendirilmesinde miRNA'lar kullanılabilir. Bu doğrultuda miRNA ekspresyon profilleri normal ve malign dokuyu ayırt etmek için kullanılabilir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar global miRNA ekspresyon profillemesinin, histoloji ve mRNA bazlı teşhislerin tümörleri ayırt edemediği durumlarda kullanılabileceğini göstermektedir. MiRNA ekspresyon profillerinin bilinmeyen kökenli tümörleri ayırt etmedeki üstünlüğünün nedeni, miRNA'ların doku gelişimine ve farklılaşmasına doğrudan dahil olmalarıyla ilgili olabilir [70, 71]. miRNA ekspresyon profillemesi, endokrin ve asiner pankreas tümörleri [72], pulmoner adenokarsinomu ve skuamöz hücreli karsinom gibi aynı organın farklı histolojik tümör tiplerinin ayırt edilmesinde de kullanılabilir [73]. Ayrıca, ayırım histolojik olarak benzer, moleküler köken olarak farklı tümörler arasında da yapılabilir. Farklı sitogenetik özelliklerdeki akut lenfoid ve akut miyeloid lösemiler,

farklı mRNA ifadesine sahip ABC (Aktif B Hücreli) ve GCB (Germinal Merkez B Hücreli) gibi DLBCL'nin (Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma) alt tipleri örnek gösterilebilir [70, 74].

Kanserde miRNA'lar, onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak görev yapan düzenleyici moleküller olarak işlev görmektedir [5]. Tümör baskılayıcı olarak adlandırılan miRNA'lar onkogenleri hedef alırken, onkogenik miRNA'lar da tümör baskılayıcı genlerin inhibitörleri olarak adlandırılmakta ve bu şekilde kanser oluşum sürecinde rol almaktadırlar (Şekil 2-7) [55, 75]. Kanserde ekspresyon düzeyi azalan miRNA'lar; tümör baskılayıcı miRNA'lar, TS-miR; ekspresyon düzeyi artan onkogenik miRNA'lar ise onkomiR olarak isimlendirilmektedir [70].



Şekil 2-7: Tümör baskılayıcı ve onkogenik miRNA'lar [55]

2.2.3.1. Tümör Baskılayıcı mikroRNA'lar

miRNA'lar ve kanser arasındaki bağlantı ilk olarak 2001 yılında B hücreli Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarında çoğunlukla delesyona uğrayan 13q14 bölgesinde, mir-15a ve miR16-1 varlığı ile tanımlanmıştır [76]. Daha sonraki çalışmalarda KLL'de gösterilen, mir-15a ve miR16-1'in düşük ekspresyon seviyelerinin anti-apoptotik gen olan Bcl-2'yi hedef alarak anormal hücre çoğalmasına yol açtığı ortaya koyulmuştur. Dolayısıyla her iki miRNA'nın Bcl-2'yi posttranskripsiyonel

seviyede negatif olarak düzenlediği ve tümör baskılayıcı rol oynadığı gösterilmiştir. [77].

Tümör baskılayıcı rolü gösterilen ilk miRNA'lardan biri de let-7'dir. Let-7'nin sıklıkla akciğer meme ve kolon kanserlerinde ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir [69]. Özellikle akciğer tümör dokusunda let-7 ekspresyon seviyesinin düşmesi Ras onkogeninin kontrolsüz çalışmasına yol açmıştır. Ras, hücre çoğalmasını, büyümesini, hücre iskeleti organizasyonunu, hücre hareketlerini ve hayatta kalmayı etkileyen hücre yüzeyi reseptörlerinden fonksiyonel hücre içi yola sinyalleri ileten bir sinyal GTPaz'dır. Aktif Ras mutantlarına (H-Ras, K-Ras ve N-Ras) kolon, tiroid, pankreas ve akciğer kanserlerinde rastlanmaktadır. Let-7, translasyonu engelleyen 3'UTR bölgesine bağlanarak Ras, K-Ras ve N-Ras'ın aktivitesini düzenlemektedir. Bir tümör baskılayıcı olarak işlev gören let-7, Ras'ın ve modüle ettiği hücresel süreçlerin baskılanmasına aracılık etmektedir [61, 78].

2.2.3.2. Onkogenik mikroRNA'lar

Onkogenik miRNA'lar, tümör baskılayıcı özellikteki hedef mRNA'yı baskılayarak, apoptozun engellenmesi ve kontrolsüz büyüme yönünde etki gösterirler. Onkogenik özelliği tanımlanmış ilk miRNA'lardan (onkomir-1) olan MiR-17-92 gen kümesinin (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 ve miR-92a) karsinogeneze etkisi birçok solid tümör ve hematolojik malignitede gösterilmiştir. MiR-17-92 kümesi güçlü bir onkogen olarak 13q31 genomik lokusunda bulunmaktadır. Onkogenik transkripsiyon faktörü olan c-myc MiR-17-92 gen kümesini transaktive etmektedir. MiR-17-92 kümesinin en açık şekilde belirlenmiş hedefi, miR-17-5p ve miR20a tarafından düzenlenen transkripsiyon faktörü E2F1'dir. Diğer taraftan miR-17-92 gen kümesinin 30'dan fazla hedef geni olması sebebi ile hedef gene göre bazen tümör baskılayıcı rol oynadığı gösterilmiştir [79-81].

Mir-21; meme, kolon, karaciğer, beyin, pankreas ve prostat gibi kanser türleri başta olmak üzere neredeyse bütün kanserlerde aşırı ekspresyonu gözlenmiş en yaygın onkomirlerden biridir. Mpsin, PDCD4 (programlanmış hücre ölümü 4), TPM1 (tropomiyosin 1) ve PTEN'i (fosfataz ve tensin homoloğu) içeren dört tümör baskılayıcı geni inhibe ederek, hücre transformasyonu, tümör büyümesini, invazyon ve metastazı teşvik etmektedir [61, 82].

OnkomiR olduğu gösterilen ilk miRNA'lardan biri de miR155'tir [70]. Protein kodlamayan bir gen olan BIC (B hücresi entegrasyon kümesi) ile birlikte gen ifadesinin arttığı gösterilen bu miR-155'in özellikle diffüz büyük hücreli, hodgkin ve burkitt lenfoma gelişimine yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca meme, akciğer ve kolon kanseri gibi solid tümörlerde miR155'in aşırı ekspresyonunun kötü prognozla ilişkisi vardır [83, 84]. Mir-155 immün sistemin düzenlenmesinde, özellikle T yardımcı hücre farklılaşması ve optimal bir T hücresine bağlı antikor cevabı üretmek için önemli bir role sahiptir. miR-155 kısmen sitokin üretimini düzenleyerek bu kontrolü uygulamaktadır [85].

2.2.3.3. MikroRNA'lar ve Over Kanseri

Yumurtalık büyümesi, farklı foliküler hücrelerde önemli morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerin eşlik ettiği bir dizi karmaşık ve koordineli işlemle gerçekleşmektedir. Overlerin gelişimi ile ilişkili küçük ncRNA'lar (kodlama yapmayan RNA'lar) arasında, miRNA'lar en yaygın olarak çalışılan ve ilk olarak aydınlatılan ncRNA'lardır [86]. MiRNA'ların yumurtalık folikülü büyümesinde steroid hormon reseptörlerinin düzenlenmesinde görev aldıkları bildirilmiştir. Dicer, hücre gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan olgun fonksiyonel miRNA'ların sentezi için gerekli bir ribonükleaz III'tür. Fare overinde, Dicer1 proteininin, folikülün hem oosit hem de granülosa hücrelerinde ifade edildiği ve Dicer1 tarafından düzenlenen miRNA sinyal yolunun, faredeki folikül gelişiminde önemli bir rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Dicer1 inaktivasyonunun, folikül dejenerasyonuna yol açtığı gösterilmiştir [87]. miRNA'ların over gelişiminde rol alması sebebi ile kadın üreme sisteminde kanser başta olmak üzere birçok patoloji ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda aktarılmıştır [86, 88].

miRNA'ların over kanserinde önemli bir rol üstlendiğini öneren ilk çalışma 2006'da yayınlanmıştır. Çalışma miRNA genlerinin yaklaşık % 40'ının DNA kopya sayısı değişiklikleri içerdiğini ortaya koymuş ve miRNA genlerinin genomik değişiminin kanser gelişiminde kritik bir adım teşkil edebileceğini öne sürmüştür [1, 89]. Over kanseri hastalarında sağ kalım oranını arttırmak için; over kanseri taraması, erken teşhis ve ayrıca kemoterapötik ilaçlara yanıtın izlenmesine daha spesifik ve hassas biyobelirteçlere ihtiyaç duyulduğu ve bu konuda araştırmaların artırılması gerektiği bildirilmektedir [1]. Epitelyal Over Kanserinde (EOK) anormal şekilde eksprese edilen miRNA'ların keşfi, over tümörigenezinde ve ilerlemesinde yeni yollar tanımlamıştır.

Biyolojik sıvılardaki miRNA ekspresyon profilleri, EOK'nin saptanması ve izlenmesi için potansiyel olarak kullanılabilir [90]. Diğer taraftan kanserle ilişkili miRNA'larda görülen somatik mutasyonlar, over kanserinde daha nadir görülmektedir [91].

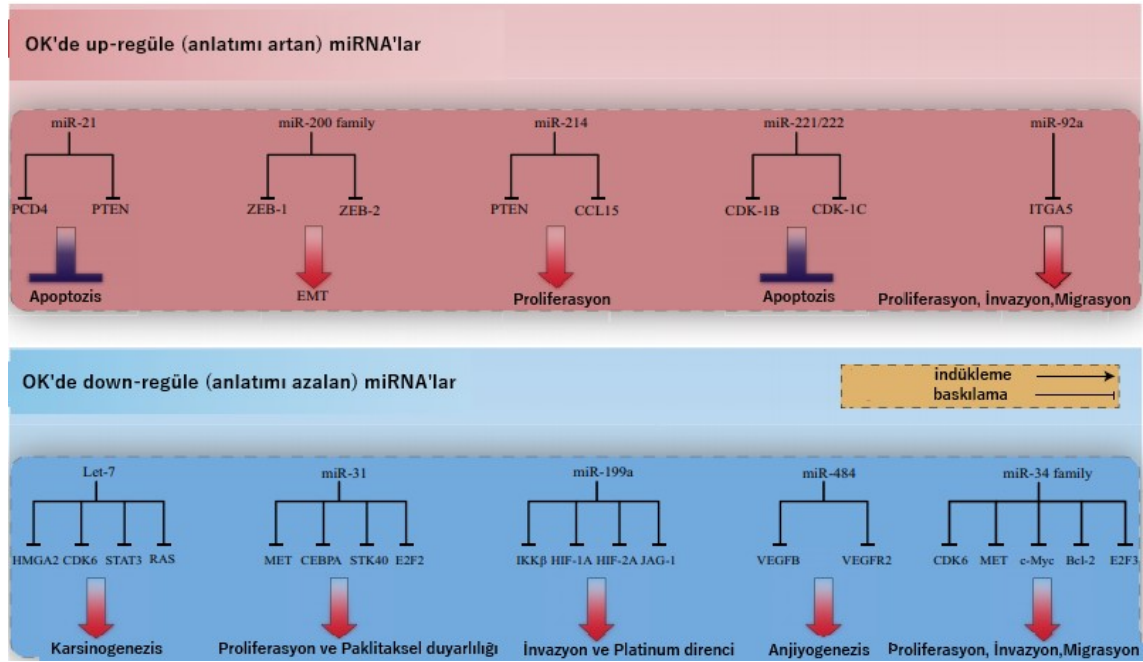
Over kanseri diyagnozunda, miRNA'ların potansiyel rolü birçok çalışmada değerlendirilmiştir (Tablo 2-3) [92]. Over kanserinde en çok tanımlanmış miRNA'lar içinde anlatımı artanlar; miR-200 ailesi (miR-200a, miR-200b ve miR-200c), anlatımı azalanlar ise; let-7 ailesi ve miR-199a, miR-140, miR-145 ve miR-125b1'dir [93, 94]. Ayrıca miR200 ailesinin seröz epitelyal karsinomada normal over dokusuna göre önemli derecede yüksek seviyelerde ifade edildiği gösterilmiştir [92, 94]. MiR-200a ve miR-200c, seröz, endometrioid, berrak hücreli ve karışık karsinom gibi tüm histolojik gruplarda aşırı eksprese edilirken, miR-200b ve miR-141 endometrioid ve seröz over kanser alt tiplerine spesifiktir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, sağlıklı kontrollerle karşılaştırılan malign ve benign over kanseri olan hastalarda, serum miR-145'in belirgin bir şekilde anlatımının azaldığı bildirilmiş ve sonuçlar over kanserini saptamada miR-145'in potansiyel olağanüstü bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini öne sürmektedir [93].

Tablo 2-3: Over kanserinde potansiyel belirteç olan miRNA'lar

Örnek	Anlatımı değişen miRNA'lar
Seröz karsinoma	↑ miR-205, miR-429, miR-141, miR-200c, miR-93, miR-16, miR-20a, miR-21, miR-27a, miR-200a, miR-200b, miR-200c [95-97]
	↓ miR-320c, miR-383, let-7b, miR-99a, miR-125b, miR-145, miR-100, miR-31, miR-137, miR-132, miR-26a [96-98]
EOK Hücre Hattı	↑ miR-26, miR-26b, miR-103, miR-182, miR-203 [99, 100]
	↓ miR-377, miR-432, miR-124a, miR-436, let-7d [99]
Berrak Hücreli Karsinoma	↑ miR-93, miR-126, miR-338-3p, miR-200a, miR-200c, miR-30a, miR-141, miR-182-5p, miR-200a-3p, miR-510 [97, 101-103]
	↓ miR-383, miR-424-5p, miR-127, miR-155, miR-99b [97, 103]
Endometrioid	↑ miR-21, miR-29a, miR-92, miR-30c1, miR-126 [101]

↓ miR-342-3p, miR-181a-3p, miR-450b-5p, miR-155, [101, 104]
miR-127, miR-99b

MiRNA'lar, çoklu hedef genleriyle etkileşerek over kanseri patogenezinin çeşitli moleküler sinyalleşme yollarlarını kontrol eder ve bu genlerin fonksiyonlarını negatif yönde regüle ederek tümör oluşumunda rol oynarlar (Şekil 2-8) [1].



Şekil 2-8: Over karsinomunda ifadesi sıklıkla değişen miRNA'lar için bilinen hedeflerin şematik gösterimi [1]

2.3. Tanıda Kullanılan Biyobelirteçler

Tümör biyobelirteçleri; kanser hücresi veya çevresindeki hücreler tarafından üretilen, kanserin tanısı, taraması veya tedavisi sürecinde, vücut sıvılarından ya da kandan ölçülebilen moleküllerdir. Hücre yüzeyi antijenleri, sitoplazmik proteinler, enzimler, hormonlar, onkofetal antijenler, reseptörler, onkogenler veya onların ürünleri gibi çeşitli maddeler içerirler.

İdeal bir tümör biyobelirtecinde bulunması gereken özellikler:

- ✓ Belirlenen kanser tipine özgül olmalıdır
- ✓ Erken tanı ve tarama için yeterli duyarlılığa sahip olmalıdır
- ✓ Yarılanma ömrü kısa olmalı ve sık izlem yapılabilmelidir
- ✓ Prediktif ve prognostik yararı bilinmelidir

- ✓ Saptama için kullanılan test tarama için ucuz olmalıdır [105].

Over kanseri riskinin değerlendirilebilmesi için, 2009 yılında OVA1, 2011 yılında Over Malignite Riski Algoritması (*ROMA-Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*) isimli iki algoritma Amerikan gıda ve ilaç idaresi (*FDA-Food and Drug Administration*) tarafından onaylanmıştır. ROMA; over kanseri riskini hesaplamak için, CA-125 ve HE4 konsantrasyonlarını ölçen kantitatif bir testtir. OVA1; görüntüleme, menopozal durum ve CA-125 verilerinin, apolipoprotein A1, transtiretin, transferrin ve β 2-makroglobülin dahil olmak üzere diğer dört protein biyobelirteçleri ile birleştirilerek hesaplanan çok değişkenli bir testtir [106].

CA-125 (Kanser antijeni-125) MUC16 geni tarafından kodlanan büyük bir transmembran glikoproteini olup, over kanserinin tanısında en yaygın kullanılan tümör biyobelirtecidir [107]. Over kanseri olan hastaların yaklaşık % 80'inde CA-125 seviyesi yükselmiştir. Ancak erken evre over kanseri olan hastaların sadece % 50-60'ında CA - 125 yüksek bulunmuştur. CA-125'in tek başına değerlendirilmesi yanlış pozitifliğe yol açabilir. Çünkü CA-125'deki artış; pankreas, meme, mesane, karaciğer, akciğer kanseri gibi diğer kanserlerde de görülmektedir [2, 108]. CA-125'in HE4, CA19-9, CA72-4 ve CA-153 gibi diğer biyobelirteçlerle kombine edilmesi nükslerin taranması ve izlenmesinde duyarlılığını artırabilmektedir [109]. CA-125'in anlatımı kanser gelişiminin yanı sıra menstrüasyon veya hamilelik gibi bazı fizyolojik süreçlerde de artabilmektedir [110]. Diğer taraftan malign ve benign tümörlerde ayırım yapamaması nedeni ile özgüllüğü ve duyarlılığı zayıf kalmaktadır. Bu sınırlamalardan dolayı over kanserinin erken uyarısı veya teşhisi için yeni biyolojik belirteçlere ihtiyaç vardır [2, 111]. CA-125'i tamamlamak için, kanda ya da fallop tüpünden, rahimden veya serviksten alınan sıvılarda bulunan otoantikörler, dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) ve mikroRNA'ların potansiyeli konusundaki kanıtlar artmaktadır [112] .

Over kanserinin erken tespiti için bir başka önemli protein biyobelirteç, WFDC2 geni tarafından kodlanan bir glikoprotein ürünü olan insan epididimis proteini'dir (HE4). CA-125 ekspresyonu olmayan over kanserli hastaların % 50'sinde, HE4'ün CA-125'e kıyasla over kanserinin izlenmesinde daha iyi bir potansiyele sahip olduğunu gösteren yüksek HE4 seviyeleri bildirilmiştir. HE4 iyi huylu ve kötü huylu tümörleri ayırt etmek için de daha iyi bir kapasiteye sahiptir. Birçok over kanseri tarama

araştırması, kombinasyonel biyobelirteç stratejisinin tek bir protein biyobelirteç kullanmaktan daha güvenilir, duyarlı ve spesifik olduğunu söylemektedir [113].

MikroRNA'lar over kanseri tanısında potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirildiğinden, bu miRNA moleküllerinin tek başına ya da hali hazırda klinik rutin incelemede kullanılan CA-125 tümör markeri ile kombinasyon şeklinde kullanılabilme olasılığı son derece yüksektir. Bu nedenle, çalışmamızda over kanserli hastalarda araştıran miR-16-5p, miR-17-5p ve miR-638 moleküllerinin öncelikli olarak hastalığı ayırt edebilecek potansiyel biyobelirteçler olup olmadıklarının Gerçek Zamanlı-PZR yöntemi ile incelenmesi hedeflenmektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Materyal

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 09.02.2018 tarih ve 03 sayılı etik kurul kararı ile İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubu 2010-2018 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Genetik Polikliniğine başvurmuş olan 150 over kanserli hasta ile hasta popülasyonu ile yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş, kendisinde ve ailesinde kanser hastalığı bulunmayan 100 sağlıklı kişiden oluşan iki farklı deney grubundan oluşturulmuştur. Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler, periferik kan örnekleri alınmadan önce çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve gönüllü onam formu imzalatıldıktan sonra çalışmaya alınmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

- Biocoll Separating Solution (Ficoll) [BIOCHROM]
- Etilen-Diamin-Tetraasetikasit (EDTA),
- Etidyum Bromid (EtBr), Bromfenol Mavisi (BFB) [SIGMA]
- Etanol [RIEDEL DE HAEN]
- Quick RNA MiniPrep Kit [ZYMO RESEARCH]
- ID3EAL cDNA Synthesis System [MIRXES]
- ID3EAL miRNA qPCR Starter Kit [MIRXES]

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- -30 Derin Dondurucu [SANYO]
- -80 Derin Dondurucu [SANYO]
- Santrifüjler [HERAUS, HETTICH, JOUAN]
- Termal Döngü Cihazı [TECHNE]
- Mikropipetler [GILSON]
- Yatay Gel Elektroforez Tankları ve Jel Dökme Sistemleri [BRL]
- Vorteks [FINEPZR]

- Distile Su Cihazı [MILLIPORE]
- Spektrofotometre NanoDrop 2000 [THERMO SCIENTIFIC]
- MIC Gerçek-Zamanlı PZR Cihazı
- Mikrodalga Fırın [ARÇELİK]
- Gel Dökümantasyon Sistemi [BRL]
- Etüvler (37°C ve 56°C) [NÜVE]
- Manyetik Karıştırıcı [NÜVE]

3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

10X PBS Tampon Çözeltisi

1 litre için;

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 11,5 g Na₂HPO₄
- 2 g KH₂PO₄

10X BFB Yükleme Tamponu

2 mL için ;

- %1 SDS
- 5 mg Bromfenol Mavisi
- 2 mL Gliserol

10X TEB (Tris-EDTA-Borik Asit) Tampon Çözeltisi

- 0.88 M Borik Asit
- 5 M Tris
- 0.02 M EDTA (pH :8.00)

Etidyum Bromür: 10 mg/mL

3.2. Yöntem

Hasta ve sağlıklı kontrol grubundan alınan 10 mL periferik kan örneklerinden öncelikle lenfositler ayrıştırıldı. Elde edilen lenfosit hücrelerinden total RNA izole edildi. Bu RNA örneklerinden Ters Transkriptaz yöntemiyle hedef miRNA'lara özgü cDNA sentezlendi. Araştıracığımız miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 miRNA'ları, 5S rRNA referans geni ile birlikte hasta ve sağlıklı kontrol örneklerinde eş zamanlı olarak Gerçek-Zamanlı PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Hasta ve sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grupları arasındaki miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 gen ifade düzeyleri, 5S rRNA geni ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

- EDTA'lı tüpe alınmış 10 mL periferik kan örneği 1/1 oranında % 0.9'luk NaCl ile dilüe edildi.
- Dilüe edilmiş kan örneği 2 mL Ficoll üzerine pipet yardımıyla yüklendi. 1910 RPM'de 30 dk. santrifüj edildi.
- Üst fazında plazma, orta fazında lenfositler alt fazında eritrositler, bulunan tüpten lenfositler pastör pipet yardımıyla temiz bir tüpe aktarıldı.
- 1910 RPM'de 10 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatant dökülerek pellet üzerine 2 mL PBS eklendi ve pipetleme yapılarak pellet çözöldü. Elde edilen pellet 2 krio tüpe 1'er mL olacak şekilde dağıtıldı.
- Kriyo tüpler 1910 RPM'de 4 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatant dököldü. Elde edilen hücreler -80°C'de bir gün süreyle inkübe edildi.
- Son olarak kriyo tüplerdeki hücreler uzun süreli saklanmak üzere azot tanklarına kaldırıldı.

3.2.2. RNA İzolasyonu

Elde edilen lenfosit örneklerinden RNA izole etmek için ticari bir kit olan Quick-RNA MiniPrep Kit [ZYMO RESEARCH] protokolü kullanıldı.

Kit protokolüne göre RNA izolasyon işlem basamakları şu şekildedir:

- Azot tankından çıkarılan lenfosit hücrelerinin üzerine 300 µL RNA Lysis Buffer eklendi ve çözölene kadar pipetaj yapıldı.

- 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Süpernatant sarı kolonlu toplama tüplerine (Spin Away Filter) aktarıldı.
- Üzerine 300 µL %95-100'lük etanol eklendi ve karışım 10,000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Altta toplanan faz yeşil kolonlu toplama tüplerine (Zymo-Spin IIICG Column) aktarıldı.
- Üzerine 5 µL DNase I ve 75 µL DNA Digestion Buffer eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- Kolonun üzerine 400 µL RNA Prep Buffer eklendi ve 10,000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Alttaki faz uzaklaştırıldı.
- Kolonun üzerine 700 µL yıkama tamponu (RNA Wash Buffer) eklendi ve 10,000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Alttaki faz uzaklaştırıldı.
- Kolonun üzerine yıkama işlemini tekrar etmek için 400 µL RNA Wash Buffer eklendi ve 10,000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Alttaki faz atıldı.
- Kolon Rnaz içermeyen 1,5 mL'lik yeni bir santrifüj tüpüne alındı ve üzerine 100 µL DNaz/RNaz içermeyen steril distile su eklendi. 10,000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Elde edilen RNA'ların kontrolleri yapıldıktan sonra birkaç tüpe bölünerek -80°C'de saklandı.

3.2.3. Agoroz Jelde RNA'ların Kontrolü

RNA izolasyonunun ardından total RNA'nın degrade olup olmadığının kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Elektroforez işlemi sonucunda yürütülen RNA'nın 28S ve 18S rRNA'ları temsil eden iki majör bandın varlığına ve DNA bandının yokluğuna bakılarak sağlamlığı belirlendi.

Bir sonraki basamak olan cDNA sentezinin başarısı için yüksek kalitede RNA kullanılmalıdır. Yüksek kalitedeki RNA'nın degrade olmamış ve genomik DNA kontaminasyonu içermemiş olması gerekmektedir.

3.2.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

RNA örneklerinin agaroz jel elektoroforezi ile kalite kontrollerinin yapılması için % 1.5'luk agaroz jel aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

- 1,5 g agaroz 100 mL 0.5X TEB tamponu içinde koyuldu.
- Hazırlanan karışım için mikrodalga fırının sıcaklık ve zaman koşulu ayarlandı ve karışım uygun aralıklarla karıştırılarak kaynatıldı.
- Homojen hale gelen karışıma, karışımın sıcaklığı 60°C'ye düşünce konsantrasyonu 10 mg/mL olan EtBr (Etidyum bromür) çözeltisinden 5 µL ilave edilerek jel hazırlandı.
- Jel, yirmi dişli tarak yerleştirilmiş jel tabağına döküldü.
- Jele araştırılan örneklerin yüklenebilmesi için polimerize olması beklendi.

Jel kullanılacağı ana kadar ya TBE tamponu içinde ya da strech filme sarılarak +4°C de saklandı.

3.2.3.2. Agaroz Jelde Örneklerin Yüklmesi ve Yürütülmesi

Elde edilen RNA'lardan 5 µL örnek, 1 µL 10X BFB (brom fenol mavisi) ile karıştırıldı ve jel üzerinde bulunan kuyucuklara yüklendi. 160 volt akımda 3 cm kadar yürütüldü ve UV altında görüntülendi.

3.2.4. RNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Elde edilen RNA'ların ölçümleri NanoDrop 2000 Spektrofotometre [THERMO SCIENTIFIC] cihazına seyreltilmemiş stok örneklerden 1 µL yüklenerek yapıldı. İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu A260/A280 nm dalga boylarındaki absorbans ile belirlendi. Absorbansı 1.6-2.0 OD aralığında olan RNA'lar saf/uygun RNA örneği olarak kabul edildi.

RNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 OD'lik absorbans 40 µg RNA molekülüne eşittir. NanoDrop ile RNA konsantrasyonu ölçülürken 1 µL hacim yeterli olduğundan RNA konsantrasyonu direkt olarak ölçülebilmekte ve RNA'nın sulandırılmasına gerek kalmamaktadır. Buna göre NanoDrop ile ölçülen RNA'nın konsantrasyonu aşağıda verildiği şekilde hesaplanır:

$$\text{RNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{A260} \times \text{Sulandırma Katsayısı (1)} \times 40 \mu\text{g}$$

Ölçülen RNA'ların bir sonraki aşamada yapılacak deneylerde kullanılırken konsantrasyonlarının eşit olması gerektiği için hasta ve kontrol grubuna ait olan RNA örneklerinin konsantrasyonları 200 ng/ μ L olacak şekilde sulandırıldı.

3.2.5. cDNA Sentezi

Gerçek-Zamanlı PZR reaksiyonu için ticari bir kit olan ID3EAL cDNA Synthesis System [MIRXES] yardımı ile miRNA spesifik Ters Transkriptaz enzimi kullanılarak RNA'dan cDNA kalıbı sentezlendi. cDNA reaksiyon bileşenleri Tablo 3-1'de belirtilen miktarlarda karıştırıldı. Tüm reaksiyon işlemi buz içerisinde gerçekleştirildi. 20 μ L'lik reaksiyon karışımı, Ters transkriptaz reaksiyonunun gerçekleşmesi için PZR cihazında inkübe edildi. Ters transkriptaz reaksiyonu 42°C'de 30 dk inkübasyon işlemini takiben 95°C'de 5 dk enzim aktivitesinin ortadan kaldırılmasını içeren iki aşamalı sıcaklık reaksiyonu ile gerçekleştirildi (Tablo 3-2).

Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Tablo 3-1: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri

Ürün Adı	Hacmi
RNA	X μ L
ID3EAL RT Buffer 4X	5 μ L
ID3EAL RT Primer I Plex miRNA-17-5p	1 μ L
ID3EAL RT Primer I Plex miRNA-16-5p	1 μ L
ID3EAL RT Primer I Plex miRNA-638	1 μ L
ID3EAL RT Primer I Plex 5s rRNA	1 μ L
ID3EAL Reverse Transcriptase	1 μ L
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	20 μ L'ye tamamlanır

Tablo 3-2: Ters Transkriptaz işlemi ve reaksiyon koşulları

Döngü	Sıcaklık (C°)	Süre
1	42°C	30 dk
1	95°C	5 dk

3.2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çalışmamızda araştırdığımız mikroRNA'ların anlatım düzeyleri MIC Gerçek-Zamanlı PZR Cihazı (MIC qPCR Cycler) kullanılarak analiz edildi. Reaksiyon sırasında çoğalan gen ürünlerinin saptanabilmesi için SYBR Green floresan boyası kullanıldı.

Gerçek zamanlı PZR işlemi sırasında hedef gen ile referans gen dışında başka bir ürünün çoğalmadığından ve primerlerin düzgün bağlandığından emin olabilmek için PZR döngüsü sonuna “Erime Eğrisi Analizi (Melting Curve Analysis)” eklendi.

Hastaların lenfositlerinden elde edilen cDNA örnekleri hedef ve referans genlerine ait primerler kullanılarak yapılan gerçek-zamanlı PZR işlemine tabi tutuldu ve hasta grupları ile sağlıklı kontroller arasında var olan gen ifade değişiklikleri değerlendirildi. Gerçek-zamanlı PZR reaksiyon karışımı ve koşulları aşağıda Tablo 3-3 ve 3-4'te gösterildiği şekilde yapıldı.

Tablo 3-3: Gerçek-Zamanlı PZR reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	Hacmi
ID3EAL qPCR Master Mix (SYBR Green Master Mix)	10 µL
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	3 µL
ID3EAL qPCR Assays Primerler	2 µL
cDNA (1:10 oranında seyreltilmiş)	5 µL
Toplam hacim	20 µL

Tablo 3-4: Gerçek-Zamanlı PZR koşulları

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1x	95°C	10 dk
	40°C	5dk
40x	95°C	10 sn
	60°C	30 sn

3.2.7. İstatistiksel Analizler

Hasta ve sağlıklı gruba ait gen ifade düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS (v21) programı kullanılarak yapıldı. Hasta ve kontrol grubu arasındaki gen ifade düzeyleri ve gen ifade düzeyleri ile klinik veriler arasındaki ilişki Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Ayrıca aday biyobelirteç olarak belirlediğimiz miRNA'ların tanısal gücünü göstermek amacı ile ROC (Reciever Operator Characteristics Curve) analizi gerçekleştirildi. Klinik verilerin kendi aralarında ikili karşılaştırmaları χ^2 ile yapıldı. Hastaların sağkalım analizi Kaplan-Meier testi ile incelendi. $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Bu çalışmada, 2010-2018 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Kanser Genetiği Polikliniğine başvuran 150 over kanserli hasta ile kontrol grubu olarak hasta grubu ile yaş, cinsiyet ve ırk açısından eşleştirilerek seçilen 100 sağlıklı bireyin periferik kan örneklerinden elde edilen lenfosit hücreleri kullanılmıştır. Sonuçlar 142 over kanserli hasta ile 97 sağlıklı kontrol üzerinden değerlendirilebilmiştir.

Hastaların yaş ortalaması 49,4 ($\pm 10,8$); sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması ise 47,9 ($\pm 11,3$) şeklindedir. Gerek sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubunda gerekse over kanserli hasta grubunda yaş ortalamaları arasında istatistiksel bir fark bulunmamakta, gruplar yaş açısından benzer dağılmaktadır.

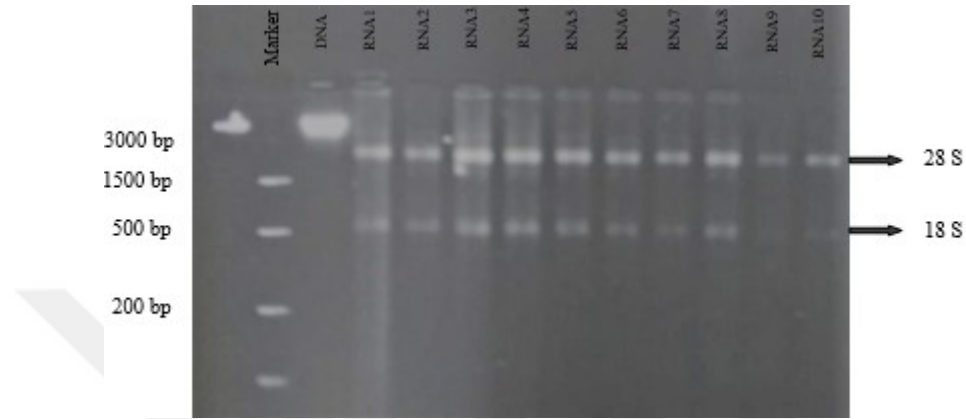
Hasta ve kontrol grubuna ait demografik ve klinik özellikler Tablo 4-1’de verilmiştir.

Tablo 4-1: Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri

	Özellikler	Hasta Sayısı (N=142,%100)
Yaş	40= $\leq$	28 (%19,7)
	40>	114 (%80,3)
Tanı	Over kanseri	116 (%81,69)
	Over+meme kanseri	17 (%11,97)
	Over+endometrium kanseri	3 (%2,11)
	Over+diğer kanseri	6 (%4,23)
Histolojik tip	Seröz karsinom	126 (%88,73)
	Müsinöz karsinom	6 (%4,23)
	Berrak hücreli karsinom	8 (%5,63)
	Squamöz hücreli karsinom	1 (%0,7)
	Endometrioid	1 (%0,7)
Lokal ileri evre hastalık durumu	Var	81(57,04)
	Yok	61(%42,96)
Evre	I ve II	37 (%26,06)
	III ve IV	105 (%73,94)
Ailede over kanseri	Var	32 (%22,54)
	Yok	110 (%77,46)
Oral kontraseptif kullanımı	Var	51 (%35,92)
	Yok	91 (%64,08)
Sigara kullanımı	Var	53 (%37,3)
	Yok	89 (%62,7)
Son durum	Eksitus	51 (%35,92)
	Hastalık var	84 (%59,15)
	Bilinmiyor	7 (%4,93)

4.1. RNA Kalite Kontrol Sonuçları

Elde edilen RNA'ların kalitesinin değerlendirilmesi amacı ile agaroz jelde yürütülmesi işlemine ait görüntü ve NanoDrop 2000 Spektrofotometre [THERMO SCIENTIFIC] cihazı ile yapılan ölçüm sonuçlarına ait örnekler Şekil 4-1 ve Tablo 4-2'de verilmiştir.



Şekil 4-1: İzole edilen RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi Sonrası Görüntüsü

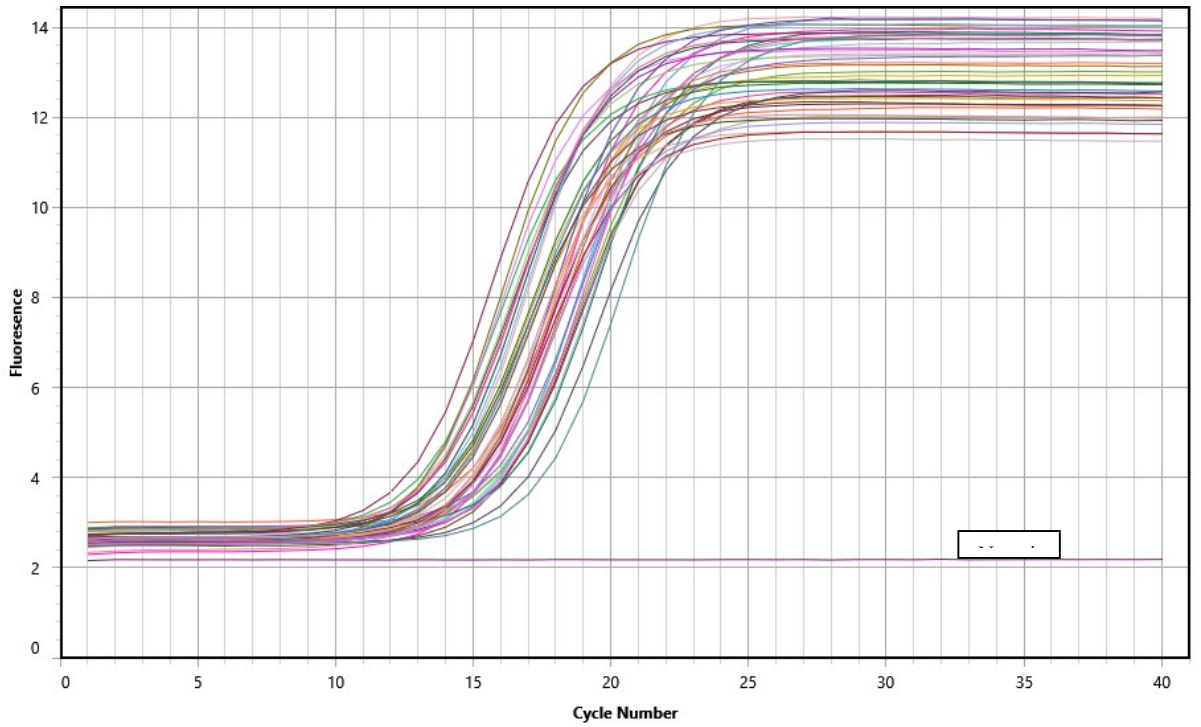
Tablo 4-2: Örnekler Ait Nanodrop Ölçüm Değerleri

Örnekler	Nükleik Asit Konsantrasyonu	Birim	A260/A280	A260/A230	Numune
1	96,0	ng/ μ L	2,15	2,05	RNA
2	69,4	ng/ μ L	2,09	1,87	RNA
3	85,5	ng/ μ L	2,06	2	RNA
4	139,1	ng/ μ L	2,12	2,16	RNA
5	79,0	ng/ μ L	2,09	2,15	RNA
6	103,8	ng/ μ L	2,10	2,24	RNA
7	183,1	ng/ μ L	2,03	1,99	RNA
8	110,6	ng/ μ L	2,04	1,97	RNA

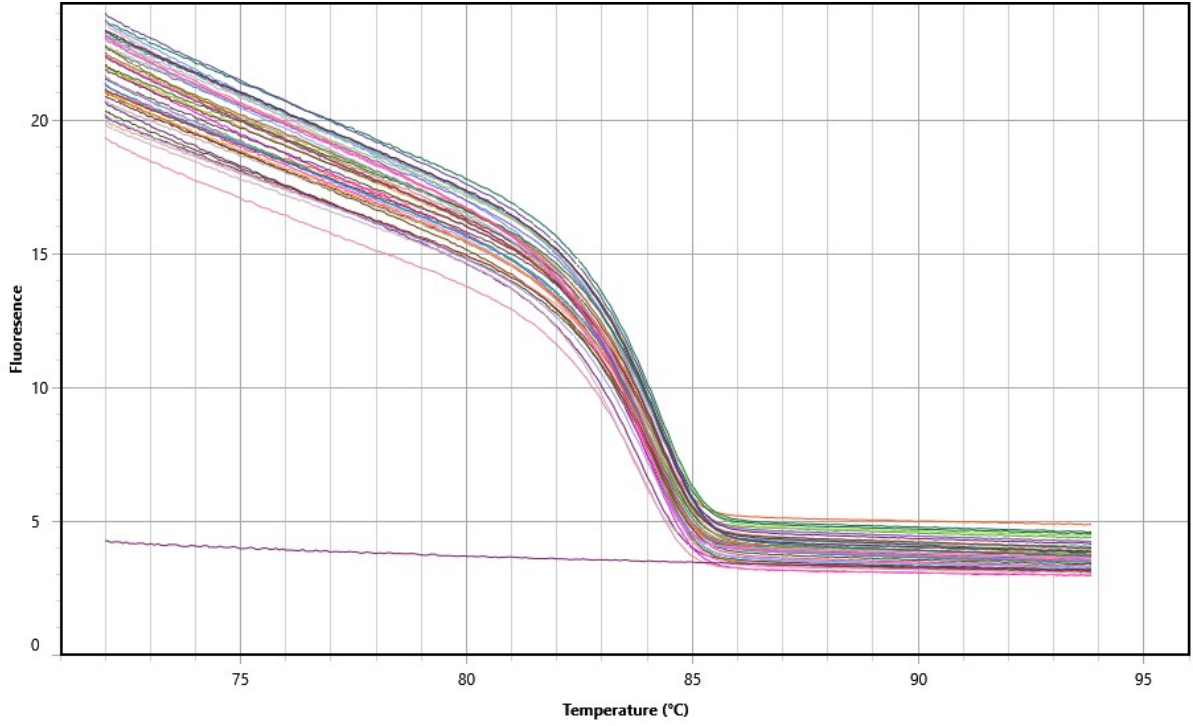
4.2. Gerçek-Zamanlı PZR ile Çoğaltılan Örneklerin Çoğalma Eğrileri ve Erime Eğri Analizleri

Gerçek zamanlı PZR'de çoğalan gen ürünlerinin saptanabilmesi için SYBR Green floresan boyası kullanıldı. Bu boyanın yapısı gereği çoğalan dizinin doğruluğundan emin olmak, hedef gen ile referans gen dışında başka bir ürünün çoğalıp çoğalmadığını görmek ve primer dimerlerini saptayabilmek için PZR döngüsü sonuna “erime eğrisi analizi” (melting curve analysis) eklendi. Şekil 4-4, 4-7, 4-10'da gerçek zamanlı PCR işlemi ile her bir miRNA ekspresyonunun belirlemek için çoğaltılan örneklerin erime eğrisi analizleri verilmekte ve buna göre ilgili miRNA gen bölgelerinin doğru bir şekilde çoğaltıldığı gösterilmekte ve anlaşılmaktadır.

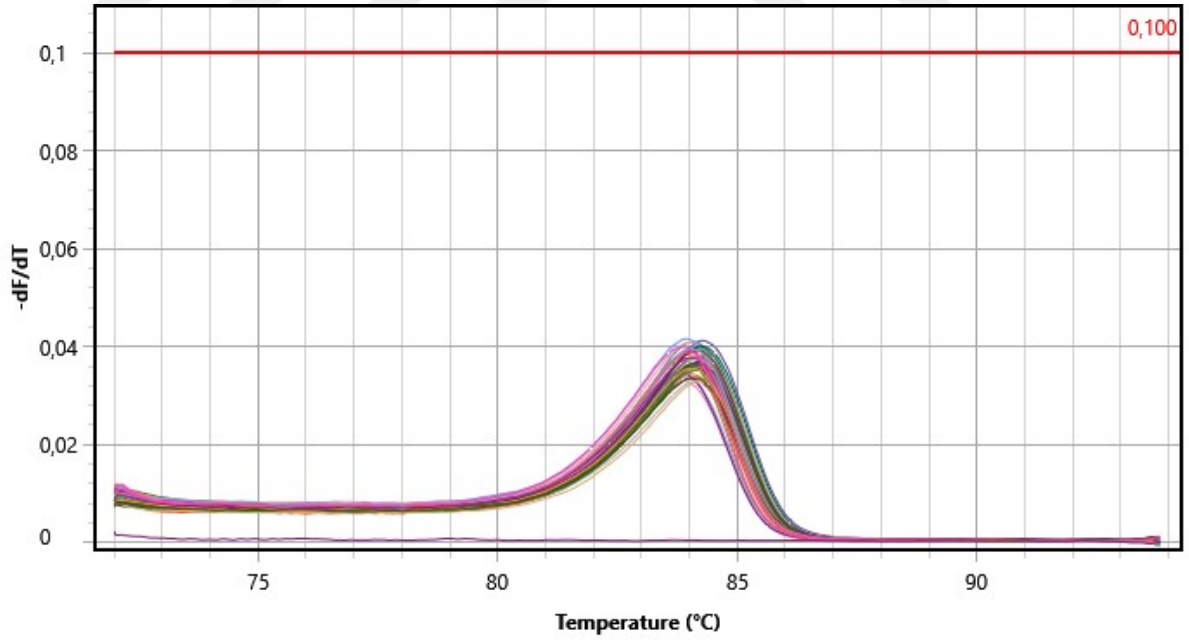
Çalışmada hasta ve kontrol grubuna ait periferik kan örneklerinden izole edilen RNA'lar, incelediğimiz miRNA'lara özgü cDNA'ya dönüştürüldükten sonra miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638'in ifade düzeylerinin araştırılması amacıyla 5S rRNA referans geni eşliğinde, gerçek-zamanlı PZR işlemine tabi tutuldu. Her bir hasta ve kontrol grubuna ait miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 ve 5S rRNA gen ifadelerini gösteren gerçek-zamanlı PZR grafikleri sırasıyla Şekil 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 4-11,4-12'de gösterilmektedir.



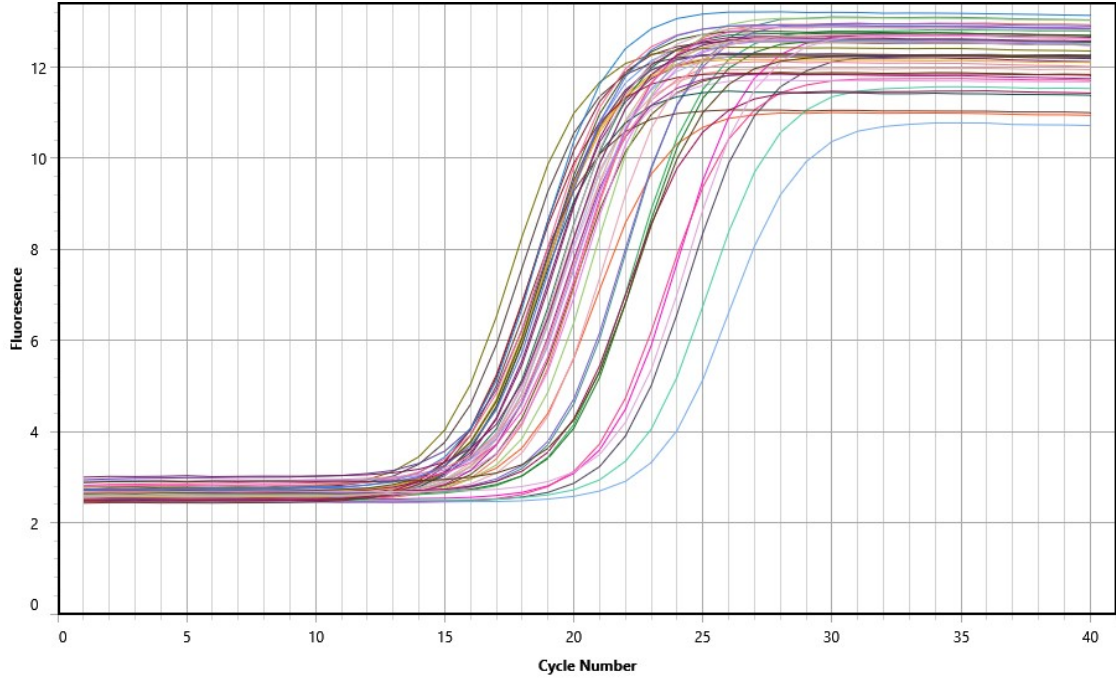
Şekil 4-2: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen 5s rRNA'ın gerçek-zamanlı PZR eğrileri



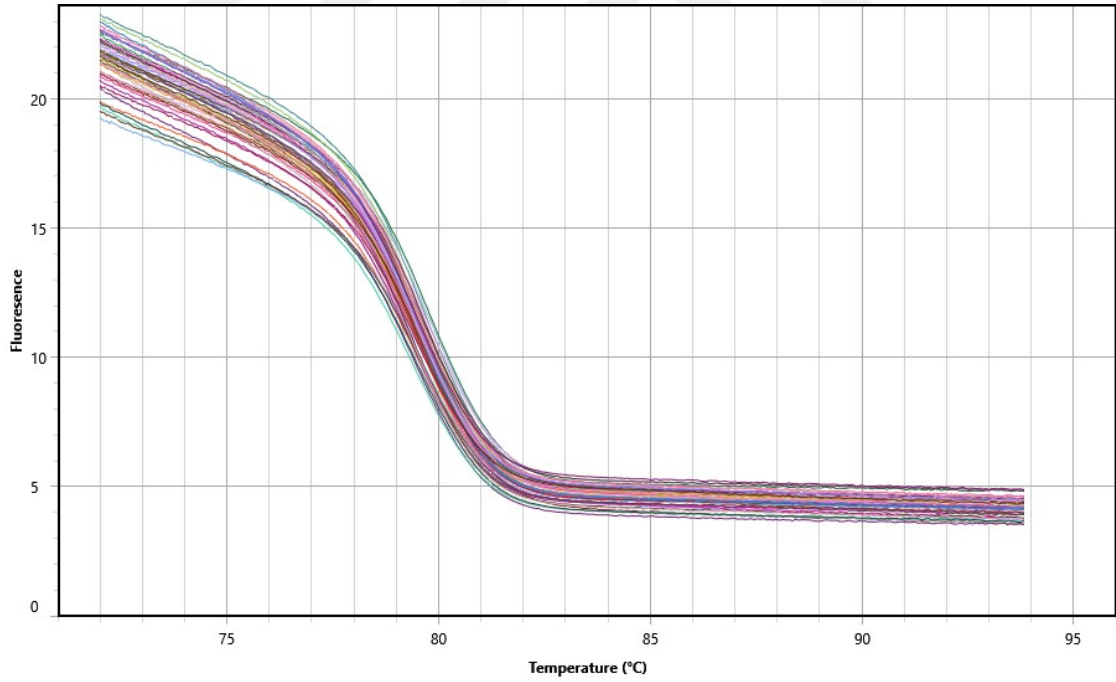
Şekil 4-3: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen referans gen 5S rRNA'nın erime eğrileri



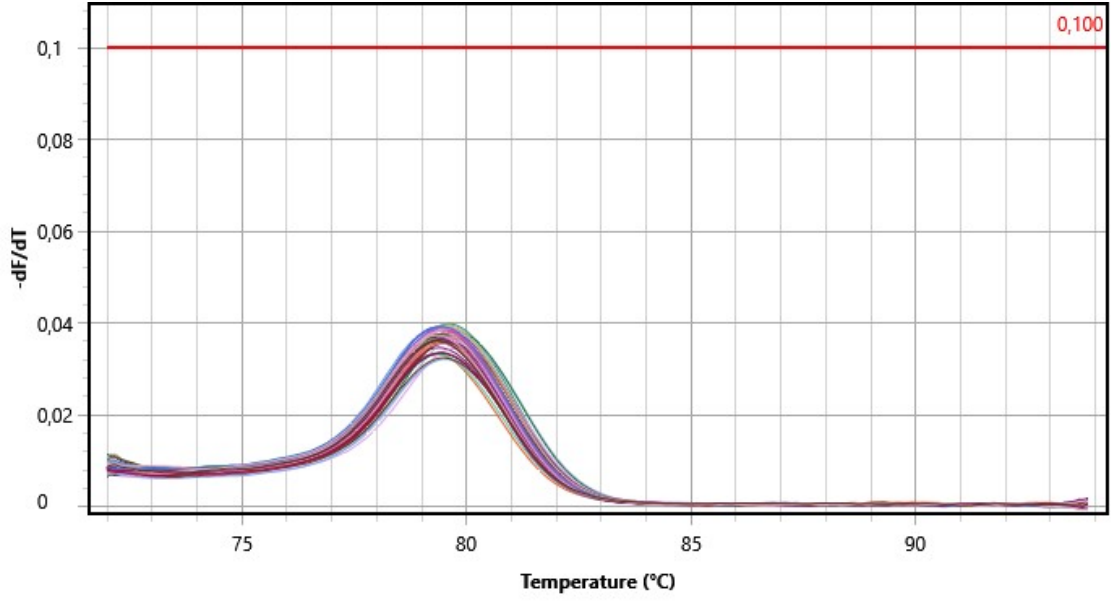
Şekil 4-4: Over Kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen referans gen 5S rRNA'nın erime eğrisi analizi



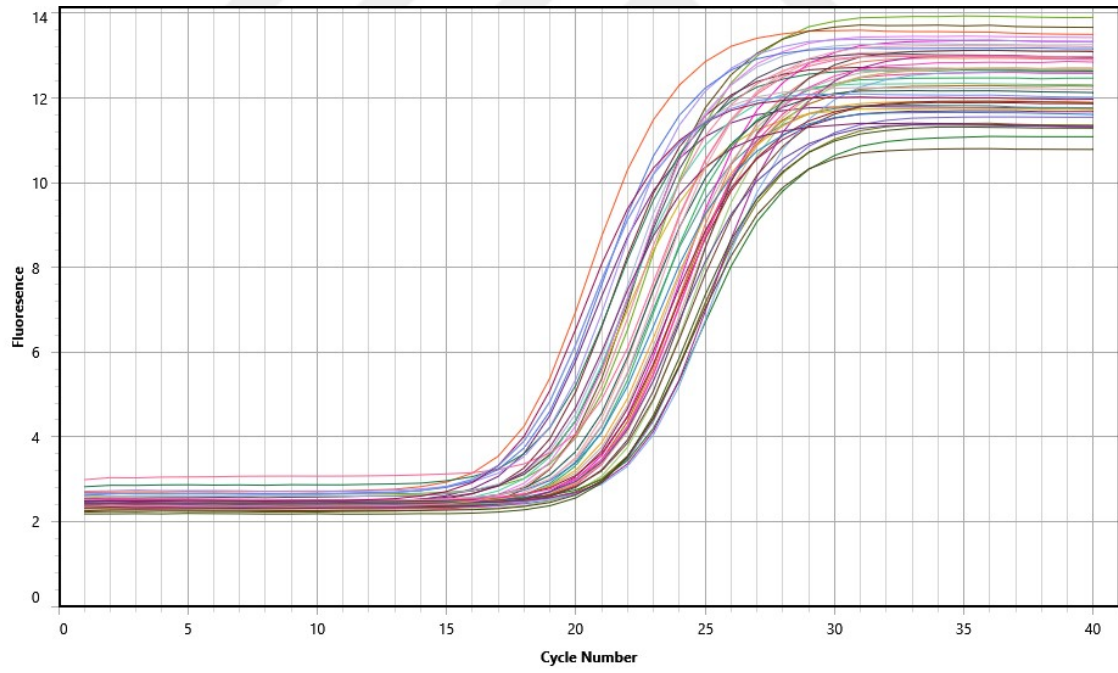
Şekil 4-5: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-16-5p'nin gerçek-zamanlı PZR eğrileri



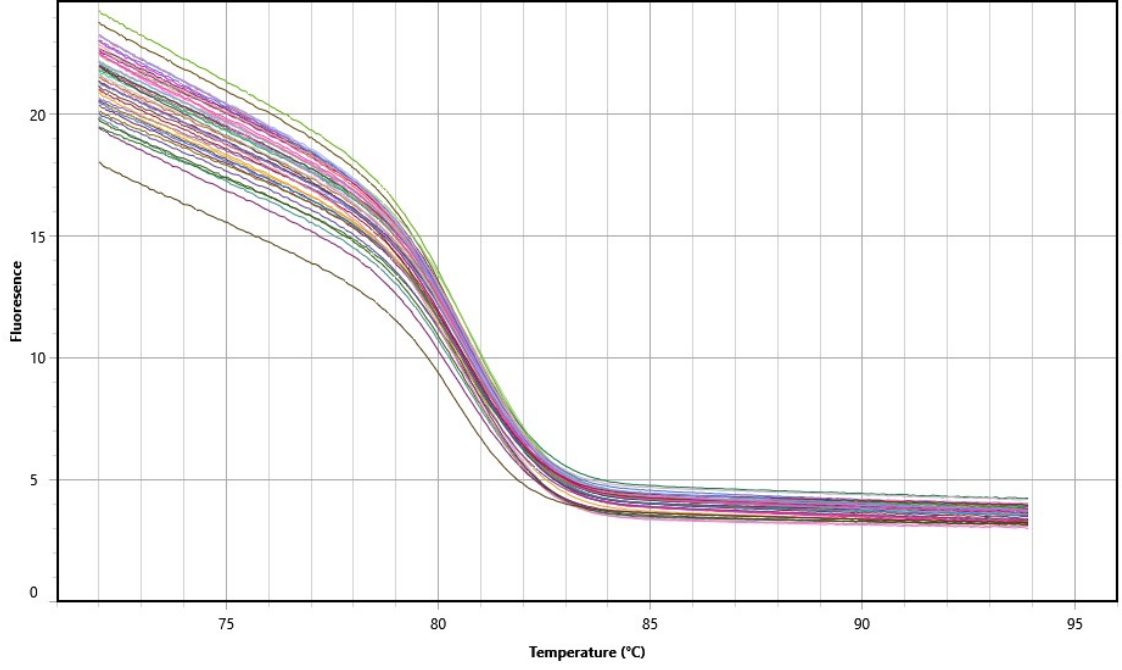
Şekil 4-6: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-16-5p'nin erime eğrileri



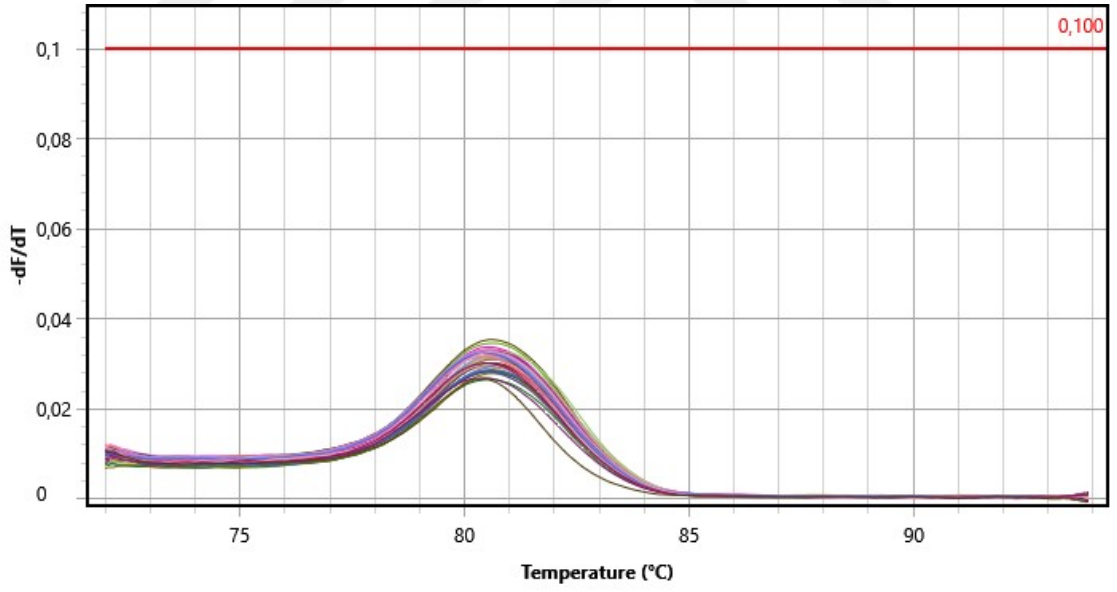
Şekil 4-7: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen referans miR-16-5p'nin erime eğrisi analizi



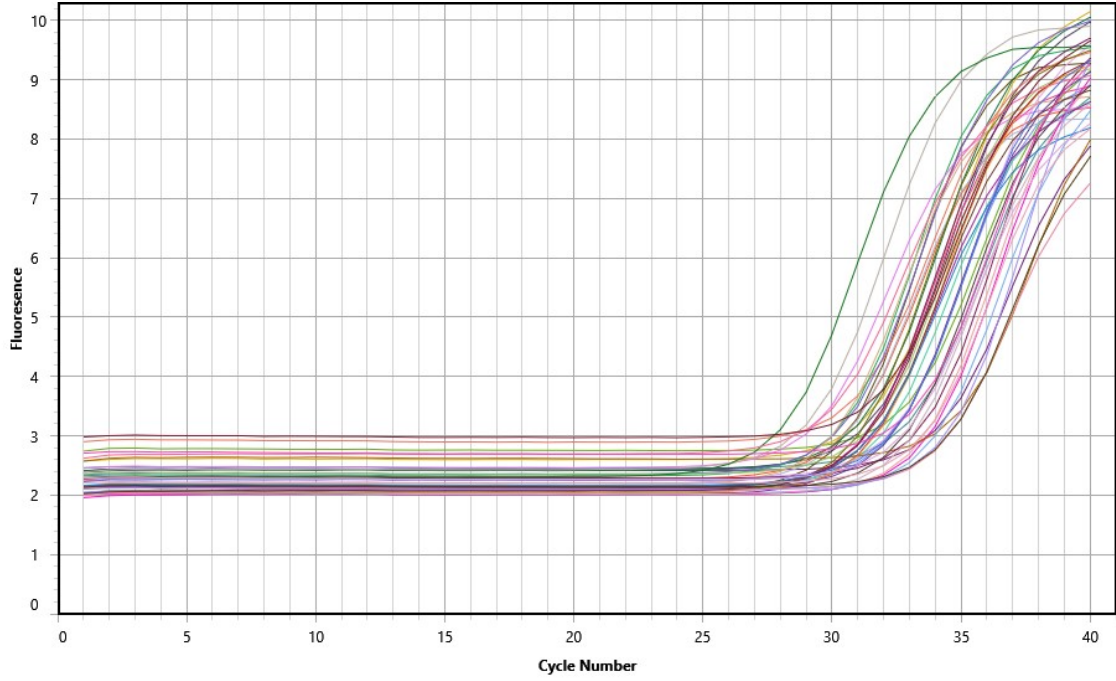
Şekil 4-8: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-17-5p'nin gerçek-zamanlı PZR eğrileri



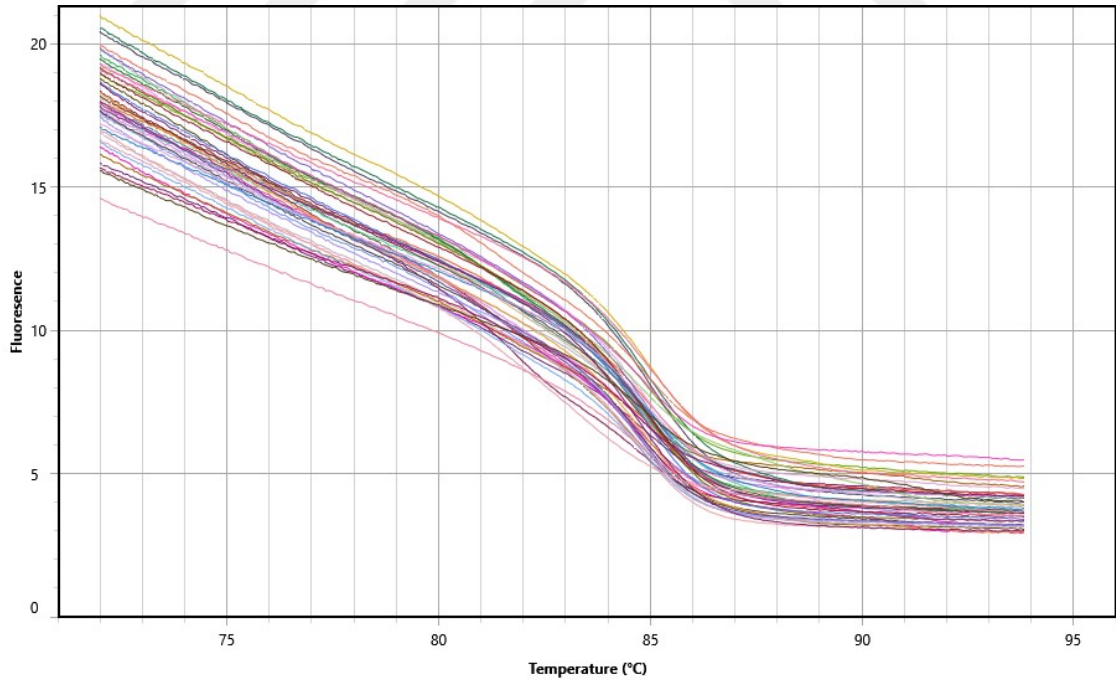
Şekil 4-9: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-17-5p'nin erime eğrileri



Şekil 4-10: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen referans miR-17-5p'nin erime eğrisi analizi



Şekil 4-11: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-638'nin gerçek-zamanlı PZR eğrileri



Şekil 4-12: Over kanserli hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-638'in erime eğrileri

4.3. Gen İfadelerinin Değerlendirilmesi

Gen ifadelerinin hesaplanması ve değerlendirilmesinde $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodundan faydalanıldı. Bu metoda göre sonuçlar PZR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış olan C_T değerlerine göre belirlendi. Bu yöntem doğrultusunda hedef gen ile referans gen arasındaki farkı belirleyen ΔC_T hem hasta hem de kontrol grubu için ayrı ayrı hesaplandı. Ardından her bir hasta örneğine ait ΔC_T değerinden sağlıklı gruba ait ortalama ΔC_T değerinin çıkartılmasıyla her bir hasta örneğine ait $\Delta\Delta C_T$ değeri bulundu. Bu değer $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formülüne göre 5S rRNA gen ifadesi referans alınarak hasta grubuna ait miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638'in ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre ne kadar oranda arttığı ya da azaldığı belirlendi.

$$\Delta C_T = C_T (\text{hedef gen}) - C_T (\text{referans gen})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{hasta}) - \Delta C_T (\text{sağlıklı kontrol})_{\text{ort}}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-[(C_T \text{ hedef} - C_T \text{ ref})_{\text{hasta}} - (C_T \text{ hedef} - C_T \text{ ref})_{\text{kontrol}}]}$$

Bu hesaplamalara ilişkin değerler Tablo 4-3'te verilmiştir.

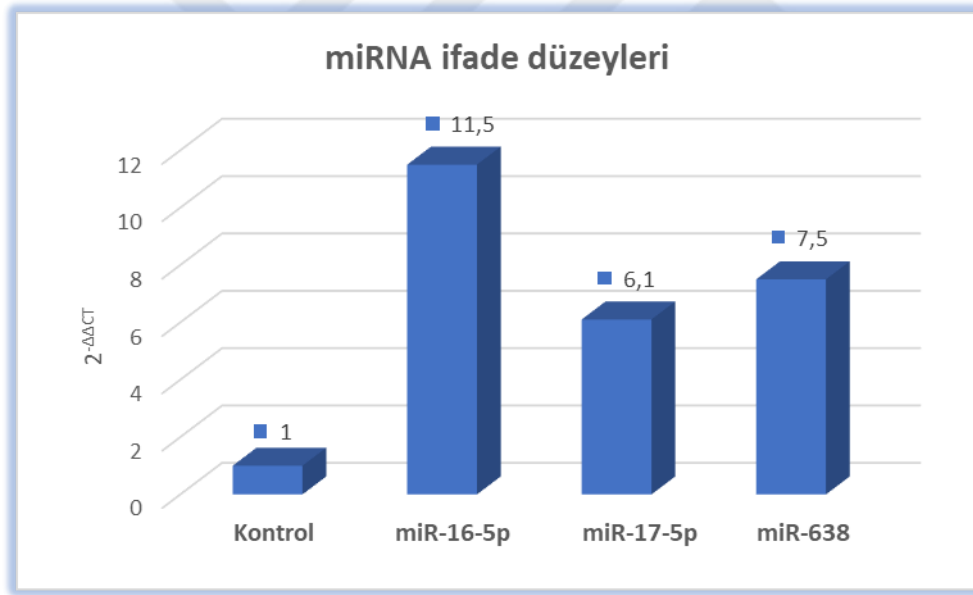
Tablo 4-3: miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638'in ifade düzeyleri

Hasta No	miR-16-5p $2^{-\Delta\Delta C_T}$	miR-17-5p $2^{-\Delta\Delta C_T}$	miR-638 $2^{-\Delta\Delta C_T}$	Hasta No	miR-16-5p $2^{-\Delta\Delta C_T}$	miR-17-5p $2^{-\Delta\Delta C_T}$	miR-638 $2^{-\Delta\Delta C_T}$
1	6,1773	25,6342	0,5946	23	1,3566	1,5692	1,1567
2	3,0525	1,7291	0,3186	24	1,6702	1,5052	1,0497
3	3,4343	2,3457	0,7474	25	0,8179	0,669	1,0867
4	6,9163	3,4822	1,021	26	3,7321	2,6945	0,5249
5	1,4845	1,3013	0,6974	27	10,3388	5,9794	9,0631
6	0,4863	0,356	1,8404	28	8,7543	6,1903	5,3517
7	1,3851	1,2483	0,1805	29	6,9163	1,815	2,5548
8	29,8571	11,6318	223,4139	30	3,8906	1,0943	2,2969
9	3,5554	2,2658	1,0425	31	2,969	0,5864	7,8645
10	3,1821	2,1735	2,1585	32	1,4439	0,2269	4,8886
11	0,1661	0,1241	0,1303	33	0,3816	0,1731	0,3164
12	8,2249	3,0314	8,3469	34	1,4044	0,5548	0,8496
13	2,0994	1,4845	0,8766	35	1,6133	0,6285	5,1276
14	0,5249	0,356	1,1096	36	2,5491	2,4623	0,4414
15	0,7738	0,7474	4,0558	37	0,5664	0,2176	0,8846
16	0,3923	0,2238	7,4127	38	0,5359	0,2146	0,7323
17	5,9381	3,2716	0,8293	39	3,7581	2,1585	2,0042
18	1,0497	0,9593	0,2973	40	1,181	1,9053	4,4015
19	4,724	5,0982	17,1484	41	0,5176	0,1672	1,6184
20	8,515	7,9447	4,6913	42	2,8089	0,9862	0,077
21	2,4967	1,366	0,4796	43	0,732	0,183	9,532
22	6,498	4,5948	0,5704	44	10,7034	1,3755	71,5901

45	13,9288	3,249	6,6613	90	19,6983	2,6027	0,4118
46	0,5864	0,2832	0,886	91	5,063	6,8211	3,3404
47	13,1775	5,3889	1,2582	92	1,7654	1,7411	1,7171
48	4,4383	1,1251	0,1209	93	13,8326	26,3549	2,2038
49	37,5307	8,2249	1,6086	94	22,0087	10,4831	1,5583
50	0,6783	0,1638	0,5826	95	27,6652	1,9862	1,5263
51	8,4561	3,6553	0,7953	96	18,8959	4,6589	6,4086
52	0,5704	0,1377	0,0435	97	1,5157	18,7654	2,9079
53	0,6242	0,2316	0,6064	98	65,3448	60,9688	3,4343
54	2,6759	0,9075	1,4924	99	47,1766	27,8576	1,0281
55	1,8025	0,5625	0,0321	100	8,1117	9,0631	3,1383
56	2,4623	2,8284	0,4061	101	10,1965	8,5742	2,8089
57	17,8766	13,3614	1,6935	102	19,4271	16,2234	6,4531
58	3,3404	1,181	0,4863	103	0,1869	1,8532	2,5315
59	7,8899	2,8679	282,9573	104	5,4642	4	1,2834
60	0,3284	1,9453	0,0004	105	0	4,5948	0,3015
61	2,9485	1,6133	21,6736	106	4	14,723	2,1886
62	35,0174	20,5348	1,5263	107	0,5864	1,5157	0,8123
63	0,8351	0,4931	0,2449	108	7,6211	7,3107	1,9725
64	3,4343	1,5052	1,9862	109	3,5308	4,1411	2,362
65	6,9644	4,2575	0,0872	110	5,0982	9,5137	5,579
66	26,3549	0,5249	0,2253	111	0,7371	0,7474	2,2191
67	0,0445	1,1567	4,2871	112	12,9063	11,3137	5,2054
68	9,9866	4,0558	1,1567	113	3,3404	3,1821	3,6301
69	3,4822	7,5162	1,2834	114	10,2674	11,0809	6,774
70	2,1418	9,3179	1,3287	115	6,498	9,1261	2,514
71	9,3179	6,9163	11,0043	116	8,9383	4,5631	1,2834
72	184,8229	110,6608	21,1121	117	0,9075	0,8827	0,1719
73	87,4266	1,5263	0,8123	118	1,9453	1,2058	3,8106
74	0,6598	15,8895	0,8066	119	4,9933	4,0558	11,7942
75	3,9724	2,3134	0,7781	120	6,774	4,7899	9,9177
76	90,5097	30,91	1,2226	121	0,5704	0,5285	5,1337
77	0,2079	1,1329	3,2266	122	1,6586	1,3195	11,6318
78	143,0128	2,0139	0,933	123	5,6178	3,5554	10,1261
79	5,0982	6,3203	6,0629	124	0,683	0,6199	4,6268
80	4,3469	1,0425	0,9794	125	10,4831	4,1125	1,2924
81	0,5987	15,6707	12,1257	126	4,1989	6,9644	0,1649
82	15,1369	12,996	11,7942	127	6,2333	4,6268	2,2501
83	8,2249	8,1681	0,7792	128	1,0353	0,3143	17,2677
84	29,0406	30,0647	8,6939	129	2,2038	1,5263	2,0562
85	25,9921	7,6211	1,2834	130	3,8906	2,8679	0,086
86	0,3012	1,7654	0,2316	131	1,5801	1,0425	0,4033
87	5,7757	0,6242	1,007	132	1,5369	1,4948	2,0849
88	1,5692	3,0314	1,2834	133	5,7757	3,4343	1,007
89	2,6208	2,114	0,2553	134	0,7371	0,5396	0,1183

135	1,3851	0,6199	0,7022	141	4,8568	2,8284	20,393
136	3,7064	4,084	9,4479	142	4,084	22,6274	0,2132
137	1,5157	0,8351	6,774				
138	1,0718	0,5548	6,9644				
139	4,9246	1,8404	10,1261				
140	3,0951	10,0561	2,4623				

Microsoft excel programı kullanılarak yapılan hesaplamalara göre over kanserli hastaların, sağlıklı gruba göre ifade düzeylerindeki ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) artış veya azalışı belirten grafikler Şekil 4-13’de gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre hastalar, gen ifade düzeyi bir olan sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında miR-16-5p’nin $2^{-\Delta\Delta C_t} = 11,5$; miR-17-5p’nin $2^{-\Delta\Delta C_t} = 6,1$; miR-638’in $2^{-\Delta\Delta C_t} = 7,5$ kat arttığı saptanmıştır. Hastaların Fold&Change ($|FC| \geq 2$) değeri göz önüne alındığında, gen ifade düzeylerinin 2 kattan fazla arttığı görülmüştür.



Şekil 4-13: Sağlıklı kontrol grubuna göre hastalarda miRNA gen ifade düzeylerini gösteren $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ortalamalarının karşılaştırılması

SPSS v21.0 programı ile yapılan istatistiksel analizlere göre; gruplar arasındaki dağılımın normallik varsayımı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilk testleri ile değerlendirildi. Normallik varsayımı sonuçlarına göre $p < 0,05$ olduğu için (Tablo 4-4), grupların normal dağılım göstermediğine ve verilerin incelenmesinde parametrik olmayan Mann-Whitney U testinin kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi.

Tablo 4-4: Normallik Dağılımı Testi

miRNA ifade düzeyleri	Grup	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
miR-16-5p $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Hasta	,333	142	,000	,400	142	,000
	Kontrol	,183	97	,000	,804	97	,000
miR-17-5p $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Hasta	,312	142	,000	,443	142	,000
	Kontrol	,201	97	,000	,735	97	,000
miR-638 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Hasta	,405	142	,000	,196	142	,000
	Kontrol	,336	97	,000	,410	97	,000

Mann-Whitney U testi ile yapılan değerlendirmeye göre hasta ve kontrol grupları arasındaki $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri baz alınarak yapılan hesaplamalarda araştırdığımız miRNA'ların ifade düzeylerinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0,05$) olduğu görüldü. Her bir miRNA için elde edilen p değerleri sırasıyla miR-16-5p, $p < 0,001$; miR-17-5p, $p < 0,001$ miR-638, $p = 0,005$ olduğu belirlendi (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Hasta ve kontrol grupları arasında miRNA gen ifade düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

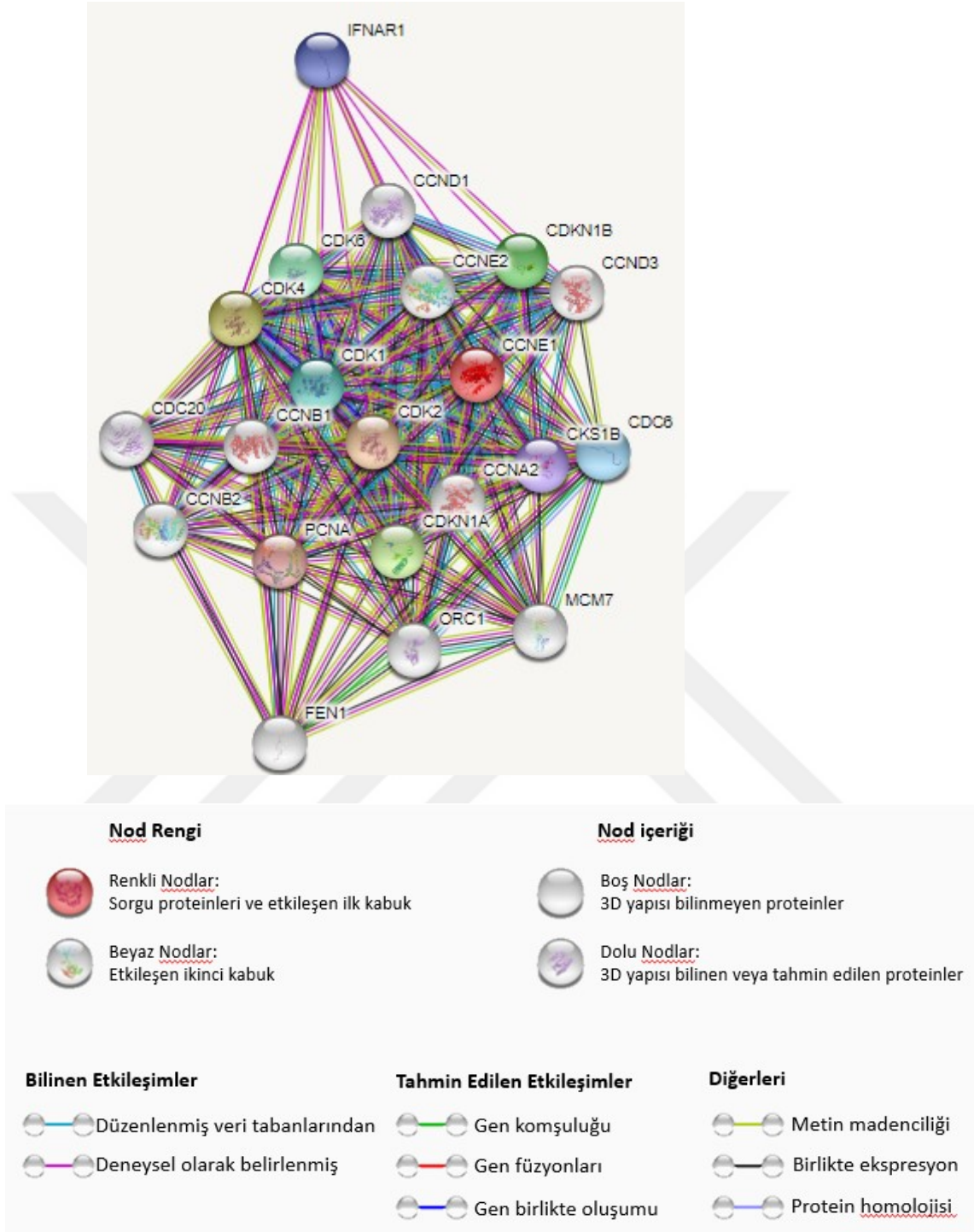
	miR-16-5p	miR-17-5p	miR-638
Mann-Whitney U	4043,000	4540,500	5408,500
Wilcoxon W	8796,000	9293,500	10161,500
Z	-5,419	-4,471	-2,817
p Değeri <	0,000	0,000	0,005

Yüksek ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı çıkan miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 moleküllerinin hedeflediği mRNA'ları baskıladığı yani hedef genin aktivitesini negatif yönde düzenlediği için bu miRNA genlerinin tümör baskılayıcı özellik gösterdiği “mirTarBase” ve “TargetScan” veri tabanları kullanılarak belirlendi (Tablo 4-6). Ardından ilgili miRNA'ların hedef genlerinin en fazla ilişkili olduğu protein ağını göstermek için “STRING Analizi (Protein-protein interaksiyon analizi)” gerçekleştirildi. miR-16-5p, miR-17-5p ve miR-638'in hedef genlerine ilişkin yapılan String analizi sonrasında elde edilen protein ağındaki etkileşimlerin anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). String analizi sonuçlarına göre miR-16-5p'nin hedeflediği genler ve buna bağlı proteinler arasında CCNE1 ve CCND1 protein etkileşimlerinin güçlü olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Şekil 4-14). Cyclin E1 (CCNE1) hücrelerin G₁'den S fazına

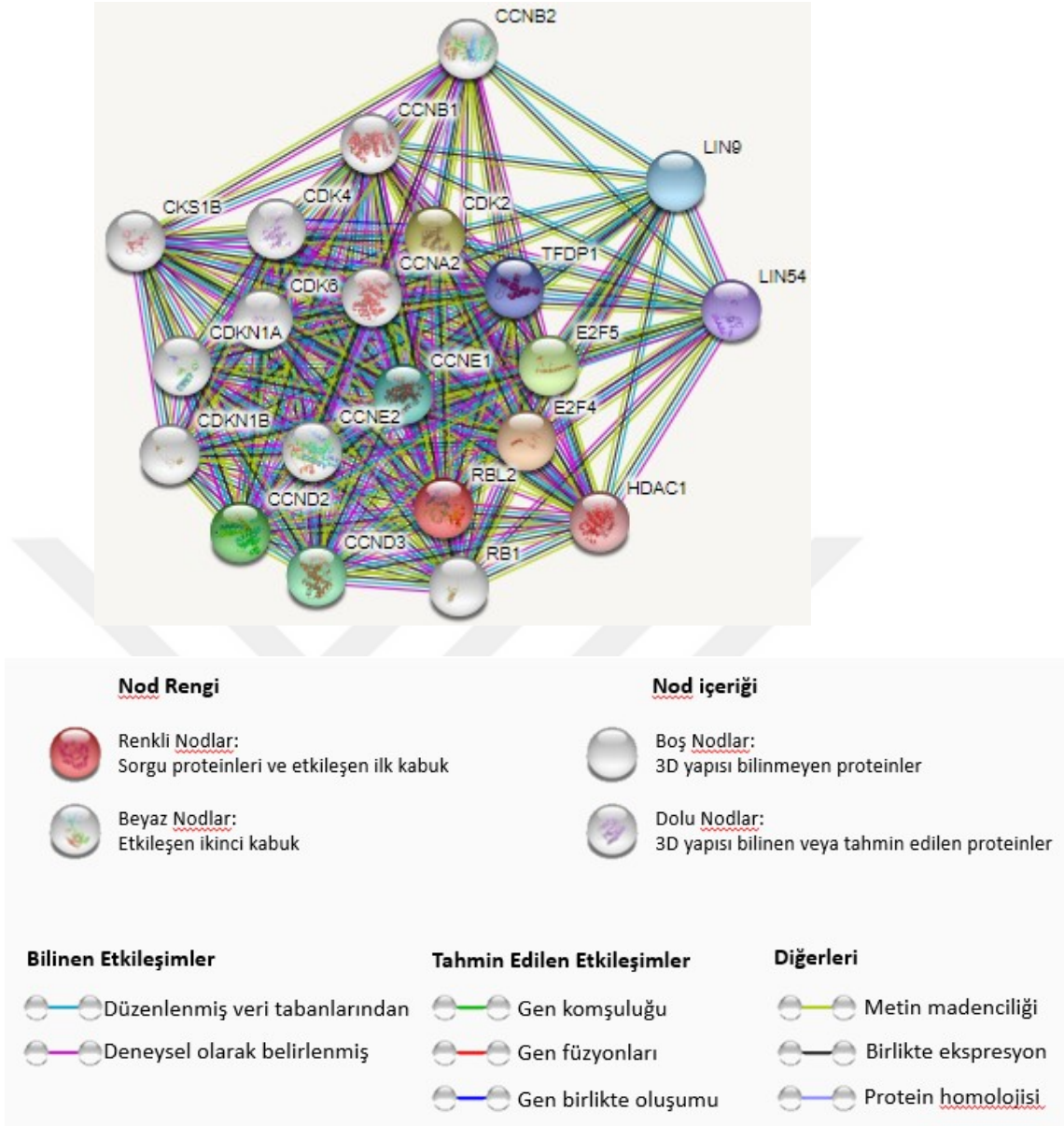
geçişini kontrol eden, miR-16-5p'nin hedeflediği ve negatif yönde düzenlediği en önemli genlerden biri olduğu belirlendi. miR-17-5p için yapılan String analizinde ise bu miRNA ile etkileşen ve aralarında güçlü ilişki olduğu gösterilen proteinlerin CDKN1A ve RBL2 molekülleri olduğu saptandı (Şekil 4-15). miR-638 için yapılan String analizinde ise bu miRNA'nın hedeflediği en önemli hedef genlerin PTEN ve TP53 oldukları ve bu iki molekül arasında son derece güçlü bir etkileşimin olduğu gösterildi ($p < 0,05$) (Şekil 4-16).

Tablo 4-6: Ekspresyon düzeyi artan miRNA'ların olası hedef molekülleri

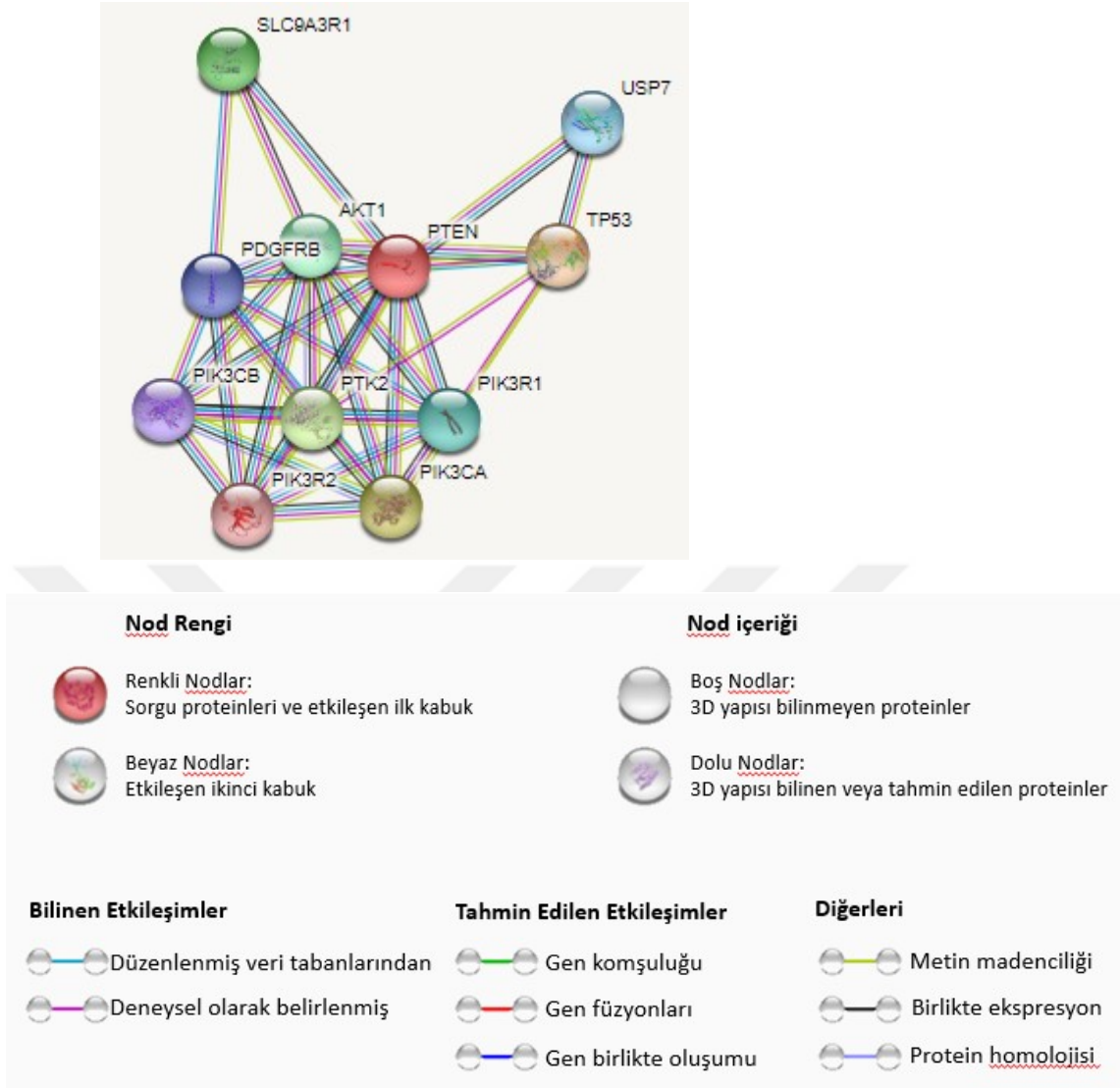
miRNA	Dizi	Olası Hedef Moleküller
miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	CCNE1, BCL2, FGF2, HMGA1, CCND1, VEGFA, CHEK1
miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	E2F1, PTEN, TGFBR2, CDKN1A/p21, RBL2/p130, BCL2L1/Bim, TP53INP1
miR-638	AGGGAUCGCGGGCGGGUGGCGGCCU	CDK2, DACT3, TP53INP2, PTEN, TP53



Şekil 4-14: miR-16-5p'nin hedef genleri için yapılan string analizi



Şekil 4-15: miR-17-5p'nin hedef genleri için yapılan string analizi



Şekil 4-16: miR-638'in hedef genleri için yapılan string analizi

Ayrıca araştırdığımız miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 gen ifade düzeyleri ile hastaların sigara içme durumları, lokal ileri evre hastalık ve oral kontraseptif kullanımı arasındaki ilişki ayrı ayrı Mann-Whitney U testi ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4-7, 4-8, 4-9'da verilmiştir. İncelenen gruplara göre; hastalarda miR-17-5p'nin artan ifade düzeyi ile sigara içme durumu arasında anlamlı bir fark saptanırken ($p=0,007$), diğer miRNA'lar ile sigara içme durumu arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p>0,05$). miR-638'in artan ifade düzeyi ile lokal ileri evre hastalık durumu arasında anlamlı bir fark varken ($p=0,03$), diğer miRNA'lar ile lokal ileri evre hastalık durumu arasında istatistiksel bir fark yoktur ($p>0,05$). Hastalara ait diğer bir klinik veri olan oral kontraseptif kullanımı ile gen ifade düzeyleri arasında ise herhangi bir istatistiksel anlamlılık gösterilememiştir ($p>0,05$).

Tablo 4-7: Hasta miRNA gen ifade düzeylerinin sigara içme durumları ile istatistiksel olarak karşılaştırılması

Sigara kullanımı	N	Analizler	miR-16-5p	miR-17-5p	miR-638
var	53	Mann-Whitney U	1866,000	1683,500	2081,000
yok	89	Wilcoxon W	3244,000	3061,500	6086,000
		Z	-1,914	-2,694	-,996
		p Değeri	,056	,007	,319

Tablo 4-8: : Hasta miRNA gen ifade düzeylerinin lokal ileri evre hastalık durumları ile istatistiksel olarak karşılaştırılması

Lokal İleri Evre	N	Analizler	miR-16-5p	miR-17-5p	miR-638
var	81	Mann-Whitney U	2180,500	2424,000	1927,500
yok	61	Wilcoxon W	5420,500	5664,000	5167,500
		Z	-1,080	-,067	-2,133
		p Değeri	,280	,947	,033

Tablo 4-9: Hasta miRNA gen ifade düzeylerinin oral kontraseptif kullanımı ile istatistiksel olarak karşılaştırılması

OKS kullanımı	N	Analizler	miR-16-5p	miR-17-5p	miR-638
var	51	Mann-Whitney U	2255,500	2110,000	2037,500
yok	91	Wilcoxon W	3581,500	3436,000	3363,500
		Z	-,061	-,691	-1,005
		p Değeri	,952	,490	,315

Hastaların sırası ile 40 yaş altı ve üstü, 45 yaş altı ve üstü, 50 yaş altı ve üstü şeklinde yaş durumları gruplandırılarak, tek tek miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 gen ifade düzeyleri ile karşılaştırılmış ve yaş durumları ile gen ifade düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: Hasta miRNA gen ifade düzeylerinin yaşa göre istatistiksel olarak karşılaştırılması

Yaş	Hasta Sayısı (N=142)	Analizler	miR-16-5p	miR-17-5p	miR-638
40= 40>	28 114	Mann-Whitney U	1388,000	1512,000	1513,500
		Wilcoxon W	1794,000	1918,000	8068,500
		Z	-1,066	-,431	-,423
		p Değeri	,286	,667	,672

45=< 45>	42 100	Mann-Whitney U	2074,500	2098,500	2075,500
		Wilcoxon W	2977,500	7148,500	2978,500
		Z	-,114	-,007	-,110
		p Değeri	,909	,995	,913
50=< 50>	73 69	Mann-Whitney U	2461,500	2435,500	2486,000
		Wilcoxon W	5162,500	4850,500	4901,000
		Z	-,233	-,339	-,133
		p Değeri	,816	,735	,894

İncelediğimiz miRNA ifade düzeylerinin, hastaların ailesinde yer alan over kanserli bireylerin sayısı ve tüm kanserli vakaların toplamını içeren kanserli akraba sayısı grupları ile aralarında bir ilişkinin olup olmadığını anlamak için” spearman korelasyon analizi” gerçekleştirilmiştir. miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 gen ifade düzeyleri ile ailedeki kanser sayısı değişkenleri arasında bir korelasyon ve istatistiki anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-11).

Tablo 4-11: miRNA ifade düzeyleri ile ailedeki over kanseri ve toplam kanser sayısı arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon istatistiği

Korelasyonlar		Ailede Over Kanseri Sayısı	Ailede Toplam Kanser Sayısı
miR-16-5p	N	142	142
	Korelasyon Katsayısı	-,064	-,153
	p Değeri	,453	,070
miR-17-5p	N	142	142
	Korelasyon Katsayısı	-,077	-,077
	p Değeri	,362	,362
miR-638	N	142	142
	Korelasyon Katsayısı	,002	-,027
	p Değeri	,985	,749

Hastaların sigara kullanımı ile metastaz varlığı arasındaki ilişkiyi incelemek için Ki-Kare Testi (Chi-Square Test) gerçekleştirilmiştir. Sigara kullanımı durumu, hastadaki lokal ileri hastalık-abdominal metastaz varlığı açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Klinik verilere ait hasta sayılarına ilişkin bilgiler ve istatistik sonuçları sırası ile Tablo 4-12 ve 4-13’de gösterilmektedir.

Tablo 4-12: Sigara kullanımı ile lokal ileri hastalık-abdominal metastaz durumu arasında yapılan istatistiksel değerlendirmeye ilişkin vaka dağılımı

		Metastaz durumu		Toplam
		yok	var	
Sigara	yok	35	54	89
	var	26	27	53
Toplam		61	81	142

Tablo 4-13: Sigara kullanımı ile lokal ileri hastalık-abdominal metastaz varlığının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Analizler	Value	Df (Serbestlik derecesi)	P Değeri	P Değeri
Pearson Chi-Square	1,524 ^a	1	,217	
Fisher's Exact Test				,224

4.4. Sağkalım Analizi

Tez çalışmasında incelediğimiz over kanserli hastaların ortalama sağkalım süresi 12,08 (SD $\pm$ 0,886) aydır ve 2010-2019 yılları arasında taradığımız 142 hastadan, 51'inin öldüğü, 84 hastanın tanıdan sonra hayatta kaldığı, 7 hastanın ise durumunun bilinmediği tespit edilmiştir.

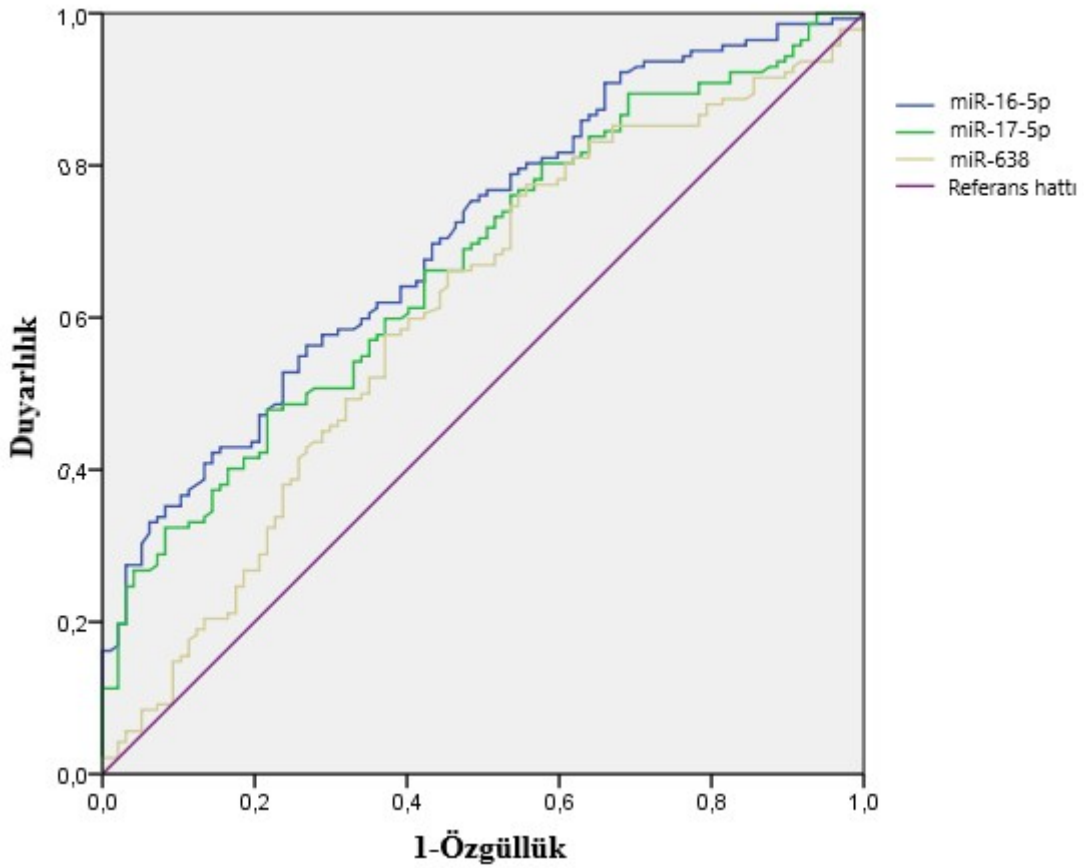
Araştırdığımız miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 ifade düzeylerinin sağkalım süresini etkileyen değişkenler olup olmadığını incelemek amacı ile Kaplan-Meier analizi gerçekleştirilmiştir. Gen ifade düzeyleri ile sağkalım süresi arasında bir korelasyon bulunmamıştır (Tablo 4-14). Ancak yüksek miR-638 ekspresyon düzeyi ile sağkalım arasında anlamlılık yönünde bir trend görülmektedir.

Tablo 4-14: miRNA ifade düzeyleri ile sağkalım süresi arasındaki korelasyon istatistiği

Korelasyonlar		miR-16-5p	miR-17-5p	miR-638
Süre (yıl)	N	51	51	51
	Korelasyon katsayısı	,079	,015	-,252
	p değeri	,582	,916	,075

4.5. ROC Analizi

İncelediğimiz miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 moleküllerinin aday biyobelirteç olarak tanısal performansını diğer bir deyişle over kanserli hasta ve sağlıklı kontrol grubunu ayırt edebilme gücünü gösterebilmek amacı ile *Receiver Operator Characteristics* (ROC) analizi gerçekleştirildi (Şekil 4-17). ROC eğrisi altında kalan alan (ROC-AUC) 0,5 ile karşılaştırıldığında 1'e ne kadar yakınsa tanısal gücünün o kadar kuvvetli olduğu bilinmektedir. Tablo 4-15'te verilen her bir miRNA için belirlenen ROC-AUC değerleri ve %95 CI (Güven Aralığı) sonuçları yer almaktadır ve bu sonuçlara göre over kanserli hastaların tanısında miRNA değişkenlerinin tanısal gücü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4-17: Over kanserli hasta ve sağlıklı grup arasındaki miR16-5p, miR17-5p, miR-638 ROC eğrileri

Tablo 4-15: Over kanserli hasta ve sağlıklı grubun ayrılmasında miRNA'ların ROC-AUC değerleri

miRNA'lar	ROC-AUC	%95 CI	p değeri
miR-16-5p	,707	,641 - ,772	,000
miR-17-5p	,670	,603 - ,738	,000
miR-638	,607	,534 - ,681	,005

Over kanserli hastaların klinik verilerinden elde edilen CA-125 değerleri ile tez çalışmasında araştırdığımız miRNA ifade düzeylerine ait sayısal ölçümler arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığını belirlemek amacı ile "spearman korelasyon analizi" gerçekleştirilmiştir. miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 ifade düzeyleri ile tedavi başlangıcında ve tedavi esnasında bakılan CA-125 sayısal değişkenleri arasında bir korelasyon ve istatistiki anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-16).

Tablo 4-16:miRNA ifade düzeyleri ile CA-125 değişkenleri arasındaki korelasyon istatistiği

p Değerleri	Başlangıç CA-125	Son CA-125
miR-16-5p	,672	,984
miR-17-5p	,259	,095
miR-638	,664	,579

5. TARTIŞMA

Over kanseri, kadınlarda görülen tüm kanserler arasında dünyada 8. sırada, ülkemizde 7. sırada yer almaktadır. Jinekolojik kanserler arasında ise en ölümcül malignitelerden biridir. Over kanseri dünya çapında 295.414 yeni vakadan ve 184.799 ölümden sorumludur. Ülkemizde 2018'de 3.729 kadının over kanseri teşhisi aldığı ve 2.191 kadının kansere bağlı olarak hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir [17, 18].

Over kanserlerinin % 90'ından fazlası epitelyal over kanserleridir. Over kanseri erken evrede belirgin bir semptom göstermez ve over kanseri tanısı alan hastaların % 60'ından fazlasında abdominal veya uzak metastazlar vardır [92]. Over kanseri tanısı için pelvik muayene, transvajinal ultrasonografi ve serum CA-125 seviyesi rutin prosedürler sırasında bakılan testlerdir ve bu testler erken tanı koymak için yeterince hassas ve spesifik değildirler [114]. Erken aşamada over karsinomunu tespit etmek için klinik kullanımda kanıtlanmış yeterli duyarlılık ve özgüllükte bir biyobelirteç olmaması da tanının ileri evrelerde koyulmasına yol açmaktadır [93]. Bu konuda tedaviler ve stratejiler gelişmeye devam etse de, epitelyal over kanseri için beş yıllık sağkalım oranı sadece % 30'dur [92, 115] . Bu nedenle hastalardan invaziv olmayan veya minimal invaziv yöntemlerle elde edilebilecek yüksek hassasiyette biyobelirteçlerin bulunmasına ve ilerletilmesine ihtiyaç vardır.

mikroRNA'lar 18-24 nükleotid uzunluğunda, postranskripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen küçük RNA molekülleridir. Genel olarak, miRNA genlerinin % 50'si kansere bağlı genomik bölgelerde veya kırılgan bölgelerdedir [116]. Aynı zamanda miRNA'lar kanda ve vücut sıvılarında oldukça kararlı bir şekilde ifade edilirler. Bu nedenle araştırmalar miRNA'ların kanser diagnozu, sınıflaması ve prognoz tahmininde potansiyel biyobelirteçler olabileceğini göstermektedir. Ayrıca miRNA ekspresyon profilleri ile yapılan çalışmalarda miRNA'ların kanser türlerini ayırt etmede haberci RNA'lara (mRNA'lar) göre daha etkili oldukları gösterilmiştir [71]. Bu sebeple miRNA'lar, kanser tanısı ve sınıflandırması için mRNA'lardan potansiyel olarak daha üstün belirteçlerdir [117, 118]. Ek olarak miRNA'ların over kanserinde gösterilen anormal ekspresyonunun, invazyon ve metastaz ile yakından ilişkili olduğu vurgulanmaktadır [93].

Tez çalışmasında daha önce ekibimizde yapılan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen projede mikroarray analizi bakılan ve sonucu anlamlı çıkan miRNA'lar arasından seçilen miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638 genlerinin over kanserli hastalarda validasyonlarının yapılması ve biyobelirteç niteliğinin incelenmesi amacı ile hastaların periferik kan örneklerine ait lenfositler kullanılarak gerçek-zamanlı PZR işlemi gerçekleştirildi. Hastaların miRNA ifade düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre miR-16-5p'nin $2^{-\Delta\Delta C_t} = 11,5$; miR-17-5p'nin $2^{-\Delta\Delta C_t} = 6,1$; miR-638'in $2^{-\Delta\Delta C_t} = 7,5$ kat arttığı saptandı ve bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0,05$) olduğu görüldü. Her bir miRNA için elde edilen p değeri; miR-16-5p, $p < 0,001$; miR-17-5p, $p < 0,001$ miR-638, $p = 0,005$ 'dir. Elde edilen verilere göre ekspresyon düzeyinin artması miRNA'ların onkogenik özellik gösterdiğini ve bu yolla tümör baskılayıcı hedef mRNA'larını baskılayarak tümör oluşumuna ya da ilerlemesine yol açtığını düşündürmektedir. Bu amaçla incelediğimiz miRNA'ların lokal ileri evre hastalık-abdominal metastaz durumu ile ilişkisine bakıldı ve miR-638'in artan ifade düzeyi ile abdominal metastazı olan lokal ileri evre hastalar arasında anlamlı bir fark saptandı ($p = 0,007$). Diğer iki miRNA'da ise bu açıdan anlamlı bir fark görülemedi. Bu bulgular miR-16-5p, miR-17-5p'nin tanısal bir değere sahip olduğunu, miR-638'in ise hem tanısal hem de prognostik öneme sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak miRNA'ların tanısal gücünü belirlemek amacı ile yapılan ROC analizinde her bir miRNA'nın hastalığı ayırt etme performansının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (miR-16-5p, $p < 0,001$; miR-17-5p, $p < 0,001$ miR-638, $p = 0,005$). Over kanserli hastaların klinik verilerinden elde edilen CA-125 değerleri ile tez çalışmasında araştırdığımız miRNA düzeyleri arasında korelasyon analizi gerçekleştirildi ve bu iki değişken arasında bir ilişki ve istatistiksel anlamlılık bulunamadı ($p > 0,05$). Tez çalışmasının kapsamı genişletilerek, CA-125 değerlerinin sağlıklı kontrol grubunda da bakılması, hastalığı ayırt etme gücü açısından incelediğimiz miRNA'lar ile CA-125 değerlerinin karşılaştırılabilmesi için önemli olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca hastaların bazı klinik verileri ile incelediğimiz miRNA'ların ifade düzeyleri karşılaştırıldığında; hastaların sigara içme durumu ile miR-17-5p'nin artan ifade düzeyi arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p = 0,007$).

Overlerin dinamik yapısı nedeniyle fizyolojik fonksiyonu ile ilgili tüm yapıların patolojik dönüşüm için bir potansiyel taşıdığı bilinmektedir. Folikül gelişimi, oosit olgunlaşması gibi aşamalarda bozukluk olması ya da ovulasyon sırasında ortaya çıkan

deformasyonlar onarılırken kontrolsüz hücre bölünmesi meydana gelmesi over kanseri gelişimi ile sonuçlanabilmektedir [119, 120]. Bununla birlikte miRNA'ların folikül gelişiminde ve ovulasyonda rol oynadıkları birçok çalışmada ortaya koyulmuştur [121]. miRNA ekspresyon düzeyindeki değişiklikler anormal folikül gelişimi veya overin diğer hastalıklarında da gösterilmiştir [122]. Çalışmamızda araştırdığımız miR-16-5p ile over kanseri arasında literatürde bir ilişkiye rastlanmamıştır. Ancak miR-16-5p'nin overlerde gelişen fizyolojik mekanizmalarla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Yerushalmi ve ark. foliküler olgunlaşma ve ovulasyon için gerekli moleküler ve düzenleyici mekanizmaları anlamak için, bu işlemlerde yer alan miRNA transkriptomunu ortaya çıkarmayı hedeflediler ve folikül oluşumunda rol alan TGF β 1 ile miR-16-5p ve miR-34a-5p'nin ovulasyon sırasında VEGF'nin geçici inhibisyonuna yol açtıklarını gösteren bir mekanizma öne sürmüşlerdir [123]. Foliküler sıvıda yer alan hücre dışı miRNA'lar (exmiRNA'lar) ile yapılan başka bir çalışmada miR-16-5p'nin embriyo kalitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [124]. Çalışmamızda miR-16-5p ekspresyonunun over kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre yüksek çıkması, miR-16-5p'nin over kanseri oluşumu için tetikleyici bir neden olabileceğini ve tanısal değer taşıdığını düşündürmektedir. Wu ve ark. yaptıkları çalışmada, HHV-8 ve HIV ile infekte Kaposi Sarkomunda miR-16-5p ekspresyon düzeyinin oldukça anlamlı düzeyde arttığını göstermişlerdir [125]. Zheng ve ark. algortima tabanlıyla inceledikleri miR-16-5p, miR-451a ve miR-574-5p üçlü kombinasyonunun, özofageal skuamöz hücreli karsinoma'da (ESCC) anlatım seviyelerinin arttığını ve güçlü diagnostik biyobelirteçler olabileceklerini göstermişlerdir [126]. Qu ve ark. meme karsinomu tümör dokusu ve hücre hattında (MCF-7 ve MDA-MB-231) yaptıkları çalışmada miR-16-5p'nin anlatımının arttığını ve HIF- α ile VEGFA'yı hedef aldıklarını göstermişler ve terapötik bir molekül olduğunu öne sürmüşlerdir [127]. Çalışmamızda gösterilen miR-16-5p'nin onkogenik özelliği, verilen çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte aslında tümör baskılayıcı özelliğini gösteren birçok çalışma da mevcuttur. Örneğin Zhang ve ark. mide kanserinde yaptıkları çalışmada miR-19b-3p ve miR-16-5p ekspresyon düzeylerinin özellikle erken evre kanserde azaldığını ve mide kanserinin erken taramasında ya da ilerlemesinin değerlendirilmesinde belirteç olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir [9]. Bu sonuçlar miR-16-5p seviyesinin tümör tiplerine bağlı olabileceği ve çeşitli tümörlerde farklı biyolojik rol oynayabileceği gerçeğini yansıtmaktadır. MiR-16-5p için "miRTarBase", "TargetScan" gibi biyoinformatik veritabanları kullanılarak tespit edilen

hedef molekülleri ile ilgili çalışmalar taranmıştır. Hücre döngüsünün pozitif bir düzenleyicisi olan Cyclin E1 (CCNE1), hücrelerin G₁'den S fazına geçişini kontrol etmektedir ve miR-16'nın çeşitli kanserlerde gösterilen aşırı ekspresyonu bu hedef geni baskılayarak hücre siklusunun bozulmasına neden olmaktadır [128]. Çalışmamızda anlatımı artan miR-16-5p'nin, CCNE1, BCL2, CHEK1, VEGFA gibi hedef genleri ile etkileşime girerek over kanseri hücrelerinin proliferasyonunda rol aldığı düşünülmektedir. Ayrıca miR-16-5p'nin çalışmalarda gösterilen hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik özelliği kanserdeki rolünün oldukça karmaşık olduğunu ve daha fazla araştırmanın yapılması gerektiğini göstermektedir.

MiR-17-92 kümesinin en belirgin üyesi olan MiR-17-5p; proliferasyon, hücre döngüsü, apoptozis ve otofaji gibi hücresel süreçlerin temel bir düzenleyicisidir ve farede eksikliğin öldürücü olduğu ifade edilmiştir. Büyük ölçekli miRNome analizi, miR-17-5p'yi tümörlerde onkogen olarak tanımlamaktadır [80]. MiR-17-5p'nin aşırı anlatımı hem hematopoetik tümörlerde hem de solid tümörler içinde en çok meme, kolon, akciğer, pankreas, prostat ve mide kanserlerinde gösterilmiştir [129, 130]. Chen ve ark. yaptıkları çalışmada, miR-17-5p seviyesinin yüksek olmasını, akciğer kanserli hastalarda kısa sağkalımla ve sigara içme durumu ile anlamlı olarak ilişkili bulmuşlardır [131]. Çalışmamızda over kanserli hastaların sigara içme durumu ile miR-17-5p'nin artan ifade düzeyi arasında çıkan anlamlı farkın, ilgili çalışmayla tutarlı olduğu görülmekte ve klinikopatolojik bir veri olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan miR-17-5p için biyoinformatik veritabanları kullanılarak tespit ettiğimiz hedef molekülleri ile ilgili çalışmalar taranmıştır. Qu ve ark. yaptıkları çalışmada mide kanseri dokularında miR-17-5p ile TGFBR2 proteini arasında ters bir korelasyon göstermişlerdir. Hücre çalışmaları, miR-17-5p'nin, tümör baskılayıcı olarak bilinen TGFBR2 mRNA'sının 3'UTR'sine doğrudan bağlanarak TGFBR2 ekspresyonunu negatif olarak düzenlediğini ve böylece hücre büyümesini ve göçünü desteklediğini göstermektedir. TGFBR2, TGF- β sinyal yolunun başlangıç düzenleyicisi olarak görev yapmakta ve ekspresyon kaybı veya azalması kontrolsüz hücre çoğalmasına ve invazyona yol açmaktadır [132]. Over kanserinde miRNA'ların aşırı ekspresyonunun invazyon ve metastazla yakından ilişkili olduğu bilgisini göz önünde bulundurursak çalışmamızda artan miR-17-5p düzeyinin, over kanserinde invazyon gelişimine TGFBR2 hedef molekülü ile etkileşerek yol açabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak miR-17-5p, hücre döngüsü geçişinde G₁ / S fazının ana düzenleyicisi olarak kabul

edilmektedir [133]. Zhu ve ark. yaptıkları çalışmada miR-17-5p'nin pankreas adenokarsinomunda anlatımının arttığını ve doğrudan retinoblastoma (Rb) ailesine ait bir tümör baskılayıcı olan RBL2'yi hedeflediğini göstermektedir. Yüksek miR-17-5p seviyeleri ve düşük RBL2 seviyeleri kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Tümörlerin çoğu, pRb yolağındaki değişiklikler sayesinde G₁ / S geçişinde kendileri için avantaj kazanabilirler. RBL2, transkripsiyon faktörü E2F4 ile etkileşime girer ve RBL2 / E2F4 ilişkili transkripsiyon baskılayıcı kompleksin bozulması S fazına hızlı geçişi sağlamakta ve hücre proliferasyonuna yol açmaktadır [134]. Çalışmamızda da yüksek bulduğumuz miR-17-5p ekspresyon seviyesinin hücre döngüsü geçişini hızlandırarak, over kanserinde hücre proliferasyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir. Gu ve ark. yaptıkları çalışmada büyüme faktörü reseptörü olan GFR α 2'nin yüksek ekspresyon seviyesinin, miR-17-5p seviyesini artırarak PTEN inaktivasyonuna yol açtığı keşfedilmiştir. PTEN hücre çoğalması, gelişimi, sinyal iletimi ve apoptoziste çok önemli rol oynayan tümör baskılayıcı bir gendir. GFR α 2/Mir-17-5p/PTEN yolağı hücrelerin hayatta kalmasına ve kemodirence yol açmaktadır [135]. Fang ve ark. over kanser hücre hattında (OVCAR-3 ve SKOV-3) yaptıkları çalışmada miR-17-5p'nin aşırı ekspresyonunun PTEN'ni baskılayarak AKT yolağını aktive ettiğini ve bu yolla over kanseri hücrelerinde sağkalım oranının, göç ve invazyonun arttığını, apoptozun azaldığını göstermişlerdir [136]. Chen ve ark. Nazofarengeal karsinomada aşırı ifadesi gösterilen MiR-17-5p'nin direkt olarak G₁ / S kontrol noktasının güçlü bir inhibitörü CDKN1/p21'i hedefleyerek in vivo ve in vitro hücre proliferasyonuna yol açtığını göstermişlerdir [137]. Tüm bu çalışmalarda daha önce çeşitli kanser türlerinde artışı gösterilen miR-17-5p ifade düzeyi ile çalışmamız korelasyon göstermektedir. Benzer şekilde miR-17-5p'nin TGFBR2, PTEN, E2F1, RBL2, CDKN1A gibi hedef moleküllerini negatif yönde regüle ederek over kanseri gelişimine katkı sağladığı düşünülmektedir.

Bhattacharya ve ark. yaptıkları çalışmada primer melanomlara kıyasla metastatik melanom lezyonlarında miR-638'i aşırı eksprese olan ve TP53 ile uyarılabilir nükleer protein 2 (TP53INP2)'yi hedef alarak melanomun ilerlemesinde rol alan miRNA olarak tanımladılar. Melanoma hücrelerinde TP53INP2'nin tek başına aşırı ekspresyonu hücrelerin invazyon ve proliferasyon yeteneğini azaltmaktadır. Ancak miR-638, TP53INP2'yi baskılayarak tam tersi etki göstermesine yol açmaktadır [138]. Çalışmamızda da miR-638'in ifade düzeyinin yüksek bulunması ve lokal ileri

abdominal metastatik over kanseri ile ilişkili çıkması metastazı önleyen genleri hedef olarak over kanserinin progresyonunda rol aldığını düşündürmektedir. Kanserde otofajinin düzensizliği bilinmektedir. Ren ve ark. 2017 yılında miR-638'in özofagus skuamöz hücreli karsinomun (ESCC) ve meme kanseri hücrelerinin otofajisindeki düzenleyici rolünü rapor etmişlerdir ve miR-638 aşırı ekspresyonunun açlığa ve rapamisine bağlı otofajiyi teşvik ettiğini bulmuşlardır. Otofajide miR-638'in düzenleyici mekanizmalarını daha iyi açıklamak için hedef geni ile ilişkili bir algoritmayı önermişlerdir ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağının ana düzenleyicisi olan DACT3'ün, miR-638 tarafından düzenlendiğini doğrulamışlardır. Bu sonuçlar, miR-638-DACT3 ekseninin otofaji ve tümör oluşumunu kontrol etmede önemli bir moleküler yolak olabileceğini aydınlatmaktadır [139]. Özellikle ileri evre kanserde otofajinin uyarılması metastatik tümör hücrelerinde sağkalım avantajı sağlamaktadır [140]. miR-638'in otofajiyi uyardığının rapor edilmesi, çalışmamızdaki ileri evre metastatik over kanserinde de böyle bir etkiye yol açtığını akla getirmekte ve bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir. miR-638 kanserde terapötik bir ajan olarak kullanılabileceği için oldukça önemli bir moleküldür. Tay ve ark. yaptıkları kapsamlı çalışmada kolon (HCT116), osteosarkoma (U2OS), prostat (PC3) hücre hatlarında miR-638'in konakçı geni Dnm2 ile işbirliği yaparak anlatımının arttığını ve miR-638'in tümör baskılayıcı genler olan PTEN ve TP53'ü inhibe ederek kanser gelişimine yol açtığını, invazyon ve proliferasyona neden olduğunu göstermişlerdir [141]. MiR-638'in ekspresyon düzeyinin artması CDK2, DACT3, TP53INP2, PTEN, TP53 gibi hedef genleri inhibe ederek bu genlerin anlatımlarının azalmasına neden olmakta ve bu şekilde tümör oluşumunu tetiklemektedir. MiR-638'in aşırı ifadesinin özellikle metastaz ve invazyonda rol aldığının gösterildiği birçok çalışma bu tez çalışması ile korelasyon göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar, incelenen miRNA'ların kanserli hastalarda onkogenik özellik gösterdiğini ve özellikle miR-638'in bu yolla özellikle abdominal metastazı ve buna bağlı olarak lokal ileri hastalığı tetiklediğini düşündürmektedir. miR-16-5p, miR-17-5p ve miR-638 molekülleri over kanserini saptamak ve ilerlemesini göstermek için potansiyel biyobelirteçler olabilirler. Öte yandan miR-638'in lokal ileri evre hastalıkta anlamlı çıkması, prognostik değeri olabileceğini gösterdiği için ilerleyen çalışmalarda tedavisi devam eden hastalarda miR-638'in ifade düzeyine belirli aralıklarla bakılması anlamlı olacaktır. miRNA'ların birden fazla hedef gene sahip olması kanserdeki

rollerinin karmaşık olduğunu göstermektedir. miR-16-5p, miR-17-5p ve miR-638'in belirlenen hedef genleri ile birlikte incelenmesi, bu miRNA'ların aşırı ekspresyonunun kanser hücrelerinde nasıl seçici avantajlar sağladığının tam olarak anlaşılması için de önemli olacaktır. Ayrıca over kanserinin heterojen bir hastalık olması nedeni ile tek bir biyobelirtecini, yeterli özgüllük ve duyarlılıkta over kanserli hastayı sağlıklılardan ayırt etmesi ya da tümörün histolojik alt tiplerini sınıflandırması oldukça zordur. Bu nedenle bu tez çalışmasında biyobelirteç adayı olan miR-16-5p, miR-17-5p ve miR-638 molekülleri ile ekibimiz tarafından halen sürmekte olan diğer miRNA çalışmalarından elde edilen aday moleküllerin birlikte değerlendirilmesiyle over kanserinin erken teşhisinde ve prognozunda kullanılabilecek miRNA kombinasyonu yakın gelecekte ortaya koyulacaktır.

KAYNAKLAR

1. Mahdian-Shakib, A., et al., *Differential role of microRNAs in prognosis, diagnosis, and therapy of ovarian cancer*. Biomed Pharmacother, 2016. **84**: p. 592-600.
2. Dong, X., et al., *Advances in tumor markers of ovarian cancer for early diagnosis*. Indian J Cancer, 2014. **51 Suppl 3**: p. e72-6.
3. Bignotti, E., et al., *Identification of stably expressed reference small non-coding RNAs for microRNA quantification in high-grade serous ovarian carcinoma tissues*. J Cell Mol Med, 2016. **20**(12): p. 2341-2348.
4. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
5. Shenouda, S.K. and S.K. Alahari, *MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?* Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(3-4): p. 369-78.
6. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
7. Cho, W.C., *Great potential of miRNAs as predictive and prognostic markers for cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2012. **12**(4): p. 315-8.
8. Cho, W.C., *MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(8): p. 1273-81.
9. Zhang, J., et al., *Circulating MiR-16-5p and MiR-19b-3p as Two Novel Potential Biomarkers to Indicate Progression of Gastric Cancer*. Theranostics, 2015. **5**(7): p. 733-45.
10. Arifoğlu, Y., *Her Yönüyle Anatomi*. Vol. 1. 2017 p.456: ISBN 978-605-4949-61-8 İstanbul Tıp Kitapevleri.
11. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(3): p. 433-43.
12. Colombo, N., et al., *Ovarian cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **60**(2): p. 159-79.
13. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. Cancer, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42.
14. Lalwani, N., et al., *Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment*. Radiographics, 2011. **31**(3): p. 625-46.
15. Dubeau, L., *The cell of origin of ovarian epithelial tumours*. Lancet Oncol, 2008. **9**(12): p. 1191-7.
16. Bast, R.C., Jr., B. Hennessey, and G.B. Mills, *The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(6): p. 415-28.
17. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
18. Resnick, B., et al., *Implementation of the 6-week educational component in the Res-Care intervention: process and outcomes*. J Contin Educ Nurs, 2009. **40**(8): p. 353-60.
19. Reid, B.M., J.B. Permuth, and T.A. Sellers, *Epidemiology of ovarian cancer: a review*. Cancer Biol Med, 2017. **14**(1): p. 9-32.
20. Holschneider, C.H. and J.S. Berek, *Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors*. Semin Surg Oncol, 2000. **19**(1): p. 3-10.

21. Boyd, J. and S.C. Rubin, *Hereditary ovarian cancer: molecular genetics and clinical implications*. Gynecol Oncol, 1997. **64**(2): p. 196-206.
22. Webb, P.M. and S.J. Jordan, *Epidemiology of epithelial ovarian cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017. **41**: p. 3-14.
23. Salehi, F., et al., *Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2008. **11**(3-4): p. 301-21.
24. Lynch, H.T., et al., *Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management*. Mol Oncol, 2009. **3**(2): p. 97-137.
25. Ketabi, Z., et al., *Ovarian cancer linked to Lynch syndrome typically presents as early-onset, non-serous epithelial tumors*. Gynecol Oncol, 2011. **121**(3): p. 462-5.
26. Pal, T., et al., *Frequency of mutations in mismatch repair genes in a population-based study of women with ovarian cancer*. Br J Cancer, 2012. **107**(10): p. 1783-90.
27. Song, H., et al., *Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population*. J Clin Oncol, 2015. **33**(26): p. 2901-7.
28. Ramus, S.J., et al., *Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(11).
29. Riman, T., S. Nilsson, and I.R. Persson, *Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2004. **83**(9): p. 783-95.
30. Cramer, D.W. and W.R. Welch, *Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis*. J Natl Cancer Inst, 1983. **71**(4): p. 717-21.
31. Tung, K.H., et al., *Effect of anovulation factors on pre- and postmenopausal ovarian cancer risk: revisiting the incessant ovulation hypothesis*. Am J Epidemiol, 2005. **161**(4): p. 321-9.
32. Kvale, G., et al., *Reproductive factors and risk of ovarian cancer: a prospective study*. Int J Cancer, 1988. **42**(2): p. 246-51.
33. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian, C., et al., *Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls*. Lancet, 2008. **371**(9609): p. 303-14.
34. Beral, V., et al., *Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet, 2007. **369**(9574): p. 1703-10.
35. Danforth, K.N., et al., *A prospective study of postmenopausal hormone use and ovarian cancer risk*. Br J Cancer, 2007. **96**(1): p. 151-6.
36. Javadi, S., et al., *Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging*. AJR Am J Roentgenol, 2016. **206**(6): p. 1351-60.
37. Meinhold-Heerlein, I., et al., *The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications*. Arch Gynecol Obstet, 2016. **293**(4): p. 695-700.
38. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Seromucinous Tumors of the Ovary. What's in a Name?* Int J Gynecol Pathol, 2016. **35**(1): p. 78-81.
39. Kim, J., et al., *Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer*. Cancers (Basel), 2018. **10**(11).
40. Tewari, K., et al., *Malignant germ cell tumors of the ovary*. Obstet Gynecol, 2000. **95**(1): p. 128-33.

41. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded*. Am J Pathol, 2016. **186**(4): p. 733-47.
42. Koshiyama, M., N. Matsumura, and I. Konishi, *Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 934261.
43. Prat, J., *Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features*. Virchows Arch, 2012. **460**(3): p. 237-49.
44. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm*. Hum Pathol, 2011. **42**(7): p. 918-31.
45. Goff, B.A., et al., *Ovarian carcinoma diagnosis*. Cancer, 2000. **89**(10): p. 2068-75.
46. Jelovac, D. and D.K. Armstrong, *Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(3): p. 183-203.
47. Schilder, J.M., et al., *Outcome of reproductive age women with stage IA or IC invasive epithelial ovarian cancer treated with fertility-sparing therapy*. Gynecol Oncol, 2002. **87**(1): p. 1-7.
48. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
49. Katz, B., et al., *MicroRNAs in Ovarian Cancer*. Hum Pathol, 2015. **46**(9): p. 1245-56.
50. Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNAs in human cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2016. **1**: p. 15004.
51. Erson, A.E. and E.M. Petty, *miRNAs and cancer: New research developments and potential clinical applications*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(24): p. 2317-22.
52. Melamed, Z., et al., *Alternative splicing regulates biogenesis of miRNAs located across exon-intron junctions*. Mol Cell, 2013. **50**(6): p. 869-81.
53. Ul Hussain, M., *Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action*. Cell Tissue Res, 2012. **349**(2): p. 405-13.
54. Tsuchiya, S., Y. Okuno, and G. Tsujimoto, *MicroRNA: biogenetic and functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer*. J Pharmacol Sci, 2006. **101**(4): p. 267-70.
55. Ahmed, F.E., *Role of miRNA in carcinogenesis and biomarker selection: a methodological view*. Expert Rev Mol Diagn, 2007. **7**(5): p. 569-603.
56. Iwakawa, H.O. and Y. Tomari, *The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(11): p. 651-665.
57. Pillai, R.S., *MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?* RNA, 2005. **11**(12): p. 1753-61.
58. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
59. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
60. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
61. Macfarlane, L.A. and P.R. Murphy, *MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer*. Curr Genomics, 2010. **11**(7): p. 537-61.
62. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.

63. Liu, X., K. Fortin, and Z. Mourelatos, *MicroRNAs: biogenesis and molecular functions*. Brain Pathol, 2008. **18**(1): p. 113-21.
64. Han, J., et al., *Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8*. Cell, 2009. **136**(1): p. 75-84.
65. Kawamata, T. and Y. Tomari, *Making RISC*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(7): p. 368-76.
66. Curtale, G. and F. Citarella, *Dynamic nature of noncoding RNA regulation of adaptive immune response*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 17347-77.
67. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
68. Sun, W., et al., *microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems*. Annu Rev Biomed Eng, 2010. **12**: p. 1-27.
69. Costa, P.M. and M.C. Pedroso de Lima, *MicroRNAs as Molecular Targets for Cancer Therapy: On the Modulation of MicroRNA Expression*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(10): p. 1195-220.
70. Cowland, J.B., C. Hother, and K. Gronbaek, *MicroRNAs and cancer*. APMIS, 2007. **115**(10): p. 1090-106.
71. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
72. Roldo, C., 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): p. 4677-84.
73. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 189-98.
74. Kluiver, J., et al., *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas*. J Pathol, 2005. **207**(2): p. 243-9.
75. Xing, Z., et al., *MicroRNAs and anticancer drugs*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(3): p. 233-9.
76. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
77. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
78. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
79. Hayashita, Y., et al., *A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation*. Cancer Res, 2005. **65**(21): p. 9628-32.
80. Zhang, X., et al., *Biology of MiR-17-92 Cluster and Its Progress in Lung Cancer*. Int J Med Sci, 2018. **15**(13): p. 1443-1448.
81. Kent, O.A. and J.T. Mendell, *A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes*. Oncogene, 2006. **25**(46): p. 6188-96.
82. Shah, M.Y. and G.A. Calin, *MicroRNAs as therapeutic targets in human cancers*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2014. **5**(4): p. 537-48.
83. Costinean, S., et al., *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7024-9.

84. Yadav, S., et al., *MIR155 Regulation of Ubiquilin1 and Ubiquilin2: Implications in Cellular Protection and Tumorigenesis*. Neoplasia, 2017. **19**(4): p. 321-332.
85. Thai, T.H., et al., *Regulation of the germinal center response by microRNA-155*. Science, 2007. **316**(5824): p. 604-8.
86. Zheng, D.L.D.X.Y.Z.Y.X.L.F.X.X.Y.L.X.Z.J.Z.H.M.L., *Non-coding RNAs and ovarian diseases (Review)*. Mol Med Rep., 2017 p. 1435-1440.
87. Lei, L., et al., *The regulatory role of Dicer in folliculogenesis in mice*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **315**(1-2): p. 63-73.
88. Tesfaye, D., et al., *MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development*. Reproduction, 2018. **155**(3): p. R121-R135.
89. Zhang, L., et al., *microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9136-41.
90. Mezzanzanica, D., *Ovarian cancer: a molecularly insidious disease*. Chin J Cancer, 2015. **34**(1): p. 1-3.
91. Ryland, G.L., et al., *MicroRNA genes and their target 3'-untranslated regions are infrequently somatically mutated in ovarian cancers*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35805.
92. Chen, S.N., et al., *MicroRNA in Ovarian Cancer: Biology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities*. Int J Environ Res Public Health, 2019. **16**(9).
93. Pal, M.K., et al., *MicroRNA: a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer*. Cancer Biol Med, 2015. **12**(4): p. 328-41.
94. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA signatures in human ovarian cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8699-707.
95. Kan, C.W., et al., *Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 627.
96. Nam, E.J., et al., *MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(9): p. 2690-5.
97. Wyman, S.K., et al., *Repertoire of microRNAs in epithelial ovarian cancer as determined by next generation sequencing of small RNA cDNA libraries*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5311.
98. Chung, Y.W., et al., *Detection of microRNA as novel biomarkers of epithelial ovarian cancer from the serum of ovarian cancer patients*. Int J Gynecol Cancer, 2013. **23**(4): p. 673-9.
99. Zhang, L., et al., *Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(19): p. 7004-9.
100. Wang, S., et al., *Upregulation of microRNA-203 is associated with advanced tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer*. Med Oncol, 2013. **30**(3): p. 681.
101. Resnick, K.E., et al., *The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform*. Gynecol Oncol, 2009. **112**(1): p. 55-9.
102. Calura, E., et al., *MiRNA landscape in stage I epithelial ovarian cancer defines the histotype specificities*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(15): p. 4114-23.
103. Vilming Elgaaen, B., et al., *Global miRNA expression analysis of serous and clear cell ovarian carcinomas identifies differentially expressed miRNAs including miR-200c-3p as a prognostic marker*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 80.

104. Hausler, S.F., et al., *Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening*. Br J Cancer, 2010. **103**(5): p. 693-700.
105. Sharma, S., *Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines*. Indian J Med Paediatr Oncol, 2009. **30**(1): p. 1-8.
106. Yang, W.L., Z. Lu, and R.C. Bast, Jr., *The role of biomarkers in the management of epithelial ovarian cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2017. **17**(6): p. 577-591.
107. Bottoni, P. and R. Scatena, *The Role of CA 125 as Tumor Marker: Biochemical and Clinical Aspects*. Adv Exp Med Biol, 2015. **867**: p. 229-44.
108. Moore, L.E., et al., *Proteomic biomarkers in combination with CA 125 for detection of epithelial ovarian cancer using prediagnostic serum samples from the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial*. Cancer, 2012. **118**(1): p. 91-100.
109. El Bairi, K., et al., *Emerging diagnostic, prognostic and therapeutic biomarkers for ovarian cancer*. Cell Oncol (Dordr), 2017. **40**(2): p. 105-118.
110. Xie, Y.J., M. Chen, and S.J. Chen, *Prediction of pregnancy outcomes with combined ultrasound scanning of yolk sacs and serum CA125 determinations in early threatened abortion*. Clin Exp Obstet Gynecol, 2014. **41**(2): p. 186-9.
111. Buamah, P., *Benign conditions associated with raised serum CA-125 concentration*. J Surg Oncol, 2000. **75**(4): p. 264-5.
112. Elias, K.M., J. Guo, and R.C. Bast, Jr., *Early Detection of Ovarian Cancer*. Hematol Oncol Clin North Am, 2018. **32**(6): p. 903-914.
113. Nolen, B.M. and A.E. Lokshin, *Biomarker testing for ovarian cancer: clinical utility of multiplex assays*. Mol Diagn Ther, 2013. **17**(3): p. 139-46.
114. Wang, X., et al., *Circulating microRNAs as novel potential diagnostic biomarkers for ovarian cancer: a systematic review and updated meta-analysis*. J Ovarian Res, 2019. **12**(1): p. 24.
115. Lengyel, E., *Ovarian cancer development and metastasis*. Am J Pathol, 2010. **177**(3): p. 1053-64.
116. Calin, G.A., 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): p. 2999-3004.
117. Jay, C., et al., *miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer*. DNA Cell Biol, 2007. **26**(5): p. 293-300.
118. Zhang, B., F.F. Cai, and X.Y. Zhong, *An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011. **158**(2): p. 119-23.
119. McGinnis, L.K., L.J. Luense, and L.K. Christenson, *MicroRNA in Ovarian Biology and Disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(9): p. a022962.
120. Montazerian, M., F. Yasari, and N. Aghaalkhani, *Ovarian extracellular MicroRNAs as the potential non-invasive biomarkers: An update*. Biomed Pharmacother, 2018. **106**: p. 1633-1640.
121. Donadeu, F.X. and S.N. Schauer, *Differential miRNA expression between equine ovulatory and anovulatory follicles*. Domest Anim Endocrinol, 2013. **45**(3): p. 122-5.
122. Imbar, T. and I. Eisenberg, *Regulatory role of microRNAs in ovarian function*. Fertil Steril, 2014. **101**(6): p. 1524-30.
123. Yerushalmi, G.M., et al., *Characterization of the miRNA regulators of the human ovulatory cascade*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15605.

124. Machtinger, R., et al., *Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study*. J Assist Reprod Genet, 2017. **34**(4): p. 525-533.
125. Wu, X.J., et al., *The expression profiles of microRNAs in Kaposi's sarcoma*. Tumour Biol, 2015. **36**(1): p. 437-46.
126. Zheng, D., et al., *Identification of Serum MicroRNAs as Novel Biomarkers in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Using Feature Selection Algorithms*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 674.
127. Qu, Y., et al., *MicroRNA-16-5p overexpression suppresses proliferation and invasion as well as triggers apoptosis by targeting VEGFA expression in breast carcinoma*. Oncotarget, 2017. **8**(42): p. 72400-72410.
128. Wang, F., et al., *Down-regulation of the cyclin E1 oncogene expression by microRNA-16-1 induces cell cycle arrest in human cancer cells*. BMB Rep, 2009. **42**(11): p. 725-30.
129. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
130. van Haften, G. and R. Agami, *Tumorigenicity of the miR-17-92 cluster distilled*. Genes Dev, 2010. **24**(1): p. 1-4.
131. Chen, Q., et al., *Prognostic significance of serum miR-17-5p in lung cancer*. Med Oncol, 2013. **30**(1): p. 353.
132. Qu, Y., et al., *MiR-17-5p regulates cell proliferation and migration by targeting transforming growth factor-beta receptor 2 in gastric cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 33286-96.
133. Cloonan, N., et al., *The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition*. Genome Biol, 2008. **9**(8): p. R127.
134. Zhu, Y., et al., *MiR-17-5p enhances pancreatic cancer proliferation by altering cell cycle profiles via disruption of RBL2/E2F4-repressing complexes*. Cancer Lett, 2018. **412**: p. 59-68.
135. Gu J., e.a., *GFRa2 prompts cell growth and chemoresistance through down-regulating tumor suppressor gene PTEN via Mir-17-5p in pancreatic cancer*. Cancer Lett., 2016: p. 434-41.
136. Fang, Y., C. Xu, and Y. Fu, *MicroRNA-17-5p induces drug resistance and invasion of ovarian carcinoma cells by targeting PTEN signaling*. J Biol Res (Thessalon), 2015. **22**: p. 12.
137. Chen, C., et al., *MiR-17-5p promotes cancer cell proliferation and tumorigenesis in nasopharyngeal carcinoma by targeting p21*. Cancer Med, 2016. **5**(12): p. 3489-3499.
138. Bhattacharya, A., et al., *miR-638 promotes melanoma metastasis and protects melanoma cells from apoptosis and autophagy*. Oncotarget, 2015. **6**(5): p. 2966-80.
139. Ren, Y., et al., *MiRNA-638 promotes autophagy and malignant phenotypes of cancer cells via directly suppressing DACT3*. Cancer Lett, 2017. **390**: p. 126-136.
140. Su, Z., et al., *Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 48.
141. Tay, Y., et al., *Characterization of dual PTEN and p53-targeting microRNAs identifies microRNA-638/Dnm2 as a two-hit oncogenic locus*. Cell Rep, 2014. **8**(3): p. 714-22.



HAM VERİLER



FORMLAR

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Bu bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu İ.Ü. Onkoloji Enstitüsüne başvuran over kanseri tanısına sahip hasta bireyler ile kontrol grubu sağlıklı bireylerde “Over Kanserli Hastalarda miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638’in İfade Düzeylerinin Araştırılması” isimli doktora tez çalışmasına davet etmek üzere hazırlanmıştır.

Çalışmanın Adı:

Over Kanserli Hastalarda miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638’in İfade Düzeylerinin Araştırılması

Tez Öğrencisi: Msc. Bio. Mukaddes AVŞAR SARAL

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Hülya YAZICI

Araştırmayı Yürütecek Kuruluşun Adı: İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD

Destekleyici Kuruluş: İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi

I-ARAŞTIRMA HAKKINDA BİLGİ:

Giriş:

“Over Kanserli Hastalarda miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638’in İfade Düzeylerinin Araştırılması” adını verdiğimiz çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla ve nasıl yapılacağını anlamanız ve katılıp katılmama doğrultusundaki kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Araştırma hakkında sözlü olarak size aktaracağım bilgiler yazılı olarak da size bir sonraki bölümde sunulacaktır. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu belgedeki son bölüm onay işlemleri ile ilgilidir. Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz lütfen bu bölümü imzalayınız. Okuma ve yazma konusunda engelleriniz olduğu takdirde bir tanığın gözetiminde bu belgeyi onaylamanız istenecek ve gerektiğinde parmak iziniz alınacaktır.

Çalışmanın Amacı:

Planlanan tez çalışmasında, bölümümüzde daha önce incelenmiş ve over kanserli hastalarda farklı olduğu saptanmış olan, over kanser etiyolojisinde önemli olduğunu düşündüğümüz miRNA’lardan miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638’in ifade düzeylerini

daha geniş over kanserli hasta ve sağlıklı kontrol grubunda inceleyerek validasyonlarının yapılması amaçlanmaktadır.

Over kanserini erken dönemde tespit edebilecek, non-invaziv biyobelirteçlere gerek vardır. Çalışmanın sonunda elde edilen bulgulara göre söz konusu 3 miRNA'nın yüksek riskli over kanserli hastaların erken tanısında, hastalığın gidişatı konusunda ve minimal rezidüel hastalığın belirlenmesinde likit biyopsi biyobelirteci olarak kullanılıp kullanılamayacağı ortaya koyulacaktır.

Çalışmanın İçeriği:

Çalışma grubumuz 150 over kanserli hasta ve hasta popülasyonu ile yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş 100 sağlıklı kişiden oluşturulacaktır. miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638'in gen ifade düzeyleri hasta ve sağlıklı kişilerin periferik kan lenfositlerinde araştırılacaktır. Alınan örneklerden RNA izole edilecektir. Elde edilen RNA'lardan özel primerler aracılığı ile cDNA sentezi gerçekleştirilecektir. Sentezlenen özel cDNA'ların , istediğimiz gene özgü primerle ve bir kontrol gen varlığında gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile gen ifade düzeyleri değerlendirilecektir.

Çalışmanın Başlama Tarihi ve Süresi:

Çalışmanın Mart 2018'de başlaması ve 18 ay sürmesi öngörülmektedir.

Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi

Bu çalışmaya gönüllü olmaya karar vererseniz bu gönüllü bilgilendirilmiş onay formunu imzalamanız gerekecektir. Sadece kendi rızanız ile hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, tedaviniz esnasında doktor kontrolünde alınacak 7-10 cc.'lik kan örneğiniz ile bu bilimsel çalışmaya katılmış olacaksınız. Kan alma sırasında kan alınan bölgede acı, morarma, kanama ya da diğer rahatsızlıklar meydana gelebilir, fakat bu güçlüklerin en aza indirilmesi için önlemler alınacaktır. Sizden ayrıca araştırmaya yardımcı olacak bazı kişisel bilgileriniz (yaş, meslek, sigara kullanımı vs.) istenebilir. Etik kurullar inceleme amacıyla medikal kayıtlardaki medikal kişisel bilgilerinize ve bu çalışmadan elde edilen bilgilere erişebilirler. Medikal bilgilerinize erişim çalışma için toplanan bilgilerle sınırlı olacaktır. Bu çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılarda veya yayınlarda sunulabilir, ancak bu sunumlarda kimliğiniz açıklanmayacaktır. Ayrıca sizden araştırmayla ilgili olarak herhangi bir maddi talepte bulunulmayacak ve size de herhangi bir ücret

ödenmeyecektir. Ayrıca bu araştırmaya karar verdiğiniz takdirde ileriye dönük olarak hastalığınız hakkında elde edilecek bilgilerle bilim dünyasına konuyla ilgili olarak önemli derecede katkı sağlayacağınız kesindir. Bu çalışmanın 250 gönüllü ile gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Gönüllü olmaya karar verdiğiniz ve bu bilgilendirilmiş gönüllü onay ve rıza formunu imzaladığınız takdirde yukarıda yazılanları okuyup kabul ettiğinizi ve hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın ailenizin bilgisi dahilinde sadece kendi rızanız ile karar verdiğinizi onaylamış olacaksınız. Herhangi bir soru ya da sorunuz olduğu takdirde ilgili Mukaddes AVŞAR SARAL'A 0212 414 24 34 / 34186 no'lu telefondan ulaşabilirsiniz.



GÖNÜLLÜ ONAY FORMU**İmza ve ulaşım bilgileri**

Gönüllüye (hastaya) araştırmadan önce verilmesi gereken bilgiler tarafıma sözlü ve yazılı olarak aktarıldı. Bu koşullarda söz konusu çalışmaya kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Çalışma için alınan materyalimin ilerideki çalışmalarda da kullanılmasını

EVET ☐ kabul ediyorum.

HAYIR ☐ kabul etmiyorum.

Hastanın/Katılımcının:

Adı Soyadı:

Telefonu:

Adresi:

İmza:

Açıklamaları Yapan Doktorun:

Adı Soyadı:

Telefonu:

Adresi:

İmza:

Tanıklık Eden Görevlinin:

Adı Soyadı:

Telefonu:

Adresi:

İmza:

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 238

Konu: Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK hk.

Tarih : 19.02.2018

Sayın Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK
Onkoloji Enstitüsü

İlgi: Onkoloji Enstitüsünün 05/02/2018 gün ve 47695 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Msc. Bio. Mukaddes Avşar SARALI' nin yürüteceği 2018/190 dosya numaralı "Over Kanseri Hastalarda miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638'in İfade Düzeylerinin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 09/02/2018 tarih ve 03 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Over Kanserli Hastalarda miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638'in İfade Düzeylerinin Araştırılması"		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	■		Türkçe ■ İngilizce □ Diğer □
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■		Türkçe ■ İngilizce □ Diğer □
	OLGU RAPOR FORMU	□		Türkçe □ İngilizce □ Diğer □
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	□	Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	□		
	SİGORTA	□		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	□		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	□		
	İLAN	□		
	YILLIK BİLDİRİM	□		
	SONUÇ RAPORU	□		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	□		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:03	Tarih: 09/02/2018		
	İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Kanseri Genetiği Bilim Dalında görevli Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK' in sorumluluğunda ve Msc. Bio. Mukaddes Avşar SARALI' nin yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Over Kanserli Hastalarda miR-16-5p, miR-17-5p, miR-638"in İfade Düzeylerinin Araştırılması"			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kanser Genetiği			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Kanser Genetiği Bilim Dalı			
DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer ise belirtiniz :			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ■	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ■	ULUSLAR ARASI ☐

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

OVER KANSERLİ HASTALARDA MİR-16-5P, MİR-17-5P, MİR-638'İN İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 4	% 3	% 10
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 6
2	Hromadnikova, Ilona, Katerina Kotlabova, Lucie Hymanova, and Ladislav Krofta. "Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood", Thrombosis Research, 2016. Yayın	% 1
3	digital.csic.es İnternet Kaynağı	<% 1
4	tpog.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
6	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mukaddes	Soyadı	Avşar Saral
Doğ.Yeri	Bakırköy	Doğ.Tar.	1988
Email	mukaddesavsar@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi, Sağ. Bil. Enstitüsü. Temel Onkoloji ABD, Onkolojik Biyoloji ve İmmünoloji Programı	2013
Lisans	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2009
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğr. Gör.	İstanbul Aydın Üniversitesi	2013-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(YÖKDİL) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		70

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	70,5	72,4	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

“The expression level of fibulin-2 in the circulating RNA (ctRNA) of epithelial tumor cells of peripheral blood and tumor tissue of patients with metastatic lung cancer”

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

