

**ESKİŞEHİR
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK
ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**

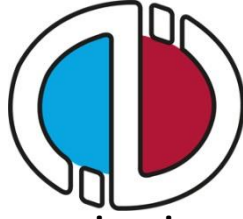
**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı**

**PROSTAT KANSERİ, BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİ
VE KRONİK PROSTATİTLİ HASTALARDA BAZI
MİKRORNA'LARIN DOLAŞIMDAKİ DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Yakup DÜLGEROĞLU
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğretim Üyesi Onur EROĞLU**

**BİLECİK – 2019
Ref.No: 10233794**



**ESKİŞEHİR
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK
ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**

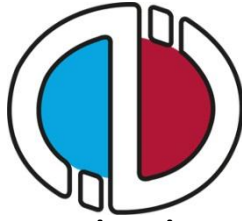
**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı**

**PROSTAT KANSERİ, BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİ
VE KRONİK PROSTATİTLİ HASTALARDA BAZI
MİKRORNA'LARIN DOLAŞIMDAKİ DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Yakup DÜLGEROĞLU
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğretim Üyesi Onur EROĞLU**

BİLECİK – 2019



ESKİŞEHİR
ANADOLU UNIVERSITY



BİLECİK
SEYH EDEBALI UNIVERSITY

Graduate School of Sciences
Molecular Biology and Genetics Department

**INVESTIGATION OF CIRCULATING LEVELS OF SOME
MICRORNAS IN PATIENTS WITH BENIGN PROSTATIC
HYPERPLASIA, CHRONIC PROSTATITIS AND
PROSTATE CANCER**

Yakup DULGEROGLU
Doctoral Thesis

Thesis Advisor
Dr. Teaching Staff Onur EROGLU

BİLECİK – 2019



BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA
JÜRİ ONAY FORMU

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25/12/2018 tarih ve 75 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 15/01/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Yakup DÜLGEROĞLU'nun, "Prostat Kanseri, Benign Prostat Hiperplazisi Ve Kronik Prostatitli Hastalarda Bazı MikroRNA'ların Dolaşımdaki Düzeylerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE (TEZ DANIŞMANI) : Dr. Öğr. Üyesi Onur EROĞLU

ÜYE : Prof. Dr. Sevilhan ARTAN

ÜYE : Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

ÜYE : Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS

ÜYE : Dr. Öğr. Üyesi Sema LEBLEBİCİ

ANABİLİM DALI / BÖLÜM BAŞKANI: Doç. Dr. Dilek ÜNAL

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 06/02/2019 tarih ve9...../.....22..... sayılı kararı.

İMZA/ MÜHÜR

Prof. Dr. Cihan DARCAN
Müdür

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her konuda yol gösterici ve yardımcı olan Danışman Hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Onur EROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün değerli Hocaları olan Sayın Doç. Dr. Cihan DARCAN ve Sayın Dr. Öğretim Üyesi İsmail POYRAZ'a doktora eğitimime yaptıkları kıymetli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, kendilerinden ders aldığım ve eğitimime önemli katkıları olan Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi'nin değerli Hocaları Sayın Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU, Sayın Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ ve Sayın Doç. Dr. Emel ERGENE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün çalışan ve güler yüzlü asistanları ve doktora öğrencileri olan Esin GÜVENİR ÇELİK, Hacer KAYA ve Merve ÇELEN'e değerli arkadaşlıkları ve yardımseverlikleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmasının laboratuvar aşaması sırasında oldukça faydalı yardımları için Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Yüksek Lisans Öğrencilerine ayrı ayrı teşekkür ederim.

Bugüne kadarki tüm eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen kıymetli Annem Aysel ve Babam Ahmet DÜLGEROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Bu çalışma ile prostat kanserinde tanısal değeri olduğuna yönelik bilimsel literatürde çalışmalar bulunan bazı mikroRNA'ların prostat kanseri (PKa) tanısındaki performansının ve kronik prostatitin (KP), benign prostat hiperplazisi (BPH) ve PKa ayırımında mikroRNA'ların tanısal performansına olan etkilerinin değerlendirmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma kapsamında miR-375, -141-3p, -93-5p, -125b-5p, 30c-5p, -26b-5p, -221-3p, -222-3p, -223-3p, 181-a2-3p, -331-3p ve let-7c-5p olmak üzere toplam 12 mikroRNA'nın PKa, BPH ve KP hasta serumlarındaki seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu çalışma, Agilent Aria MX qRT-PCR cihazında, Qiagen marka kitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm aşamalar ticari kit prosedürleri doğrultusunda tamamlanmıştır.

Bulgular: Yapılan analizde, kanser olmayan gruba kıyasla PKa grubunda miR-375, -125b-5p, -30c-5p, -26b-5p, -223-3p ve let-7c-5p serum seviyelerinin downregüle olduğu görülmüş ve bu miRNA'ların kanser olmayan gruptan PKa grubunun ayırımındaki eğri altında kalan alan (AUC) değerleri sırasıyla; 0.781, 0.782, 0.762, 0.874, 0.817 ve 0.845 olarak hesaplanmıştır. BPH'tan PKa'nın ayırımında AUC değerleri miR-223-3p için 0.938'e, miR-26b-5p için 0.926'ya ve let-7c-5p için 0.888'e yükselmektedir. miR-375 ve miR-26b-5p kombinasyonunun kanser olmayan hasta grubundan PKa grubunun ayırımında AUC değeri 0.891, BPH'tan PKa'nın ayırımında AUC değeri 0.944 olarak hesaplanmıştır.

Tartışma ve Sonuç: Çalışmamızda düzeyleri ölçülen 12 mikroRNA'nın 6 tanesinin PKa'da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde downregüle olduğu görülmüştür. Bu mikroRNA'ların PKa'nın benign prostat hastalıklarından ayırımında tek tek ya da kombine olarak güçlü birer biyobelirteç adayı oldukları değerlendirilmiştir. Ayrıca, KP grubu analize dahil edilmeden, sadece BPH ve PKa'nın ayırımında mikroRNA'ların daha yüksek spesifisite ve sensitivite değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Böylelikle, prostatın benign hastalıkları ile PKa ayırımında mikroRNA'ların tanısal performanslarının değerlendirilmesinde KP'nin önemli bir interferans faktörü olabileceği ilk defa gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: MikroRNA; Prostat Kanseri; Prostatit; Benign Prostat Hiperplazisi

ABSTRACT

Objective: In this study, the objective was to evaluate the diagnostic performance of some miRNAs, which were shown to have a diagnostic value for prostate cancer (PCa), and the effect of chronic prostatitis (CP) to diagnostic performance of microRNAs in distinguishing benign prostatic hyperplasia (BPH) and PCa.

Materials and Methods: Serum levels of 12 microRNAs (miRNAs) including miR-375, -141-3p, -93-5p, -125b-5p, 30c-5p, -26b-5p, -221-3p, -222-3p, -223-3p, 181-a2-3p, -331-3p ve let-7c-5p were investigated in serums of patients with BPH, CP, and PCa. Measurements were performed using Agilent Aria MX qRT-PCR device and Qiagen kits by following the kit procedure.

Results: In the analysis, serum levels of miR-375, -125b-5p, -30c-5p, -26b-5p, -223-3p and let-7c-5p were downregulated in PCa group compared with non-cancer group and area under the curve (AUC) values of these miRNAs in discriminating PCa group from non-cancer group were calculated as 0.781, 0.782, 0.762, 0.874, 0.817 and 0.845, respectively. AUC values in discriminating PCa group from BPH group increased to 0.938 for miR-223-3p, 0.926 for miR-26b-5p and 0.888 for let-7c-5p. AUC value of the combination of miR-375 and miR-26b-5p in discriminating PCa group from non-cancer group was 0.891, AUC value of these two miRNAs in discriminating PCa group from BPH group was 0.944.

Discussion and Conclusion: In our study, 12 miRNAs were studied and 6 of these miRNAs were found to be significantly downregulated in PCa. These miRNAs were considered as biomarker candidates as these miRNAs, individually or combined, could be used to discriminate PCa and benign diseases of prostate. Furthermore, it was seen that miRNAs had a higher specificity and sensitivity in discriminating only BPH and PCa groups without including chronic prostatitis group in statistical analyse. Thus, it was demonstrated in this study that in discriminating benign conditions of prostate and prostate cancer, chronic prostatitis might be an important interference factor in the evaluation of diagnostic performance of miRNAs.

Keywords: microRNA, Prostate Cancer, Prostatitis, Benign Prostatic Hyperplasia

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	
ÖZET.....	I
ABSTRACT	II
İÇİNDEKİLER	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.	V
TABLolar DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Prostat Bezinin Anatomik ve Histolojik Yapısı	4
2.2. Prostat Bezinin Salgıları ve Fizyolojik Görevleri	6
2.2.1. Prostatik sıvıda bulunan protein olmayan bileşenler	6
2.2.2. Prostatik sıvıda bulunan protein yapıllı bileşenler	7
2.3. Prostat Fonksiyonlarının Düzenlenmesi.....	9
2.4. Prostatitler	11
2.5. Benign Prostat Hiperplazisi.....	13
2.5.1. Benign prostat hiperplazisinin epidemiyolojisi	14
2.5.2. Benign prostat hiperplazisinin patofizyolojisi	14
2.5.3. Benign prostat hiperplazisinin tanısı	17
2.6. Prostat Kanseri.....	18
2.6.1. Prostat kanserinin epidemiyolojisi.....	18
2.6.2. Prostat kanseri için risk faktörleri.....	19
2.6.3. Prostat kanserinin tanısı.....	25
2.6.4. Prostat kanseri taramalarında PSA'nın yeri ve yaşanan sorunlar	28
2.6.5. Prostat kanseri tanısında PSA kökenli biyobelirteçler.....	30
2.6.6. Prostat kanseri tanısında PSA dışı biyobelirteçler.....	32
2.7. MikroRNA'lar.....	34
2.7.1. MikroRNA genlerinin genomik yerleşimi.....	35
2.7.2. MikroRNA'ların biyogenezi ve fonksiyonu	37
2.7.3. MikroRNA'lar ve kanser.....	41

2.7.4. Dolaşımdaki miRNA'lar, biyobelirteç olma özellikleri ve tespit yöntemleri	43
2.7.5. MikroRNA'lar ve prostat kanseri.....	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. Çalışma Örneklerinin Elde Edilmesi.....	54
3.2. Hastalardan Kan Örneklerinin Toplanması ve Biyopsi Yapılması	54
3.3. Total PSA Ölçümlerinin Yapılması	55
3.4. RNA İzolasyonu	55
3.5. Reverse Transkripsiyon ve cDNA Sentezi	57
3.6. miRNA'ların Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR ile Amplifikasyonu.....	58
3.7. İstatistiksel Analiz	59
4. BULGULAR	61
4.1. Hasta Gruplarının Tanımlayıcı İstatistik Verileri.....	61
4.2. PSA Ve Yaş Değişkeninin Gruplar Arası Farklılığının İncelenmesi	62
4.3. Kanser Ve Kanser Olmayan Hasta Grupları Arasında miRNA Serum Seviyelerinin Gruplar Arası Farklılığının İncelenmesi	63
4.4. miRNA Ölçüm Sonuçlarında Alt Gruplar Arası Farklılığın Değerlendirilmesi	66
4.5. miRNA Ölçüm Sonuçlarının Kanser Alt Grupları Arasındaki Farklılığı Ve Gleason Skoru İle İlişkisi	69
4.6. Prostat Kanserinin Ayırıcı Tanısında, Çalışma Kapsamında Düzeyleri Ölçülen miRNA'ların Tanısal Yeterliliğinin Hesaplanması.....	69
5.TARTIŞMA	76
6.SONUÇ	92
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ.....	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C : Santigrad derece

Δ : Delta

α : Alfa

β : Beta

~ : Yaklaşık olarak

Kısaltmalar

BPH : Benign prostat hiperplazisi

PKa: Prostat kanseri

KP: Kronik prostatit

BPO : Benign prostatik obstrüksiyon

TRUS : Transrektal ultrasonografi

KP/KPAS : Kronik prostatit/kronik pelvik ağrı sendromu

AÜSS : Alt üriner sistem semptomları

EUA : Avrupa Üroloji Birliği

AUA : Amerikan Üroloji Birliği

miRNA: MikroRNA

ROC : Receiver operating curve

AUC: Eğri altında kalan alan

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 2.1. Prostatitlerin sınıflandırılması	11
Tablo 2.2. Ailesinde prostat kanseri olan kişinin rölatif riski ve güven aralığı değerleri	20
Tablo 2.3. Prostat kanserinde rolü olan bazı genler ve uğradıkları değişiklikler	23
Tablo 2.4. Gleason derecelendirme sistemi.....	26
Tablo 2.5. Prostat kanserinde TNM evreleme sistemi.....	27
Tablo 2.6. Prostat kanserinin tanısı ve tedavi takibi için geliştirilen bazı kombine biyobelirteçler.....	34
Tablo 2.7. Prostat kanserinin ayırıcı tanısında dolaşımda tespit edilen miRNA'lar	50
Tablo 3.1. cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri ve oranları	57
Tablo 3.2. PCR aşamasında kullanılan reaksiyon bileşenleri ve oranları	58
Tablo 3.3. miRNA analizi için PCR reaksiyonu aşamaları	59
Tablo 4.1. Çalışmaya katılan gönüllülerin yaş (yıl) ve PSA (ng/mL) değerleri.....	61
Tablo 4.2. PSA değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.....	63
Tablo 4.3. Kanser ve kanser olmayan hasta gruplarında serum miRNA seviyelerindeki değişim	64
Tablo 4.4. Alt gruplar arasındaki miRNA değerleri için varyans analizi sonuçları	66
Tablo 4.5. Alt gruplar arasında serum miRNA seviyelerinin fold change olarak değişimi	67
Tablo 4.6. Kanserli olmayan hasta grubu ile kanserli hasta grubunun ayırımında miRNA'ların tanısal yeterlilikleri	70
Tablo 4.7. Alt grupların birbirinden ayırımında miRNA'ların tanısal yeterliliği	72
Tablo 4.8. miRNA'ların kombinasyonunun gruplar arası tanısal yeterliliği	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Prostat bezinin zonal anatomisi	4
Şekil 2.2. Prostat bezinin hücresel yapısı.....	5
Şekil 2.3. PSA sentezinin basamakları.....	8
Şekil 2.4. MikroRNA genlerinin genomik organizasyonu	37
Şekil 2.5. MikroRNA'ların karakteristik yapısının şematik olarak gösterimi.....	38
Şekil 2.6. MikroRNA'ların biyogenezi ve etki mekanizması	39
Şekil 2.7. Dolaşımdaki miRNA'ların kaynakları	43
Şekil 4.1. PSA ortancalarının alt gruplara göre dağılımı	62
Şekil 4.2. Kanseri olmayan ve kanser gruplarında miRNA serum seviyeleri.....	65
Şekil 4.3. Gruplar arası miRNA seviyelerinin boksör torbası grafiği ile gösterimi...	68
Şekil 4.4A. Kanseri olmayan gruba kıyasla prostat kanserinin ayırımında miRNA'ların ROC eğrileri.....	71
Şekil 4.4B. BPH'a kıyasla kronik prostatit ve prostat kanseri grubunun ayırımında miRNA'ların ROC eğrileri	71
Şekil 4.5A. BPH grubundan kronik prostatit grubunun ayırımındaki ROC eğrileri.....	73
Şekil 4.5B. BPH grubundan kanser grubunun ayırımındaki ROC eğrileri.....	73
Şekil 4.5C. Kronik prostatit grubundan kanser grubunun ayırımındaki ROC eğrileri ..	73
Şekil 4.6A. miRNA kombinasyonunun kanseri olmayan hastalar ile kanserli hastaların ayırımındaki ROC eğrisi	75
Şekil 4.6B. miRNA kombinasyonunun BPH'lı hastalar ile kanserli hastaların ayırımındaki ROC eğrisi	75
Şekil 4.6C. miRNA kombinasyonunun BPH'lı hastalar ile kanserli ve kronik prostatitli hastalardan oluşan grubun ayırımındaki ROC eğrisi	75

1. GİRİŞ

Prostat kanseri (PKa) erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yapılan bir hesaplama göre, 2012 yılında dünya genelinde 1.095.000 kişi PKa tanısı almıştır. Bu rakam aynı yıl kanser tanısı alan erkeklerin %15'ni oluşturmaktadır. PKa tanısı alan olguların %70'i (759.00 kişi) daha gelişmiş bölgelerde yaşayan erkeklerden oluşmaktadır. Dünya genelinde 2012 yılında PKa'dan ölenlerin sayısı 307.000 kişi olarak bildirilmiştir. Buna göre PKa, erkeklerde kanser kaynaklı ölümlerde beşinci sırada yer almaktadır (GLOBOCAN, 2012).

Benign prostat hiperplazisi (BPH) ve prostatitler erkeklerde sık görülen diğer prostat hastalıklarıdır. BPH prevalansı yaşla birlikte giderek artmaktadır. Erkeklerde 40'lı yaşlarda %8 olan BPH prevalansı 5. dekatta %50'lere, 9. dekatta ise %80'lere ulaşmaktadır. Prostatitler ise özellikle 50 yaş altı erkeklerde üriner sistem şikayetlerinin daha sık bir sebebidir. Yapılan çalışmalarda erkeklerde prostatit prevalansının %2.2 ile %9.7 arasında değiştiği sonuçlar elde edilmiştir. Dahası anamnez sorgulamalarında geçirilmiş bir prostatite ilişkin semptomlar bildiren erkeklerde, BPH ve PKa görülme riski artmaktadır (Lim, 2017; Krieger, vd., 2008).

Dünya genelindeki PKa insidansında farklı bölgeler arasında yirmi beş katlık bir değişim olduğu bildirilmiştir. Bu farkın ana nedeni ise PKa taramalarında gelişmiş ülkelerde yaygın olarak kullanılan prostat spesifik antijen (PSA) testi ile ilişkilendirilmiştir. PSA testinin PKa taramalarında kullanılması konusunda hala tartışmalar devam etmekle birlikte, günümüzde bu amaçla kullanılan en yaygın test olarak karşımıza çıkmaktadır (GLOBOCAN, 2012).

PSA testi PKa taramalarında yaygın olarak kullanılsa da önemli kısıtlılıklara sahiptir. Öncelikle PSA testinin kesin tanı koyduruculuğu olmayıp, kanser tanısı için biyopsi ile doğrulama gerektirmektedir. Her ne kadar prostata spesifik olsa da PKa'ya spesifik değildir ve bir çok farklı durumda düzeyleri yükselebilmektedir. Bunlar arasında BPH ve prostatitler önde gelen nedenlerdendir. PSA ile ilgili diğer önemli bir problem, yanlış pozitif ve negatif sonuçlardır. PSA testinin yanlış pozitif oranı %60 civarında iken, yanlış negatif oranı %15'lere varmaktadır ki bunların %2'si agresif prostat kanserleridir. Yanlış pozitif sonuçlar hastaların gereksiz strese girmesine neden olmakla birlikte, biyopsi yapılmasına neden olarak hastanın invaziv bir işlemin

risklerine maruz kalmasına ve ayrıca ek maliyetlere neden olmaktadır. Yanlış negatif sonuçlar ise hastanın daha sonraki bir dönemde ileri evre bir PKa vakası olarak tanı almasına ve sonuçta tedavi şansının azalmasına ya da ortadan kalkmasına sebebiyet vermektedir (Bailey ve Brewster, 2011).

PKa'nın tanısında serum total PSA düzeyleri ölçümünün tanısal yeterliliğinin sınırlı olması nedeniyle, PKa tanısı için yeni biyobelirteç arayışları uzun yıllardır devam etmektedir. Bu kapsamda PSA kökenli fPSA, fPSA/totalPSA oranı, pro-PSA gibi biyobelirteçlerin yanı sıra prostat kanser antijen 3 (PCA3), alfa-metilaçil-KoA-rasemaz (AMACR), dolaşımdaki tümör hücrelerinin tespiti gibi PSA dışı biyobelirteçlerin geliştirilmesi yönünde de çalışmalar bulunmaktadır (Prensner, vd., 2012). 2000'li yılların başından itibaren kanserle ilişkileri kurulan mikroRNA'lar da PKa tanısında biyobelirteç adayları arasında yer almaktadır.

MikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık 20-22 nükleotid uzunluğunda, genlerin düzenlenmesinde post-transkripsiyonel aşamada görev alan, kodlanmayan RNA molekülleridir. MiRNA'lar nükleusta sentezlendikten sonra sitoplazmaya aktararak, mRNA'ya bağlanıp, eşleşmenin düzeyine göre translasyonun baskılanması ya da mRNA'nın parçalanması yoluyla protein sentezini ve dolayısıyla gen ifadesini düzenleyen RNA molekülleridir (Peng ve Croce, 2016).

MiRNA'ların kanserle ilişkisi ilk olarak Calin vd. tarafından 2002 yılında KLL hastalarında miR-15a ve miR-16-1'in down regülasyonunun gösterilmesiyle ortaya konulmuştur (Calin, vd.,2002). Bu tarihten itibaren dokular, hücre hatları ve deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda, çeşitli kanser türlerinde miRNA'ların rolü ortaya konulmaya çalışılmıştır (Jansson ve Lund, 2012).

MiRNA'ların diagnostik amaçla kullanımlarına yönelik kanserli hasta gruplarında dolaşımdaki miRNA'ların tespit edildiği ilk çalışmalar 2008 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda miRNA'ların kanserli hasta serumlarında düzeylerinin değiştiği gösterilmiştir. Dahası miRNA'ların çoklu dondurma-çözdürme döngüsüne dayanıklı olduğu, oda ısısında 24 saat bekletildikten sonra bile serumdaki düzeylerinin değişmediği, RNaz ve DNaz'lara dirençli olduğu yönünde bulgular edinilmiştir. Böylelikle uygun bir biyobelirteçte olması gereken özelliklerin bir çoğunun mikroRNA'larda bulunduğu ve dolayısıyla kanserde tanı, tedavinin takibi ve prognoz tahmini amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (Lawrie, vd., 2008; Mitchell, vd., 2008).

PKa ile miRNA'ların ilişkisine yönelik yapılan çalışmalarda; miR-21, miR-141, miR-125b, miR-375, miR-221, miR-222, miR-34 ailesi gibi bir çok miRNA türünün normal dokulara kıyasla PKa'lı hasta dokularında düzeylerinin değiştiği gösterilmiştir. Aynı şekilde dolaşımda seviyeleri ölçülen miRNA düzeylerinin de normal kontrol grubu ya da BPH'a kıyasla PKa hastalarında upregüle ya da downregüle oldukları gösterilmiştir (Vanacore, vd., 2017).

Çalışmamızda BPH, kronik prostatit (KP) ve PKa'lı hasta serumlarında literatürde PKa ile ilişkisine yönelik çalışmalar bulunan miRNA'lardan miR-375, miR-93-5p, miR-125b-5p, miR-30c-5p, let-7c-5p, miR-26b-5p, miR-223-3p, miR-181-a2-5p, miR-141-3p, miR-221-3p, miR-222-3p ve miR-331-3p düzeylerinin tanısal yeterliliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamız, KP'li hasta grubunun PKa tanısında miRNA'ların tanısal yeterliliğini etkileyip etkilemediğinin de araştırıldığı özgün bir çalışma mahiyetindedir.

Çalışma kapsamında miRNA'ların serumdaki düzeyleri, SYBR Green yöntemine dayanan kitler (Qiagen) kullanılarak, qRT-PCR (Quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction) cihazı ile belirlenmiştir. MiRNA'lar için ölçülen Ct (threshold cycle) değerlerinin normalizasyonunda ce-miR-39 kullanılmıştır. Bu amaçla RNA izolasyonu aşamasında lizatın içerisine ce-miR-39 mimic ilave edilmiş ve bundan sonra RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR aşamaları ticari firmanın protokolleri doğrultusunda tamamlanmıştır.

Çalışmanın istatistiki hesaplamaları PASW statistic 18 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası farklılıklar t testi ve varyans analizi ile belirlenmiştir. Tanısal yeterliliğin belirlenmesinde ROC (Receiver Operating Characteristic) analizinden faydalanılmış, miRNA'ların kombinasyonlarının tanısal yeterlilik değerlendirilmesi lojistik regresyon analizi kullanılarak yapılmıştır. Çalışma kapsamındaki miRNA'ların PKa tanısındaki spesifisitesi, sensitivitesi, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif değeri gibi tanısal performansı gösteren parametreler hesaplanmıştır. Tüm istatistiki hesaplamalarda anlamlılık için p değeri ≤ 0.05 olarak kabul edilmiştir.

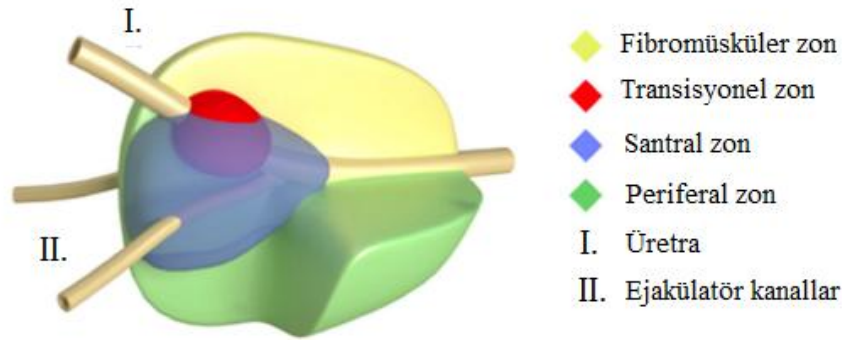
Bu tez çalışması, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi tarafından 2017-01.BSEU.25-01 sayı numarası ile maddi olarak desteklenmiştir. Ayrıca çalışma için Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 80558721/G-57 referans numarası ile onay alınmıştır.

2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Prostat Bezinin Anatomik ve Histolojik Yapısı

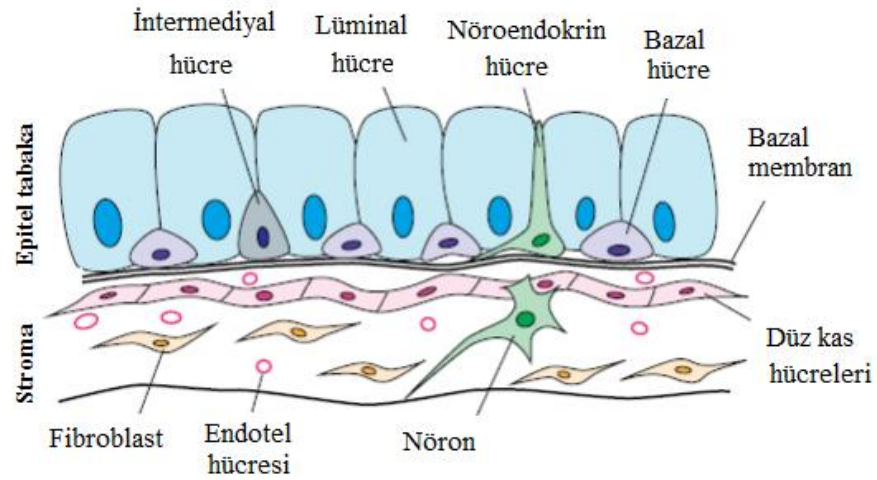
Prostat bezi mesanenin hemen altında yer alan, yaklaşık 18 g ağırlığında, 4 cm uzunluğunda, 3 cm genişliğinde ve 2 cm derinliğinde bir organdır. Prostat bezi içerisinden, üretranın yaklaşık 2,5 cm uzunluğundaki posterior üretra ya da prostatik üretra adı verilen kısmı geçer. Prostat bezinin %70'ini glandüler yapılar, %30'nu ise stromal yapılar oluşturur. Prostat bezinin glandüler kısmında salgılanan salgılar, yaklaşık 25 adet kanal ile prostatik üretraya boşalır. Fibromüsküler stromanın periferde yoğunlaşmasıyla prostat kapsülü oluşur (Berman, vd., 2012).

Prostatın dokusunun prostatik üretra ile ilişkisine dayanan, prostatın zonal anatomisi McNeal tarafından geliştirilmiştir. Bu tanımlamaya göre prostat bezi periferik zon, transisyonel zon, santral zon, anterior fibromüsküler stroma ve preprostatik sfinkterik zondan meydana gelmektedir. Prostat kanserlerinin %70'i periferik zondan, %10'u transisyonel zondan ve %10'u da santral zondan köken almaktadır (McNeal, 1981; Berman, vd., 2012).



Şekil 2.1. Prostat bezinin zonal anatomisi (Theophilou, vd., 2015).

Prostat dokusu epitel hücreleri ve stromal hücreler olmak üzere iki temel hücresel yapıdan oluşmaktadır. Epitel hücreleri arasında lüminal epitel hücreler, nöroendokrin hücreler, bazal hücreler ve intermediyal hücreler bulunmaktadır. Stromal yapıda ise düz kas hücreleri, fibroblastlar, vasküler ve nöral komponentler yer almaktadır (Toivanen ve Shen, 2017).



Şekil 2.2. Prostat bezinin hücresel yapısı (Toivanen ve Shen, 2017).

Prostat epitel hücreleri bir araya gelerek prostat salgılarının biriktiği prostatik asinüsleri oluşturmakta ve bu asinüsler prostatik üretraya açılmaktadır. Prostatın epitel yapısında bulunan lüminal epitel hücreleri PSA, asit fosfataz, androjen reseptörü ve lösin amino peptidaz salgılamaktadır. Nöroendokrin hücrelerde PSA ve asit fosfataz bulunmaz. Bu hücreler kromogranin A, nöron spesifik enolaz, sinaptofizin gibi molekülleri sentezlerler. Nöroendokrin hücrelerin otokrin ve parakrin uyarımlarla prostat epitelinin büyüme ve farklılaşmasında etkili olduğu bildirilmektedir. Bazal hücreler daha az farklılaşmış olmaları nedeniyle prostat epitel kök hücrelerinin kaynağı olarak düşünülmektedir. İntermediyal hücreler ise bazal ve lüminal hücre arasında bir geçiş formunu teşkil etmektedir. Yapılan çalışmalarda PKa hücreleri tarafından bolca eksprese edilen prostat kök hücre antijeninin (PSCA) intermediyal hücrelerce de eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu bulgu PKa hücrelerinin intermediyal hücrelerden köken alabileceği fikrini desteklemiştir (Berman, vd., 2012; Tran vd, 2002).

Ekstrasellüler matriks olarak da isimlendirilen prostatın stromal yapısı düz kas hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri ve nöronlardan oluşan hücresel bileşenlerin yanı sıra kollajen, elastik fibriller, glikozaminoglikanlar, glikolipidler gibi bağdokusu bileşenlerinden meydana gelmektedir. Epitel hücreleri ile ekstrasellüler matriksin etkileşimi, normal biyolojik süreçlerde olduğu gibi kanser gibi patolojik süreçlerde de büyük önem arz etmektedir (Kruslin, vd., 2015).

2.2. Prostat Bezinin Salgıları ve Fizyolojik Görevleri

Prostat bezi asit yapılı servikal mukus ve vajinal sekresyonlardan spermatozoayı koruyan, yaklaşık 7.2 ile 8 arasında pH değerine sahip olan alkali yapılı bir salgı üretir. Prostat salgısı ince yapılı ve sütsü kıvamlı bir salgıdır. Prostat salgısı, protein içeriği düşük olsa da proteolitik enzimler ve elektrolitler gibi çok farklı bileşenleri içerir. Prostat bezinin yanı sıra seminal vezikül ve bulboüretral bezleri de içeren aksesuar salgı bezlerinin salgıları düzenli bir şekilde ejakülata aktarılır. Prostat salgısının ana bileşenlerini sitrat ve hidrolitik enzimler oluşturur. Seminal vezikülün salgısının içeriğinde bulunan fibrinojen fibrine dönüşerek, ejakülasyon sonrası dişi üreme sisteminin içerisinde semenin koagüle olmasını sağlar. Ancak, semenin içerisinde spermin hızlı hareket edebilmesi için pıhtının çözülmesi gerekir. Prostat salgısı içerisinde bulunan fibrinolizin, fibrini parçalayarak semenin çözülmesini, bir diğer ifade ile likefaksiyonunu sağlar. Semen 5-15 dk gibi bir sürede dişi üreme sistemi içerisinde likefiye olur ve böylece spermler, serviks boyunca hedeflerine doğru hareket için gerekli yeteneği kazanırlar (Flint, 2015).

2.2.1. Prostatik sıvıda bulunan protein olmayan bileşenler

Prostatik sıvıdaki sitrat konsantrasyonu plazma sitrat konsantrasyonuna kıyasla çok yüksek seviyelerdedir. Normal plazma sitrat konsantrasyonu 0.2 mM iken, prostatik sıvıda bu düzey 150-200 mM civarındadır. Sitrat prostat bezinin epitel hücresinde aspartat ve glukozdan sentezlenmektedir. Glukozun glikoliz yolağı ile piruvata parçalanır. Piruvat mitokondride asetil KoA'ya dönüşmekte ve oluşan asetil KoA ile aspartattan oluşan oksaloasetatın reaksiyona girmesi sitratı meydana getirmektedir. Sitrat daha sonra izositrata dönüştürülmektedir. Ancak diğer dokulardaki sitrat/izositrat oranı 33/1 iken, prostat dokusunda bu oran 10/1 şeklindedir. Bu durum ise testosteron ve prolaktin tarafından düzeyleri artırılan, ancak çinko tarafından inhibe edilen akonitaz enzimi ile açıklanmaktadır. Zira çinkonun vücutta en fazla bulunduğu yer prostat dokusudur. Çinko, prostat epitel hücresi içerisine çinko transport proteinleri (ZIP1, ZIP2, ZIP3) aracılığı ile girer. Çinko tarafında akonitaz enziminin inhibe edilmesi ile prostatik sıvıda oldukça yüksek düzeylerde bulunana sitrat, spermlerin yaşaması ve hareket edebilmesi için gerekli enerji kaynağı olarak da fonksiyon görmektedir (Kavanagh, 1994; Costello ve Franklin, 2006; Hennigar, vd., 2012).

Prostatik sıvıda bulunan protein olmayan bileşenler arasında kolesterol, lipitler, fosfolipitler de bulunur. Spermatozoaların en önemli enerji kaynağı olan fruktoz semende yüksek miktarda bulunsada asıl üretim yeri seminal veziküldür (Berman, vd., 2012).

Poliaminler iki ya da daha fazla sayıdaki amino grubu ile çeşitli uzunluklardaki karbon gruplarının birleşmesi ile oluşmakta olup, bir çok dokuda bulundukları gibi prostat dokusunda da bol miktarda bulunmaktadır. Hücre büyümesi ve farklılaşmasında görevleri vardır. Poliaminlere örnek olarak spermin, spermidin ve putresin verilebilir. Özellikle spermin, primer olarak prostat dokusunda sentez edilir ve vücutta en fazla bulunduğu doku prostattır (Lefevre, vd., 2011).

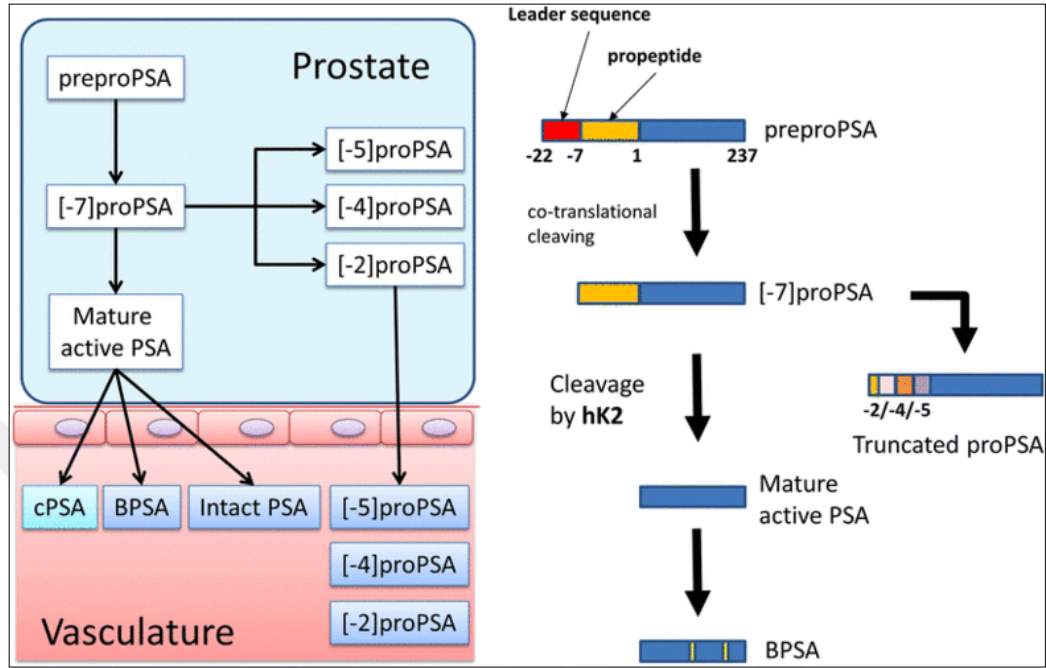
2.2.2. Prostatik sıvıda bulunan protein yapıli bileşenler

PSA 0.5-2.0 mL konsantrasyonu ile seminal sıvının majör proteindir. Doku kallikrein ailesinin üyesi olan PSA, androjen ile düzenlenen bir serin proteazdır. PSA, primer olarak prostatın duktal ve asiner epitelinde sentezlenir ve lümene sekrete edilir. Başlıca görevi semenin likefaksiyonu için semenogelin I ve semenogelin II'yi parçalamaktır. PSA, 19. kromozomun uzun kolunda 19q13.4 pozisyonunda kodlanmaktadır. PSA, 33 kDa ağırlığında, glikoprotein yapıli bir proteazdır. Human kallikrein 3 (hK3) olarak da isimlendirilmektedir (Akbayır ve Muşlu, 2016).

PSA geninin transkripsiyonu androjen reseptörü (AR) tarafından düzenlenir. AR bir steroid hormon reseptörüdür ve DNA'da bulunan ve "androjen reseptör responsive elements (AREs)" olarak adlandırılan spesifik diziye bağlanarak etki göstermektedir (Kim ve Coetzee, 2004).

PSA, 17 amino asitlik bir lider dizisi taşıyan preproPSA olarak sentezlenir. Daha sonra bu lider dizinin parçalanması ile 244 amino asitlik proPSA oluşur. ProPSA, prostat epitelinde sentezlenen human kallikrein 2 (hK2) tarafından N-terminal bölgesindeki 7 amino asitin kesilip çıkarılmasıyla 237 amino asitlik aktif PSA'ya dönüştürülmüş olur. ProPSA'da yer alan 7 aminoasitlik dizinin 5. ve 6. pozisyonları arasından kesilmesi ile [-2]proPSA oluşmaktadır. Ayrıca benzer mekanizmalar ile [-4]proPSA ya da [-5]proPSA formu da oluşabilmektedir. Her iki formda inaktiftir, ancak [-2]proPSA'nın hK2 ya da tripsin tarafından parçalanmaya dirençli olması nedeniyle dolaşımda daha stabil bir düzeyde bulunduğu bildirilmiştir. Dolaşımdaki aktif PSA'nın büyük çoğunluğu (%70-90) alfa-1-antikimotripsine bağlı halde bulunur. Az bir kısmı

ise alfa-2 makroglobulin ve alfa-1 antitripsine bağlıdır. Yaklaşık %10-30 civarındaki PSA ise serbest olarak dolaşımda bulunur. (Balk, vd., 2003).



Şekil 2.3. PSA sentezinin basamakları (Hatakeyama, vd., 2017).

Şekil 2.3.'te PSA sentezinin basamakları gösterilmiştir. Buna göre, dolaşımda serbest olarak bulunan PSA'nın, benign PSA (BPSA), intact PSA (iPSA) ve proPSA olmak üzere çeşitli formları vardır. Bağlı olan form ise aktif PSA'dır ve kompleks PSA (cPSA) olarak adlandırılır (Hatakeyama, vd., 2017).

Prostat dokusunda sentezlenen kallikreinler; KLK2, KLK3 (PSA), KLK4, KLK5, KLK11, KLK14, KLK15'tir. Bu kallikreinlerin tamamı 19q13.4 kromozom bölgesinde kodlanmaktadır. Kallikrein sentezi steroid hormonlar tarafından kontrol edilmektedir (Borgono, vd., 2004).

Prostatik asit fosfataz, prostat dokusunda diğer dokulara göre oldukça yüksek düzeyde bulunan bir diğer enzimdir. Asit fosfatazlar pH 4-6 arası fonksiyon görürler. Görevleri monofosfat esterlerini alkol ve inorganik fosfora hidrolize etmektir. Asit fosfataz aktivitesi prostat dokusunda diğer dokulara kıyasla 200 kat daha fazla bulunur ve ejakülattaki asit fosfataz prostat kaynaklıdır. Asit fosfatazın hücrel (cPACP) ve sekrete edilen (sPACP) olmak üzere iki formu bulunur. cPACP erkeklerde seksüel olgunluğun göstergesi kabul edilmektedir (Veeramani, vd., 2005).

Prostat salgısında yer alan diğer bileşenler arasında prostat spesifik membran antijeni (PMSA), prostat kök hücre antijeni (PSCA), prostat spesifik transglutaminaz (TGP), prostat spesifik protein 94 (PSP-94), protein c inhibitörü (PCI), laktat dehidrogenaz, lösin aminopeptidaz, transferrin, immünglobülinler ve çinko- α 2-glikoprotein yer almaktadır (Berman, vd., 2012).

2.3. Prostat Fonksiyonlarının Düzenlenmesi

Androjenler erkek üreme organlarının farklılaşmasında ve olgunlaşmasında görev alan steroid yapılı hormonlardır. Androjen üretimi hipotalamus, hipofiz ve gonadlar arasındaki aks ile yönetilir. Erkeklerde hipotalamustan pulsatil şekilde salgılanan gonadotropin salıverici hormon (GnRH), hipofizden lüteinleştirici hormon (LH) salınımına neden olur. LH ise testislerde bulunan leydig hücrelerinde testosteron üretimini uyarır. Testosteron 5 α -redüktaz enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla, daha güçlü bir androjen olan dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. Erkeklerde iki tip 5 α -redüktaz enzimi bulunur. 5 α -redüktaz tip I, deride, karaciğerde ve saç dokusunda bulunurken, tip II ise genital deri ve prostat dokusunda bulunur. Dolaşımda bulunan testosteronun %44'ü yüksek afinite ile seks hormon bağlayıcı globüline (SHBG) bağlı iken, %54'ü düşük afinite ile albümin bağlıdır. Testosteronun sadece %1-2 kadarı ise dolaşımda serbest formda bulunur (Ntais, vd., 2003).

DHT androjen reseptörüne (AR) testosterona kıyasla 5 kat daha yüksek afinite ile bağlanır. AR dinlenme durumunda sitoplazmada ısı-şok proteinleri (HSP) ile bağlı durumdadır. Androjenlerin androjen reseptörüne bağlanması ile ısı-şok proteinleri androjen reseptöründen ayrılır. Dimerize bir form alan AR, hücre çekirdeğine girer ve orada hedef genin promotor ve enhancer bölgelerinde bulunan androjen cevap elementine (AREs) bağlanır. Daha sonra bu komplekse ko-aktivatör ve ko-represör moleküllerin bağlanması ile hedef genin transkripsiyonu gerçekleştirilir. Prostat bezinde sentezlenen majör proteinler olan PSA ve prostatik asit fosfatazin üretimi, bahsedilen mekanizma ile androjenler tarafından düzenlenmektedir (Harris, vd., 2009).

Östrojenler prostat bezi üzerinde etkili hormonlardan bir diğeridir. Östrojenler, ya endokrin etki ile dolaylı olarak androjenler üzerinden ya da parakrin etki ile doğrudan prostat dokusunda etki gösterirler. Parakrin etki ile prostat dokusu üzerindeki etkileri östrojen reseptörleri alfa (ER α ve beta (ER β) üzerinden gerçekleşir. Prostat dokusunda östrojen reseptörleri stromal hücrelerde ve epitel hücrelerinde

bulunmaktadır. ER β 'nin aktivasyonu anti-proliferatif etki ortaya çıkararak, prostat dokusu üzerinde androjenlerin proliferatif etkisini dengeler. ER α 'nın aktivasyonu ise aşırı proliferasyon, inflamasyon ve pre-malign lezyonların oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Sharma, vd., 2017).

Prolaktin ve oksitosin prostat fonksiyonlarının düzenlenmesinde etkili olan hormonlardan ikisidir. Prolaktin esas olarak hipofiz kaynaklı bir hormon olsa da prostat dokusunda da lokal olarak üretildiği gösterilmiştir. Ayrıca prostat dokusunda prolaktin reseptörleri bulunmaktadır. Prolaktin prostat dokusunda aspartat aminotrasferaz, piruvat dehidrogenaz ve mitokondriyal akonitaz enzimlerinin aktivasyonu ile sitrat üretiminin uyarılmasını sağlar. Ayrıca prostat epitelі üzerine güçlü mitojenik etkiye sahiptir. Bu nedenle PKa'da da rolü olduğu üzerinde durulmaktadır. Oksitosin ise prostat epitel ve stromal hücreleri üzerine anti-proliferatif etkilidir. Bu etkisini androjenlerin lokal konsantrasyonunu düzenleyerek gerçekleştirir. Ayrıca prostatın müsküler tonusunu ve kontraktıl aktivitesini de artırmaktadır (Goffin, vd., 2011; Nicholson ve Whittington, 2007).

Hormonların yanı sıra prostat fonksiyonlarının düzenlenmesinde çeşitli büyüme faktörleri de görev almaktadır. İnsülin benzeri büyüme faktörleri prostatın stromal hücrelerinde androjen uyarısına cevap olarak üretilmekte ve parakrin etki ile prostat epitel hücreleri üzerinde proliferatif etki oluşturmaktadır. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α) aynı hücre yüzey reseptörü (EGF reseptörü) üzerinden etki gösteren yapısal ve fonksiyonel olarak ilişkili büyüme faktörleridir. EGF normal prostat büyümesinin en önemli aktivatörüdür ve androjenler tarafından pozitif yönde düzenlenir. Prostatik sıvıda da büyük miktarlarda bulunur. TGF- α ise esas olarak stromal hücrelerde sentezlenmesine rağmen, reseptörünün epitel hücrelerinde eksprese edilmesi nedeniyle, parakrin olarak epitel hücreleri üzerinde etki gösterir. Hem EGF hem de TGF- α 'nın upregülasyonu, prostat kasneri gelişimi ile ilişkilidir. TGF- β ailesi (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) TGF- α 'dan farklı olarak hem epitel hem de stromal hücrelerde üretilir fakat, reseptörü sadece stromal hücrelerde bulunur. TGF- β hücre proliferasyonunu inhibe edip apoptozisi artırarak, prostat büyümesini düzenler. (Sharma, vd., 2017).

2.4. Prostatitler

Prostatit, her yaştan ve ırktan erkeklerin yaklaşık %10-14'ünde görülen bir hastalıktır ve erkeklerin hayatlarının bir döneminde prostatit olma ihtimali %50 olarak tahmin edilmektedir. Tüm prostatit vakalarının etiyolojisinde ancak %5-10 oranında bir patojen etken olarak gösterilebilirken, klinik olarak prostatit tanısı alanların bir kısmında histopatolojik bulgular prostatit ile uyumlu olmamakta ya da histopatolojik bulguları prostatit ile uyumlu olanların bir kısmında hiç bir klinik yakınma olmamaktadır. Prostatitlerin tanı ve sınıflandırılması için dört tüp testi tanımlanmıştır. Buna göre hastadan ilk 10 mL'lik idrar birinci tüpe alınır. Hasta 200 mL kadar idrar yaptıktan sonra ikinci tüpe 10 mL idrar daha alınır. Hastaya yaklaşık bir dakika boyunca prostat masajı uygulandıktan sonra alınan prostat sekresyonu üçüncü tüpe konur ve en son 10 mL'lik idrar alınarak dördüncü tüpe konur. Bu sıralamada birinci tüp üretra; ikinci tüp mesane; üçüncü ve dördüncü tüpler ise prostatı ifade etmektedir (Erdemir, vd., 2007). Prostatitler, Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Prostatitlerin sınıflandırılması (Krieger, vd., 2008).

Prostatit Kategorisi	Tanımı
I. Akut Bakteriyel Prostatit	Prostatın akut enfeksiyonu
II. Kronik Bakteriyel Prostatit	Prostatın kronik bakteriyel enfeksiyonu
III. Kronik Pelvik Ağrı Sendromu	Üriner sistem enfeksiyonu olmaksızın kronik pelvik ağrı olması
A. İnflamatuvar	Prostat masajı sonrası idrar sedimentinde, semende ya da prostat salgısında aşikar lökosit bulunması
B. Non İnflamatuvar	Prostat masajı sonrası idrar sedimentinde, prostat salgısında ya da semende lökosit olmaması ya da çok az sayıda lökosit bulunması
IV. Asemptomatik Prostatit	Herhangi bir şikayeti bulunmayan hastalarda prostat salgısı ya da semende bakteri ve/veya lökosit bulunması ya da histopatolojik incelemede inflamasyonun gösterilmesi

Akut bakteriyel prostatit, prostat bezinin akut enfeksiyonu olup, erkeklerde pelvik ağrıya, dizüri, sık idrara çıkma, idrar retansiyonu gibi üriner sistem semptomlarına ve bazen de ateş, titreme, bulantı, kusma gibi sistemik semptomlara neden olabilen bir hastalıktır. Akut prostatitin en sık nedeni E. Coli'dir. Daha sonra P. Aeroginosa, Klebsiella, Enterokok ve Enterobakter, Proteus ve Serratia türleri akut prostatite neden olabilmektedir. Tüm prostatitlerin %10'unu oluşturduğu tahmin edilen akut prostatitler oral antibiyotik tedavisi ile tedavi edilebilmektedir. Tedavi edilmeyen olguların kronikleşmesi ya da sistemik bulgularla daha ağır enfeksiyon tabloları oluşturması mümkündür (Coker ve Dierfeldt, 2016).

Kronik bakteriyel prostatitis, tekrarlayan prostatit atakları ile seyretmektedir. En sık etken E. Coli olmakla birlikte pseudomonas, klebsiella ve proteus türleri de etken olarak tespit edilebilmektedir. Hayvan çalışmalarında kronik enfeksiyonun prostatın asinüslerinde bir biyofilm tabakası oluşturduğu ve bakterilerin bu sayede antibiyotik tedavisine dirençli hale geldiği gösterilmiştir (Wagenlehner, vd., 2009).

Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü sınıflamasında kategori III olarak sınıflandırılan kronik prostatit/kronik pelvik ağrı sendromu (KP/KPAS), inflamatuvar ve non-inflamatuvar olarak iki alt sınıfa ayrılmıştır. KP/KPAS prevelansının dünya genelinde %2-16 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Özellikle 50 yaş altı erkeklerde en sık görülen ürolojik rahatsızlıktır (Smith, 2016).

KP/KPAS oluşum mekanizmalarına yönelik yapılan çalışmalarda farklı görüşler ortaya atılmıştır. Prokaryotik DNA dizilerinin bazı inflamatuvar tip KP/KPAS hastalarının prostat dokusunda tespit edilmesi neticesinde, kültürde üremeyen bazı mikroorganizmaların KP/KPAS gelişiminde etken olabilecekleri fikri ortaya atılmıştır. Yapılan çalışmalarda fimozis, korunmasız cinsel ilişki, transüretral cerrahi girişim veya üretral katater uygulamalarının prostat dokusuna bakteri yerleşimi ile ilişkili olabilecekleri belirtilmiştir. Yine, KP/KPAS hastalarında yapılan çalışmalarda prostat dokusunda pro-inflamatuvar sitokinlerin düzeyleri yüksek tespit edilirken, anti-inflamatuvar sitokinlerin seviyeleri düşük bulunmuştur. Bu durum otoimmün bazı mekanizmaların KP/KPAS gelişiminde rolü olup olmadığını akla getirmiştir. Bir diğer mekanizma, mesane boynundaki yetersiz gevşemenin idrar yapma sırasında üretrada türbülans etkisi oluşturduğu ve böylece prostat kanallükülleri içerisine idrarın reflüsü neticesinde KP/KPAS oluştuğu düşüncesidir. KP/KPAS gelişiminde öne sürülen mekanizmalardan bir tanesi de ağrı oluşumu ve iletimi üzerinden ortaya konulan

görüştür. Bu konuda yapılan çalışmalarda β -endorfinin salınımını inhibe eden PGE_2 'nin KP/KPAS hastalarının seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. β -endorfin endojen bir ağrı kesicidir ve düzeylerinin azalması ile kronik pelvik ağrının ortaya çıktığı ileri sürülmüştür. Aynı şekilde inflamasyon bölgesindeki mast hücrelerinden salınan sinir büyüme faktörünün (NGF) ağrı iletiminde görevli sinir liflerinde hassasiyeti artırdığı ve hiperaljeziye neden olduğu ileri sürülmüştür. IL-10 bir diğer KP/KPAS ilişkili molekül olarak ortaya atılmıştır. IL-10 her ne kadar anti-inflamatuvar bir sitokin olarak bilinse de yapılan çalışmalarda IL-10'nun pleiotropik etkileri olduğu gösterilmiştir. TNF- α , IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-8 ve INF- γ üretimini inhibe ederek anti-inflamatuvar etki gösteren IL-10, aynı zamanda B-lenfosit proliferasyonu ve antikor üretimini artırarak ve CD8+ T lenfositlerinin proliferasyonu, aktivasyonu ve kemotaksisini artırarak, immun sistemi uyarıcı etki oluşturmakta ve böylece KP/KPAS etiyolojisinde rol oynadığı ileri sürülmektedir (Erdemir, 2016; Wagenlehner, vd., 2009; Pontari ve Ruggieri, 2004).

Asemptomatik prostatit olguları NIH sınıflamasına göre tip IV prostatit olarak kategorize edilmiştir. Bu hastalarda her hangi bir klinik yakınma olmamakla birlikte, PSA düzeylerinin yüksek olduğu ve yapılan histopatolojik incelemelerde prostatit bulgularının var olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, asemptomatik prostatit prevalansı %32,2 olarak hesaplanmış ve kontrol grubuna kıyasla asemptomatik prostatit grubunda PSA düzeyleri anlamlı ölçüde yüksek tespit edilmiştir. Bir diğer çalışma ise Çin'de yapılmıştır. Yaşları 19-78 arasında değişen 1868 asemptomatik erkekte yapılan çalışmada prostatit prevalansı %21,1 olarak bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada sigara ve alkol içenlerde tip IV prostatit gelişme riskinin her ikisi için de ayrı ayrı arttığı gösterilmiştir (Carver, vd., 2003; Wu, vd., 2013).

2.5. Benign Prostat Hiperplazisi

Benign prostat hiperplazisi, epitel ve stromal hücrelerin malign olmayan proliferasyonu ile prostat bezinde meydana gelen histolojik değişikliktir. Prostat bezinde meydana gelen bu proliferasyon çoğunlukla transisyonel zondan ve periüretral bölgelerden kaynaklanmaktadır. BPH nedeniyle eğer klinik semptom ortaya çıkıyorsa alt üriner sistem semptomları (AÜSS) olarak isimlendirilmektedir. Histolojik olarak BPH tanısı alan hastalarda AÜSS bulunmayabileceği gibi AÜSS olan her hasta da BPH olarak nitelendirilmemektedir. AÜSS olarak ifade edilen semptomlar; irritatif (idrar sıklığında artış, noktüri, acil idrar yapma isteği) ve obstrüktif (kesik kesik idrar yapma,

azalmış idrar akım hızı ve mesanenin tam boşaltılamaması) olarak sınıflandırılmaktadır (Tek ve Çayan, 2010; Foo, 2017).

2.5.1. Benign prostat hiperplazisinin epidemiyolojisi

BPH riski yaşla birlikte belirgin bir şekilde artmaktadır. Yapılan otopsi çalışmalarında histolojik olarak tespit edilen BPH prevalansı, 40'lı yaşlarda %8 civarında iken, 60'lı yaşlarda %50'lere ve 90'lı yaşlarda %80'lere ulaşmaktadır. Dahası yaşlanma, başlı başına BPH başlangıcı ve ilerlemesi için bir risk faktörüdür (Lim, 2017).

BPH'nın risk faktörleri arasında yaşlanmanın yanı sıra ırk, kalıtım, metabolik sendrom ve yaşam stili yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda siyahi Amerikalılar'ın beyaz ırka kıyasla BPH için yatkın olduğu ya da Asyalılar'ın beyaz ırka göre daha az risk taşıdığı yönünde bulgular olsa da ırk ile BPH arasında kesin ve net bir ilişki olmadığını söyleyen yayınlarda mevcuttur (Kaplan, vd., 1998; Platz, vd., 2000). Kalıtım ise BPH açısından güçlü bir risk faktörüdür. Yapılan bir çalışmada 64 yaş altında BPH nedeni cerrahi uygulanan bir hastanın erkek akrabalarında BPH görülme riski 4 kat, erkek kardeşlerinde ise 6 kat artmıştır. Özellikle 60 yaş altında BPH tespit edilen vakaların yarısının kalıtsal olduğu belirtilmektedir. Yaşam stili, beslenme ve kronik inflamasyon BPH için risk teşkil eden diğer hususlardır. Yapılan bir çalışmada ılımlı ya da kuvvetli bir egzersizin BPH'a bağlı AÜSS oluşma riskini sedanter yaşama göre en az %25 oranında azalttığı belirtilmiştir. Obezite, BPH için risk oluşturan bir diğer faktördür. Vücut kitle indeksindeki her 1 kg/m² artışın prostat hacminde 1.5 mL kadar bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, obez bireylerde BPH görülme riskinin obez olmayanlara göre 3.5 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Sanda, vd., 1994; Parsons, vd., 2006; Lim, 2017).

2.5.2. Benign prostat hiperplazisinin patofizyolojisi

BPH oluşumdaki patofizyolojik mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, yaşlanma ile birlikte meydana gelen doku yeniden düzenlenmesi (remodelling), hormonal değişiklikler, metabolik sendrom ve inflamasyon sürecinin BPH gelişimi üzerindeki etkileri üzerinde durulmaktadır (Briganti, vd., 2009).

Yaşlanma ile beraber prostat dokusunda özellikle de transisyonel zonda önemli bir doku yeniden düzenlenme süreci oluşmaktadır. Stroma ve epitel hücreler arasındaki

etkileşimler ve büyüme faktörü yollarındaki dengenin bozulması, prostat hacminde artışa neden olmaktadır. En önemli değişim bazal hücrelerde ortaya çıkmaktadır. Bu süreçte bazal hücrelerin hücre içi metabolizmalarında değişiklik olmakta ve hipertrofik bir görünüm sergilemektedirler. BPH gelişiminde prostat taşlarının ve corpora amylacea adı verilen ve prostat lümeninde görülen protein yapılı maddenin de katkısı bulunmaktadır. Prostat taşları ve corpora amylacea ile birlikte lüminal hücrelerin sekresyonlarındaki değişiklikler ileri bir kalsifikasyona ve nihayetinde prostat kanallarında tıkanıklığa neden olmaktadır (Briganti, vd., 2009).

Normal hücre büyümesinde hücre ölümü ile ilgili yolların uyarılması ve baskılanması arasındaki hassas dengenin rolü bilinmektedir. Bu yollarda görevli moleküllerden B hücre lenfoma-2 (bcl-2) ve bcl-2 ile ilişkili X protein (bax) en iyi bilinenlerinden ikisidir. Bcl-2 proteini anti-apoptotik özellik gösterirken, bax proteini pro-apoptotik özelliktedir. BPH ve kanser hastalarından alınan prostat dokularında yapılan çalışmada, BPH'da artan prostat hacmi ile bcl-2 ekspresyonu artarken, bax ekspresyonunun azalmış olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada bcl-2 düzeylerinin BPH'lı prostat epitel hücrelerinde PKa'ya kıyasla daha düşük düzeyde olduğu, bax proteinin ise BPH'lı prostat epitel hücrelerinde PKa'ya kıyasla daha yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir (Saker, vd., 2015).

Prostat hücrelerindeki apoptotik sürecin düzenlenmesinde TGF- β önemli bir role sahiptir. TGF- β , bir çok transkripsiyon faktörü ile ilişkili olarak hücre ölümünü aktive etmektedir. Özellikle TGF- β 1'in prostat epitel hücrelerinde apoptozisi uyardığı ve proliferasyonu baskıladığı belirtilmektedir. Prostat epitel hücrelerindeki proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengede, Dickkopf-related protein 3 (Dkk-3) ve inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) proteinlerinin de görev aldığı belirtilmektedir. Fizyolojik koşullarda prostat epitel hücrelerinde sentezlenen Dkk-3 glikoproteini, prostat hastalıklarında stroma da ve özellikle de endotel hücrelerinde sentezlenmektedir. Dahası, Dkk-3'ün BPH'da bax ekspresyonunu azaltarak apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir. IAPs proteinlerinin ise prostat büyümesinde caspasların aktivitelerinin düzenlenmesi yoluyla apoptozisi inhibe ettikleri bildirilmiştir (Minutoli vd_2016).

BPH gelişiminde bir diğer üzerinde durulan mekanizma hormonal düzenlemelerdir. Androjen ve östrojenlerin BPH oluşumdaki etkileri tam olarak açıklanamamıştır. Prostat dokusunun normal gelişimi için testosteron ve dihidrotestosteron gereklidir. DHT; epidermal büyüme faktörü (EGF), keratinosit

büyüme faktörü (KGF) ve insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) gibi bir çok büyüme faktörü üzerinden etki gösterir. BPH oluşumu için de androjenlerin gerekli olduğu yapılan gözlemlere dayanarak söylenmektedir. Bu gözlemlerde, puberteden önce kastre edilen erkeklerde nodüler prostat hiperplazisinin gelişmediği, aynı şekilde hipopitüitarizm nedeniyle testosteron seviyeleri düşük olan erkeklerde de BPH gelişmediği görülmüştür. Ancak, yaşlanmayla birlikte erkeklerde testosteron seviyelerinin azalmasına rağmen BPH riskinin artıyor olması ya da testosteron destek tedavisi alan erkeklerde BPH riskinin artmış bulunamaması, androjenlerin BPH gelişimi için gerekli fakat yetersiz olduğu görüşünü ön plana çıkarmıştır. Östrojenlerin prostat büyümesi üzerine etkisi de çift yönlüdür. Östrojen reseptörü alfa (ER- α) ve beta (ER- β) prostat dokusunda farklı etkilere sahiptir. ER- α , asıl olarak prostat epitel hücrelerinde bulunur ve bu reseptörün uyarılmasının prostat dokusunda hiperplazi, inflamasyon ve displazi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. ER- β ise esas olarak prostat stromal hücrelerinde bulunur ve bu reseptörün uyarılması, prostat dokusunda proliferasyonun inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu sonuçlara dayanarak, ER- α /ER- β oranının prostat hücre proliferasyonu için önemli olabileceği belirtilmiştir (Nicholson ve Ricke, 2011).

BPH gelişimi ile metabolik sendrom ve inflamasyon arasında ilişki olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Metabolik sendrom ve BPH arasındaki ilişkiye yönelik üzerinde durulan anahtar molekül insülin dir. Metabolik sendromda görülen insülin direnci ve buna bağlı olarak artan insülin düzeyleri doğrudan ve dolaylı olarak BPH gelişimine katkıda bulunmaktadır. İnsülin, prostat epitel hücreleri için doğrudan güçlü bir mitojen ve büyüme faktörüdür. İnsülin aynı zamanda seks hormon bağlayıcı globülin düzeylerini azaltarak, serbest androjen miktarını artırmaktadır. Böylece prostat epitel hücrelerine daha fazla androjen girmekte ve insülin dolaylı olarak BPH gelişimine katkıda bulunmaktadır. İnsülin ayrıca, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) üzerinden de etki göstermektedir. IGF-1'in prostat epitel hücre proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir. IGF-1 reseptörü ile insülin reseptörünün benzer yapısından ötürü, insülin doğrudan IGF-1 reseptörüne bağlanmakta ve aktive etmektedir. Aynı zamanda insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı globülin 1 (IGFBP-1) sentezini azaltarak serbest IGF-1 miktarını artırma yoluyla da BPH gelişimine katkıda bulunmaktadır (Ngai, vd., 2017).

Metabolik sendrom aynı zamanda düşük düzeyli bir kronik inflamasyonun görüldüğü bir durumdur. Metabolik sendromda CRP gibi inflamasyon belirteçlerinin yanı sıra TNF- α , IL-6 ve IL-8 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin düzeyi de

yükselmektedir. Bu sitokinlerin aktivasyonu ile prostat dokusunda T-hücre aktivasyonu gerçekleşmekte ve inflamasyon süreci stromal ve epitelyal hücrelerde proliferasyonla sonuçlanmaktadır. Prostat dokusunda oluşan kronik inflamasyonla birlikte tekrarlayan yara iyileşme süreçleri, nodül oluşumu ve nihayetinde BPH tablosunu meydana getirmektedir (Ngai, vd., 2017).

2.5.3. Benign prostat hiperplazisinin tanısı

BPO terimi BPH'nın mesane çıkım obstrüksiyonuna neden olması durumunda ortaya çıkan tabloyu ifade etmektedir. BPH tanısı için gerek Amerikan Üroloji Birliği (AUA) ve gerekse Avrupa Üroloji Birliği (EUA) tarafından yayınlanan rehberlerde, BPH tanısı ya da tedavisinden ziyade benign prostatik obstrüksiyon (BPO) tanı ve tedavisinden bahsedilmektedir (Tarcan ve Yazıcı, 2006).

BPH tanısı için anamnez, fiziksel muayene, laboratuvar testleri ve ürodinamik testler kullanılmaktadır. AÜSS'nın BPH dışı nedenlerini dışlamak için öncelikle sıkı bir anamnez ve fizik muayene önerilmektedir. Böylece üriner sistem enfeksiyonları, çeşitli ilaçlara bağlı durumlar, diyabet, nörolojik rahatsızlıklar, aşırı aktif mesane, kafein, alkol ve aşırı sıvı tüketimi gibi AÜSS'na neden olabilecek durumlar dışlanabilir. BPH kaynaklı semptomların varlığı, tipi ve ciddiyetine yönelik “uluslararası prostat semptom skoru” (IPSS) hazırlanmıştır. Bu anketteki sorular puanlandırılarak toplamda 0-35 arası bir skor üzerinden değerlendirilmektedir. 1-7 arası ılımlı, 8-19 arası orta ve 20-35 arası ciddi semptom skoru olarak kabul edilmektedir. Ayrıca yaşam kalitesi indeksi (QoL) aynı amaçla kullanılan bir indekstir. Burada hastaya, mevcut üriner semptomlar ile hayatının geri kalanını geçirdiği düşünüldüğünde ne hissedeceği sorularak, hastanın mevcut durumdan duyduğu rahatsızlığın derecesinin ortaya konulması amaçlanmaktadır (Wilt ve N'Dow_2008; Vasanwala, vd., 2017).

Parmakla rektal muayene, prostat dokusunun sınırlarının keskin ve pürüzsüz hissedildiği BPH ile sert ve düzensiz hissedildiği PKa ayrımında kullanılması önerilen fiziksel bir muayene türüdür. Ayrıca idrar strip testi, serumda glukoz, üre ve elektrolit düzeylerinin ölçülmesi; alt üriner sistem semptomlarına neden olması muhtemel diyabet, böbrek bozuklukları, idrar yolları enfeksiyonu gibi durumların dışlanmasında önerilen tetkiklerdendir. PSA testi alt üriner sistem semptomlarına neden olan sorunun prostat kaynaklı olup olmadığının tespiti amacıyla ölçülmesi tavsiye edilmektedir. PSA düzeyleri PKa'da, BPH'da ya da diğer prostat hastalıklarında artmaktadır. Parmakla

rektal muayene bulgularının normal olduğu durumlarda 1.5 ng/ml'den düşük PSA düzeylerinin BPH tanısını dışlamak için kullanılabileceği belirtilmektedir. Ancak PSA testinin yanlış düşük ya da yüksek sonuçları, ilave bir çok gereksiz tanı testinin yapılmasına neden olabilmektedir. BPH tanısında opsiyonel ve kişiye bağlı uygulanabilecek diğer testler arasında üroflowmetri, işeme günlüğü tutulması, ultrason ile mesane, prostat ve böbreklerin görüntülenmesi bulunmaktadır (Wilt ve N'Dow_2008; Vasanwala, vd., 2017).

2.6. Prostat Kanseri

2.6.1. Prostat kanserinin epidemiyolojisi

Prostat kanseri, her iki cinsiyette görülen tüm kanserler arasında dördüncü en sık görülen kanser iken, erkek cinsiyette en sık görülen ikinci kanser türüdür. 2012 yılında dünya genelinde 1.1 milyon kişinin PKa tanısı aldığı tahmin edilmektedir. Bu rakam aynı yıl kanser tanısı alanların %15'ini teşkil etmektedir. PKa olanların %70'i (759.000 kişi) daha gelişmiş bölgelerde yaşayan erkeklerden oluşmaktadır. PKa insidansı dünya genelinde 25 kattan fazla bir değişim göstermektedir. PKa'nın yaşa göre standardize edilmiş insidansına göre Yeni Zellanda ve Avusturalya yüzbinde 111.6 ile birinci sırada yer alırken, yüzbinde 97.6 ile Kuzey Amerika ikinci sırada gelmektedir. Batı ve Kuzey Avrupa da yüksek PKa insidansına sahiptir. Bu bölgelerin ortak özelliği PSA testinin ve buna bağlı olarak biyopsinin yaygın olarak kullanıldığı daha gelişmiş bölgeler olmasıdır. Dünyanın diğer bölgelerine bakıldığında, daha az gelişmiş bölgeler olan Kayipler, Güney Amerika ve Güney Afrika'da sırasıyla yüzbinde 79.8, 61.8 ve 60.1 gibi nispeten yüksek PKa insidansı var iken, Asya toplumlarında yüzbinde 10.5 ve özellikle de Güney-Doğu Asya'da yüzbinde 4.5 gibi bir insidans değeri hesaplanmıştır (GLOBOCAN, 2012).

PKa, 2012 yılında meydana gelen 307.000 ölüm sayısı ile erkeklerde kanser kaynaklı ölümlerde beşinci sırada yer almaktadır. PSA testinin insidansa olan etkisine kıyasla mortalite üzerine etkisinin daha az olması nedeniyle dünya genelinde mortalite oranları arasında 10 kat civarında bir farklılık görülmektedir. PKa insidansından farklı olarak mortalite hızları daha gelişmiş bölgelere kıyasla az gelişmiş bölgelerde daha fazladır. Yaşa göre standardize edilmiş mortalite hızı karayipler bölgesinde (yüzbinde 29) ve sahra altı Afrika bölgesinde (yüzbinde 19-24) ve özellikle de siyah ırkta nispeten

daha yüksek düzeydedir. Mortalite hızı Güney Asya'nın merkez bölgelerinde yüzbinde 2.9 ile en düşük seviyelerde görülmekte iken, Amerika ve Okyanusya'da orta seviyelerdedir (GLOBOCAN, 2012).

2.6.2. Prostat kanseri için risk faktörleri

PKa için risk faktörleri, yaş, ırk, kalıtsal geçiş, metabolik sendrom, beslenme, genetik faktörler ve inflamasyon olarak sayılabilir.

PKa büyük oranda yaşlı erkeklerde görülen bir hastalıktır. PKa tanısı alan erkeklerin yaklaşık %60'ı 65 yaş ve üzerindedir. 40 yaş altında oldukça nadir olan PKa'ya yakalanma riski, 50 yaş sonrası hızla artmaktadır. PKa için ortalama tanı alma yaşı 66 yaş civarındadır. 2007-2011 yılları arasında PKa tanısı alanların %0.6'sı 35-44 yaş aralığında, %9.7'si 45-54 yaş aralığında, %32.7'si 55-64 yaş aralığında, %36.3'ü 65-74 yaş aralığında, %16.8'i 75-84 yaş aralığında ve %3.8'i 85 yaş ve üzeri erkeklerden oluşmaktadır. 55 yaş üzerindeki erkeklerde Pka görülme riski, 55 yaş atındaki erkeklere kıyasla 17 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Bashir, 2015).

Son çalışmalar göstermiştir ki etnik köken PKa açısından önemli bir risk faktörüdür. Afrika kökenli Amerikalı erkeklerde PKa insidansı ve mortalitesi beyaz erkeklere kıyasla daha yüksektir. Dahası, Afrika kökenli Amerikalılarda görülen PKa'lar Avrupa kökenli Amerikalılarda görülen PKa'lardan daha agresif yapı göstermektedirler. En düşük PKa insidansı tipik olarak Asyalı erkeklerdedir. Afrika kökenli Amerikalı erkeklerdeki bu yüksek PKa insidansı ve mortalitesini açıklamaya yönelik yapılan bazı çalışmalarda; Afrika kökenlilerin, PKa ile ilişkili olduğu gösterilen kromozom 8q24 varyantlarını daha fazla taşıdıkları belirlenmiştir. Yine, BCL-2 gibi anti-apoptotik genlerin ya da EphB2 gibi tümör süpresör genlerin mutasyonlarının Afrika kökenli Amerikalılarda daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Ancak, etnik kökenler arasındaki bu farklılığın tek nedeni genetik duyarlılık olmayıp; beslenme, yaşam stili ve çevresel faktörler de etkili olduğu ifade edilmektedir (Perdana, vd., 2016; Powell ve Bollig-Fischer_2013).

PKa aynı zamanda herediter karakter taşıyan bir kanser türü olarak belirlenmiştir. Birinci derece yakınlarından biri (baba, oğul, erkek kardeş) PKa tanısı almış olan erkeklerde, bu hastalığa yakalanma riski 2 ya da 3 kat artmaktadır (Bashir, 2015).

Tablo 2.2. Ailesinde prostat kanseri olan kişinin rölatif riski ve güven aralığı değerleri (Kicinski, vd., 2011).

Prostat kanseri tanısı alan kişi	Rölatif Risk	(%95 Güven Aralığı)
Baba	2.35	2.02-2.72
Erkek kardeş	3.14	2.37-4.15
Birinci derece akraba	2.48	2.25-2.74
65 yaş altında birinci derece akraba	2.87	2.21-3.74
65 yaş ve üzerinde birinci derece akraba	1.92	1.49-2.47
İki ya da daha fazla sayıda birinci derece akraba	4.39	2.61-7.39
İkinci derece akraba	2.52	0.99-6.46

Konuyla ilgili birçok çalışmanın değerlendirildiği bir meta analizde erkek kardeşinde PKa görülen bir erkeğin PKa'ya yakalanma riski babasında PKa görülen bir erkekten daha fazladır. Bu farklılığın nedeni tam olarak açıklanamamıştır. PKa görülen birinci derece yakın sayısı arttıkça, PKa riski de artmaktadır. Tablo 2.2'de ailesinde PKa öyküsü bulunan bir erkek için rölatif risk ve güven aralığı değerleri verilmiştir (Kicinski, vd., 2011).

Metabolik sendrom ve beslenme alışkanlıkları PKa riski için önemli olan faktörlerdendir. Metabolik sendrom; serum trigliserid seviyesinin 150 mg/dL'nin üzerinde, serum HDL seviyesinin 40 mg/dL'nin altında, bel çevresinin 102 cm'nin üzerinde, açlık kan şekerinin 110 mg/dL'nin üzerinde ve kan basıncının 130/85 mmHg'nın üzerinde olması şeklinde sıralanan 5 komponentten en az 3'ünün varlığına verilen isimdir. Metabolik sendrom ve PKa arasında pozitif bir korelasyonun varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Finlandiya'da 1880 erkeğin 13.2 yıl süre ile izlendiği bir çalışmada, metabolik sendromu olan erkeklerin PKa'ya yakalanma risklerinin yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada metabolik sendromla birlikte kilolu ya da obez olan (vücut kitle indeksi, $VKI \geq 27 \text{ kg/m}^2$) erkeklerin PKa'ya yakalanma riskleri daha yüksek olduğu (rölatif risk, $RR=3$) belirtilmiştir. Ayrıca,

metabolik sendromun ileri derece (gleason skor=7-10) ve ileri klinik evre ($\geq T3$) PKa ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Laukkanen vd., 2004; Karzai, vd., 2016).

Beslenme alışkanlarına yönelik yapılan çalışmalarda; trans yağ, doymuş yağ ve karbonhidrat alımı ile PKa arasında çok az çalışmada ilişki belirlenmiştir. Yüksek kalsiyum alımının, süt ürünlerinin fazla tüketiminin, vitamin D eksikliğinin, kırmızı et ve işlenmiş et ürünlerinin PKa insidansını artırdığı belirtilmektedir (Leslie ve Siref, 2018).

Bir çok kanser türünde olduğu gibi PKa gelişiminde de genetik ve epigenetik değişikliklerin rolü olduğu belirtilmiştir. PKa'daki genetik değişiklikler; somatik kopya sayısı değişiklikleri, yapısal yeniden düzenlemeler, nokta mutasyonları, tek nükleotid polimorfizmleri şeklinde meydana gelebilmektedir. Somatik kopya sayısı değişiklikleri, diğer somatik değişikliklere kıyasla kanser genomunun daha büyük bir kısmını etkileyen, genetik materyaldeki kayıp ya da kazançlardır. Somatik kopya sayısı değişiklikleri prostat kanserlerinin neredeyse %90'ında bulunmaktadır. Bunlar arasında kromozom 8p'de yer alan NKX3.1, kromozom 8q'da yer alan c-myc, 13q'da bulunan RB1 genleri örnek olarak verilebilir (Wallis ve Nam, 2015).

Bunların yanı sıra çeşitli kanser türlerinde anormal ekspresyonları ya da mutasyonlarının varlığı gösterilmiş olan TP53, PTEN, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin, PKa için de risk faktörü oldukları gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon taşıyan erkeklerin PKa'ya yakalanma risklerinin bu mutasyonları taşımayanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu mutasyonları taşıyanlarda daha agresif PKa'lar gelişmekte ve yaşam kanser sonrası yaşam süresi daha kısa olmaktadır (Kgatle vd., 2016).

PKa'da görülen genetik değişikliklerden biri de kromozomal yeniden düzenlemelerdir. Bu duruma en iyi örnek kromozom 21q22 bölgesinde bulunan transmembran serin proteaz 2 (TMPRSS2) ile aynı kromozom bölgesinde yer alan v-ets eritroblastozis virüs E26 onkogen homolog (ERG) gen füzyonudur. Bu gen füzyonu primer PKa'ların %50'sinde tespit edilmektedir. Bu füzyonun sonucunda bir onkogen olan ERG geni, androjene cevap olarak üretilen bir serin proteazı olan TMPRSS2 geninin kontrolü altına girmektedir. TMPRSS2:ERG gen füzyonunun PKa için spesifik bir belirteç ve aynı zamanda tedavi için bir hedef olabileceği belirtilmektedir (Wang vd., 2017).

PKa'da meydana gelen bir diğ er genetik değişiklik ise nokta mutasyonlarıdır. Nokta mutasyonuna uğrayarak PKa'ya risk teşkil ettiği belirtilen genlere; Ribonükleaz L geni (RNASEL), elac homolog 2 geni (ELAC2), makrofaj       resept  r  1 geni (MSR1), Homeobox B13 geni (HOXB13) ve Speckle Type POZ Protein geni (SPOP)  rnek olarak verilebilir (Wallis ve Nam, 2015). Tablo 2.3'te PKa gelişiminde risk faktörü olması muhtemel genlerden bazıları gösterilmiştir.

PKa'da risk faktörü olarak epigenetik bazı düzenlemelerin de olduğu gösterilmiştir. DNA metilasyonu epigenetik düzenlemelerin başında gelmektedir. Sitozin ve guaninin 5'-3' yönde bir araya gelmesi ile oluşan CpG adaları, özellikle genlerin promotor bölgelerinde bulunmakta olup, metilasyona çok duyarlıdırlar. CpG adalarının metilasyonu genellikle genlerin susturulması ile sonuçlanır. PKa'da hipo ya da hipermetilasyon hastalığının ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Sitozin hipometilasyonu; metastatik PKa, kromozom instabilitesi ve hastalığının progresyonu ile ilişkilidir. Diğer taraftan androjen reseptör geni, h re siklusunun kontrolünde, sinyal iletiminde, DNA hasarının tamirinde, detoksifikasyonda ve apoptoziste görevli 50'den fazla genin PKa'da hipermetile olduğu tespit edilmiştir. Hipermetilasyonun daha çok erken başlangıçlı prostat intraepitelyal neoplazi (PIN) odaklarında görülmesi, metilasyonun kanser gelişiminin erken dönemlerinde oluştuğunu düşündürmektedir. Metilasyonun dışında histon modifikasyonları, asetilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon gibi epigenetik düzenlemeler, bir çok kanser türünde olduğu gibi PKa'da da risk faktörleri arasındadır (Ho, vd., 2011).

Kronik inflamasyonun PKa'nın başlaması ve ilerlemesinde rol oynadığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. 65 yaşından büyük 5821 erkek üzerinde yapılan bir çalışmada, prostatit öyküsüne sahip olanlarda PKa gelişme riskinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 11 vaka-kontrollü araştırmanın değerlendirildiği bir meta-analiz çalışmasında ise prostatit vakası geçirmiş olanlarda PKa görülme riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Dennis, vd., 2002; Daniels, vd., 2005).

Tablo 2.3. Prostat kanserinde rolü olan bazı genler ve uğradıkları değişiklikler (Hughes, vd., 2005'ten değiştirilerek alınmıştır).

Kromozom bölgesi	Gen	Normal İşlevi	Prostat kanserindeki değişiklik
7p	EGFR	Büyüme faktörü	Amplifiye
7q	CAV1	Fibroblast ve endotel hücrelerinin plazma membranı invaginasyonlarındaki bir proteini (caveolin) kodlar	Amplifiye
8p	MSR	Bakteri parçalarının hücre içine alınmasından sorumlu makrofaj çöpçü reseptörünü kodlar	Delesyon
8p	NKX3.1	Tümör süpresör gen	Delesyon
8q	C-Myc	Transkripsiyonel aktivatör	Amplifiye
10q	PTEN	Tümör süpresör gen	Mutasyon
13q	RB1	Tümör süpresör gen	Delesyon
16q	E-CAD	Adezyon molekülü	Delesyon
Xq	AR	Adrojen reseptörü	Amplifiye
21q	TMPRSS2:ERG	Serin proteaz ve onkogen	Gen füzyonu
1q	RNASEL (HPC1)	Endoribonükleaz, viral RNA'ların parçalanması yolu ile doğal bağışıklığa katkıda bulunur	Mutasyon
17p	ELAC2 (HPC2)	DNA çapraz bağları tamir enzimi, tRNA'nın olgunlaşma sürecinde görevli bir enzim	Mutasyon
17q	HOXB13	Transkripsiyon faktörü	Mutasyon
17q	SPOP	Ubikitin protein ligaz alt ünitesi	Mutasyon

Kronik inflamasyonun kanser gelişimindeki rolüne yönelik bir hipotez ortaya konulmuştur. Buna göre; enfeksiyon sırasında fagositik hücreler tarafından salgılanan reaktif oksijen ve nitrojen türleri (süperoksit ve nitrik oksit gibi) DNA'da hasara sebebiyet vermektedir. Bu ortamda çoğalan epitel hücreleri yapısal ve fonksiyonel özelliklerini değiştiren mutasyonlara uğramakta ve bu durum kanserin başlangıç aşamasını oluşturmaktadır. İnflamasyon sürecinin bir parçası olan sitokinlerden IL-6 ve IL-6 reseptörü düzeyleri, lokalize PKa'da dahi normal prostata kıyasla çok daha yüksek tespit edilmekte ve IL-6 reseptör ekspresyonunun proliferasyon ile doğru orantılı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, hormona dirençli PKa'da TNF- α , IL-1 β , IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra IL-4 ve IL-10 gibi anti-inlamatuvar sitokinlerin düzeyinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Ergun and Koşar, 2010).

Yaşlanan erkeklerde tespit edilebilen fokal atrofik epitel bölgeleri, bir inflamatuvar yanıt sonrası ortaya çıkan odaklar olarak tanımlanmaktadır. Bu bölgeler artmış epitelyal proliferasyon göstermektedir ve proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA) olarak adlandırılmaktadır. PIA bölgelerinin prostat dokusunda prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) ve PKa odaklarının yakınında tespit edilmesi, PIA bölgelerinin kanser gelişimi için öncü bir lezyon özelliği taşıdığı fikrini ortaya çıkarmıştır (Shen ve Abate-Shen, 2010).

Glutasyon S transferaz (GST) ailesi, inflamasyon sırasında üretilen reaktif oksijen türleri ve oksidanların detoksifikasyonunda görevli, indüklenebilir bir enzim ailesidir. PIA bölgelerindeki lümenal epitel hücreleri yüksek oranda glutasyon S transferaz Pi 1 (GSTP1) ve glutasyon S transferaz alfa 1 (GSTA1) aktivitesi gösterirler. Majör bir GST sınıfı olan GSTP1'in ekspresyonunun PKa'da CpG metilasyonu yolu ile baskılandığı gösterilmiştir. Bu bulgu, inflamasyon sırasında yüksek düzeyde eksprese edilen GSTP1 geninin metilasyon yolu ile susturulması sonucunda, prostat hücrelerinin oksidanlara karşı savunmasız hale geldiği ve oksidanlar tarafından oluşturulan genom hasarının birikmesi ile PIA alanlarından PIN ve PKa meydana geldiği şeklinde yorumlanmıştır (Nakai ve Nonomura, 2013).

PKa hücreleri yüksek düzeyde NFκB aktivitesine sahiptirler. NFκB, transkripsiyon faktörüdür ve bir defa aktive olduğunda çeşitli moleküller üzerinden (c-myc, siklin D1, VEGF, vb) hücre büyümesi, anjiogenez ve metastaz ile ilişkili yolları düzenlemektedir. İnflamasyon sırasında sentezlenen bir pro-inflamatuvar olan TNF-α, NFκB'nin aktive olmasını sağlayan bir sitokindir. Bu durum, inflamasyonun PKa başlangıcında rol oynadığı görüşünü destekler mahiyettedir (Stark, vd., 2015).

PKa'da KP'nin bir risk faktörü olduğunu destekleyen bir bulgu da siklooksijenaz enzim inhibitörleri üzerinden ortaya konulmuştur. İnflamasyonda önemli rol oynayan çeşitli metabolitlerin sentezlenmesinde görevli olan COX enzimini inhibe eden nonsteroid anti-inflamatuvar ilaç (NSAİİ) kullanan erkeklerde PKa gelişme riskinin, NSAAİ kullanmayanlara göre daha düşük olduğu (OR=0.77) gösterilmiştir. Bu düşüşün özellikle COX-2 selektif inhibitörlerinde daha belirgin olduğu (OR=0.48) bildirilmiştir (Doat, vd., 2017).

2.6.3.Prostat kanserinin tanısı

PKa'nın erken tanısında parmakla rektal muayene, serum total PSA düzeyinin ölçümü ve gerekli durumlarda transrektal ultrasondur. Parmakla rektal muayene ve serum PSA düzeyi ölçümü PKa'nın kesin tanısı için yeterli olmamaktadır. PKa'nın kesin tanısı, prostat dokusundan alınan biyopsi örneğinin histopatolojik incelenmesi ile konulmaktadır. Günümüzde bu amaçla transrektal ultrason (TRUS) eşliğinde prostat iğne biyopsisi uygulanmaktadır. Avrupa Üroloji Derneği PSA seviyesinin bir kez yüksek tespit edilmesiyle hemen biyopsi yapılmasını önermemekte ve bir kaç hafta sonra testin tekrar edilerek, prostatit gibi PSA yüksekliğine neden olan durumların dışlanmasını tavsiye etmektedir. Ultrason kılavuzluğunda transrektal veya transperineal lateral yönlendirilmiş 18G kor biyopsi, histopatolojik inceleme için materyal elde etmekte standart olarak kullanılan bir yöntem olmuştur. TRUS eşliğinde prostat iğne biyopsisi için prostat bezinin tabanı, ortası ve apeksinden toplamda en az 10-12 kor biyopsi alınması önerilmektedir. Biyopsi örneklerinde histopatolojik olarak kanser derecelendirilmesi Gleason skorlaması ile yapılmaktadır. Evrelemede ise TNM evrelemesi kullanılmaktadır (Heidenreich, vd., 2014).

Gleason derecelendirme sistemi: Patolog Dr. Donald Gleason tarafından 1960'lı yıllarda geliştirilen bu test, mevcut olan en güvenilir ve prediktif histolojik derecelendirme sistemi olarak, tüm PKa patolojik tanımlamaları için evrensel olarak kabul edilmiştir. Gleason skorlama sistemi, diğer kanserlerde çoğunlukla tanımlanan hücresel özelliklerden ziyade, prostattaki bezlerin mikroskopik yerleşimi, mimarisi veya paternine dayanır. 1'den 5'e kadar bir derecelendirme yapılır. 1. derece hemen hemen normal bir mikroskopik glandüler paterni ve görünümü temsil ederken, 5.derece glandüler yapının tamamen bozulduğu ve sadece anormal kanser hücrelerinin bulunduğu bir tabloyu temsil eder. Tümörde en çok görülen patern birincil olarak ifade edilir, ikinci en çok görülen patern ise ikincil olarak belirtilir. Örneğin bir tümör birincil olarak 3 numaralı paterne uyuyorsa, ancak 5 numaralı paterni de ihtiva ediyorsa $3+5=8$ olarak derecelendirme yapılır. Eğer tümör tek hücreli paterne sahip ise; örneğin 4 numaralı paterne sahipse, $4+4=8$ olarak derecelendirilir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2016 yılında gleason derecelendirme sisteminin değerlendirilmesinde bazı değişikliklere gidilmiştir (Leslie ve Siref, 2018). Yeni sisteme göre gleason skoru değerlendirmesi Tablo 2.4'te özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Gleason derecelendirme sistemi (Leslie ve Siref, 2018).

Grup	Gleason Skoru	Tanım
Grup 1	≤ 6	Sadece bireysel olarak ayrılmış düzgün şekilli bezlerin olması
Grup 2	3+4=7	Büyük oranda düzgün şekilli bez yapıları olmakla birlikte, az miktarda kötü şekilli, kaynaşmış ya da kripriform yapıdaki bezleri içermesi
Grup 3	4+3=7	Büyük oranda kötü şekilli, kaynaşmış ya da kripriform yapıdaki bezler olmakla birlikte, az miktarda düzgün şekilli bez yapıları olması
Grup 4	8	(3+5): Büyük oranda düzgün şekilli bez yapıları olmakla birlikte, az miktarda bez yapısı oluşturmeyen tek tek hücreler; (4+4): sadece kötü şekilli, kaynaşmış ya da kripriform yapıdaki bezler; (5+3): Büyük oranda bez yapısı oluşturmeyen tek tek hücreler olmakla birlikte, az sayıda düzgün şekilli bez yapıları
Grup 5	9 ya da 10	Kötü şekilli, kaynaşmış ya da kripriform yapıdaki bezlerin eşlik ettiği ya da hiç bez yapısının görülmediği, nekrozun var olduğu ya da olmadığı farklılaşmamış tek tek hücrelerin olması

Prostat kanserinde evreleme: PKa'nın doğru ve etkin tedavisinin planlanabilmesi için hastalığın evresinin belirlenmesi önemlidir. Bu amaç için tümörün büyüklüğü (T), lenf nodu tutulumu (N) ve metastazın (M) değerlendirildiği TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır. Avrupa Üroloji Derneği tarafından yayınlanan rehberde belirtildiği şekliyle PKa'nın evrelendirilmesinde kullanılan TNM evreleme sistemi Tablo 2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 2.5. Prostat kanserinde TNM evreleme sistemi (Heidenreich vd_2011).

T: Primer tümör
Tx: Prostattaki tümörün değerlendirilememesi
T0: Prostatta tümör bulunmaması
T1: Dijital muayene ve görüntüleme yöntemleriyle prostatta tümör saptanamayan hastalar
T1a: Kapalı prostat ameliyatı sırasında çıkarılan dokularda <%5 oranda rastlantısal tümör saptanması
T1b: Kapalı prostat ameliyatı sırasında çıkarılan dokularda >%5 oranda rastlantısal tümör saptanması
T1c: PSA yüksekliği nedeniyle yapılan iğne biyopsisinde tümör saptanması
T2: Prostat bezinde sınırlı tümör, parmakla yapılan muayenede prostatta nodül bulunması
T2a: Tek bir prostat lobunu tutan tümör
T2b: Her iki prostat lobunu tutan tümör
T3: Prostat kapsülünü aşan tümör
T3a: Kapsül dışına tek veya iki taraflı uzanım
T3b: Seminal vezikül tutulumu
T4: Seminal vezikül dışında diğer komşu organlara yayılım gösteren tümör
N: Bölgesel lenf nodları
Nx: Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilememesi
N0: Bölgesel lenf bezi yayılımı olmaması
N1: Bölgesel lenf bezi yayılımı bulunması
M: Uzak metastaz
Mx: Uzak organ yayılımının değerlendirilememesi
M0: Uzak organ yayılımı olmaması
M1: Uzak organ yayılımı olması
M1a: Bölgesel olmayan lenf bezine yayılım
M1b: Kemiklere yayılım olması
M1c: Diğer uzak organlara yayılım bulunması

2.6.4. Prostat kanseri taramalarında PSA'nın yeri ve yaşanan sorunlar

R. Ablin tarafından 1972 yılında yapılan çalışmada prostat dokusuna özgü iki antijen tanımlanmıştır. Bunlardan birisinin prostatik asit fosfataz olduğu bildirilmiş, diğeri ise ilk defa "prostat spesifik antijen" (PSA) olarak tanımlanmıştır. Aynı dönemlerde farklı araştırmacılar tarafından prostat dokusundan izole edilen E1 antijen, P30 ve gamma-seminoprotein'nin de PSA ile aynı yapıda oldukları anlaşılmıştır (Ablin, 1972; Angelis, vd., 2007).

PSA'nın PKa ile ilişkisi ilk olarak 1980 yılında Papsidero ve ark.'nın yapmış oldukları çalışma ile ortaya konulmuş ve daha sonraları özellikle PKa tedavisinin takibi ve nükslerin belirlenmesinde PSA'nın kullanılabileceğine yönelik çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. 1986 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından PKa'nın monitörizasyonunda PSA'nın kullanılabileceği onaylanmıştır. 1990'lı yılların başından itibaren ise PSA'nın, parmakla rektal muayene ile birlikte PKa taramalarında kullanımı hız kazanmıştır (Papsidero, vd., 1980; Önem vd_2012).

PKa taramalarında PSA kullanımının değerlendirildiği ilk çalışma Catalona vd. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada 50 yaş ve üzerinde 1653 sağlıklı erkeğin serum PSA düzeyleri ölçülmüş ve PSA düzeyi 4-9.9 ng/mL arasında olan erkeklerden alınan biyopsi örneklerinde %22 oranında kanser tespit edilirken, 10 ng/mL'den büyük olanlarda %67 oranında kanser tespit edilmiştir (Catalona, vd., 1991).

Serumda PSA düzeylerinin ölçümü PKa taramalarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen önemli kısıtlılıklara sahiptir. PSA, her ne kadar prostata spesifik olsa da PKa'ya spesifik değildir ve bir çok farklı durumda düzeyleri artmaktadır.

PSA testinin PKa tanısında sahip olduğu spesifisite ve sensitivitenin belirlenmesi amacıyla Thompson vd. tarafından yapılan çalışmada; 55 yaş ve üzerinde, PSA düzeyi 3 ng/mL'nin altında olan 18.882 sağlıklı erkek 7 yıl süre ile yıllık PSA ölçümü ve parmakla rektal muayene yapılarak takip edilmiştir. Bu süre zarfında anormal parmakla rektal muayene bulguları olan ya da PSA düzeyi 4 ng/mL'nin üzerinde ölçülen hastalara biyopsi uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda tüm katılımcılara biyopsi önerilmiştir. Biyopsi uygulanan 5587 hastadan 1225'inde (%21.9) kanser tespit edilmiştir. PSA için cut-off noktası 1.1, 2.1, 3.1 ve 4.1 ng/mL olarak seçildiğinde, sırasıyla sensitivite değerleri %83.4, %52.6, %32.2 ve %20.5 olarak hesaplanmışken, spesifisite değerleri sırasıyla %38.9, %72.5, %86.7 ve %93.8 olarak hesaplanmıştır. Yaşa göre tabakalandırılmış analizde PSA'nın tanısal performansı 70 yaşın altındaki erkeklerde

(AUC=0.699), 70 yaşın üstündeki erkeklere (AUC=0.663) göre biraz daha yüksek tespit edilmiştir. PKa prevalansını sıfıra indiren herhangi bir cutoff noktası yoktur. PSA değeri 0.5 ng/mL'den küçük olan erkeklerde dahi PKa prevalansı %6.6 olarak tespit edilmiştir. PKa prevalansı, PSA değeri 0.6-1.0 ng/mL arasında %10, 1.1-2.0 ng/mL arasında %17, 2.1-3.0 ng/ml arasında %23.9, 3.1-4.0 ng/mL arasında ise %26.9 olarak hesaplanmıştır (Thompson, vd., 2004; Thompson, vd., 2005).

PSA testi temelinde yapılan PKa taramalarındaki bir diğer sorun aşırı tanı ve aşırı tedavidir. Kanseri, her zaman klinik yansıması olmayan, uzun süreli hücresel ve moleküler süreçlerden kaynaklanan heterojen bir hastalıktır. PSA taramaları ile tespit edilen bazı kanserlerin, histopatolojik olarak kanser tanımlaması yapılsa da aslında benign karakterde olabileceği ve dolayısıyla hastanın ömür boyu PKa kaynaklı bir şikayeti olmadan yaşamını sürdürebilecek iken, PSA ölçümü ve sonrasında biyopsi ile histopatolojik olarak tespit edilen kanserin tedavisi aşamasında gereksiz bir çok risk ve komplikasyona maruz kalabildiği belirtilmektedir. Bu görüşü savunanlar farklı nedenlerden dolayı ölmüş kişilerde yapılan otopsi çalışmalarında tespit edilen PKa oranlarını delil göstermektedir. Bu çalışmalarda, PKa dışı nedenlerden ölen erkeklerde 40'lı yaşlarda %3-43, 60'lı yaşlarda %14-70 ve 70'li yaşlarda %31-83 oranında histopatolojik olarak PKa varlığı gösterilmiştir (Brawley, vd., 2009; Croswell, vd., 2011).

PSA ile yapılan PKa taramalarının geniş çaplı değerlendirildiği en önemli iki çalışma, ABD'de yapılan "Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial" (PLCO) ve Avrupa'da yapılan "European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer" (ERSPC) randomize kontrollü çalışmalarıdır.

PLCO çalışması ABD'de 10 merkezde, yaşları 55-74 arasında toplam 76.693 kişi üzerinde yapılmıştır. 1993-2001 yılları arasında randomize edilen olguların 38.343'ü kontrol grubuna, 38,340'ı da tarama grubuna alınmıştır. Tarama grubunda 6 yıl süre ile her yıl serum PSA düzeyleri ölçülmüş ve 4 yıl süreyle parmakla rektal muayene yapılmıştır. İlk olarak 2009 yılında 7-10 yıl takip süreli sonuçları yayınlanan çalışmanın, 2017 yılında 12.6-16.5 yıl (ortanca=15 yıl) takip süreli sonuçları yayınlanmıştır. Bu süre zarfı içerisinde, PKa nedeniyle tarama grubundan 255 kişi, kontrol grubunda 244 kişi ölmüştür. Bu sonuçlara göre PKa kaynaklı ölüm riski aısından PSA taraması yapılan grup ile kontrol grubu arasında fark tespit edilmemiştir

(rölatif risk hız oranı, rate ratio, RR=1.04). Dolayısıyla, PSA ile yapılan PKa taramalarının mortalite oranlarına etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Pinsky, vd., 2017).

ERSPC çalışması 8 Avrupa ülkesinde, yaşları 55-69 arasında, tarama ve kontrol grubu olarak iki gruptan oluşan toplam 162,388 erkek üzerinde yapılmıştır. Tarama grubu PSA testi ile yıllık izlenmiş ve serum PSA değerleri 3 ng/mL'nin üzerinde ölçülenlere biyopsi uygulanmıştır. Çalışmanın 13 yıl takip süreli sonuçları 2014 yılında açıklanmıştır. Bu sonuçlara göre tarama grubunda 7408 ve kontrol grubunda 6107 kanser tespit edilmiştir. Tarama grubunun insidansı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Mortalite oranlarına bakıldığında PSA ile tarama yapılan grupta kontrol grubuna kıyasla PKa kaynaklı ölüm riski (rölatif risk hız oranı, rate ratio, RR=0.79) daha düşük bulunmuştur (Schroder, vd., 2014).

Bu iki büyük prospektif kohort çalışmanın sonuçları da göstermektedir ki serum PSA ölçümlerinin PKa taramalarında etkinliği hala tartışmalı bir konu olarak önümüzde durmaktadır. Bu nedenle son yıllarda PSA kökenli biyobelirteçler ile PKa tanısında PSA'nın etkinliğinin artırılması çabalarının yanı sıra, PSA dışında yeni biyobelirteç geliştirme çalışmaları da devam etmektedir.

2.6.5. Prostat kanseri tanısında PSA kökenli biyobelirteçler

Serumdan total PSA (tPSA) ölçümlerinin tek başına PKa'nın ayırımında yetersiz kalması, PSA türevi olan bir çok yeni biyobelirteç için çalışmalar yapılmasına neden olmuştur.

Serbest PSA (sPSA) yüzdesi: PSA, dolaşımda büyük oranda α -1 anti-kimotripsine bağlı haldedir. Bir kısmı da α -2 makroglobülin ve α -1 anti-tripsine bağlı olarak bulunur. sPSA ise tPSA'nın %5'i ile %45'i arasında değişen miktarlarda serumda bulunabilmektedir. sPSA yüzdesinin hesaplanmasında $(sPSA/tPSA) \times 100$ formülü kullanılmaktadır (Esfahani, vd., 2015).

tPSA ölçümleri ile PKa tanısı özellikle gri zon olarak adlandırılan 4-10 ng/mL düzeyleri arasında düşük spesifisiteye sahiptir. Bu düzeylerde tPSA ölçülen hastaların yalnızca %25'i biyopsi sonrası PKa tanısı almaktadır. Catalona vd. tarafından yapılan çalışmada 4-10 ng/mL aralığında tPSA düzeyine sahip hastalarda, sPSA'nın PKa'yı tespit etmekteki sensitivitesi %95 olarak ölçülmüş ve gereksiz biyopsileri %20 azaltabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, sPSA oranı %10'dan küçük olan hasta grubunda biyopsi sonrası %56 oranında PKa saptanırken, %25'ten büyük olan hasta

grubunda %8 oranında kanser saptanmıştır. Bu çalışmadan sonra tPSA düzeyleri 4-10 ng/mL arasında olan hasta grubunda, %sPSA kullanımına FDA tarafından onay verilmiştir (Catalona, vd., 1998; Esfahani, vd., 2015).

sPSA izoformları: Serbest PSA'nın 3 temel izoformu bulunmaktadır. Bunlar inaktif PSA (iPSA), çeşitli öncül proPSA formları ([2]proPSA, [4]proPSA, [5]proPSA, [7]proPSA) ve benign PSA (BPSA) olarak adlandırılmaktadır. Özellikle [2]proPSA ile ilgili önemli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, serum [2]proPSA düzeylerinin, PKa grubunda kanser olmayanlara kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir. [2]proPSA ölçümlerinin PKa tanısındaki spesifisite ve sensitivite değerlerinin tPSA ve sPSA'dan daha yüksek olduğu yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Huang YQ, vd., 2014).

Prostat Sağlık İndeksi (PHI): $[2]proPSA/fPSA \times PSA^{1/2}$ formülü ile hesaplanan ve prostat sağlık indeksi (PHI, Beckman Coulter, Brea, CA) olarak adlandırılan bir formülasyonun; 50 yaşından büyük, tPSA değeri 2-10 ng/mL arasında ve parmakla rektal muayene bulguları negatif olan hastalarda, gleason skoru ≥ 7 olan PKa'nın tespitinde sensitiviteyi fazla azaltmadan spesifisiteyi artırarak, gereksiz biyopsileri azaltabileceği bildirilmiştir (Catalona, vd., 2011). PHI hesaplaması bu çalışma baz alınarak, 2012 yılında FDA onayı almıştır

PSA dansitesi: Büyük prostat bezi daha fazla PSA salgılamaktadır. Bu bilginin ışığında, serum PSA düzeyinin prostat hacmine oranlanması ile PSA dansitesi (PSAD) hesaplanmış olmaktadır. Prostat hacminin ölçümü için ultrason kullanılmaktadır. PSAD düzeylerinin PKa'da BPH'tan daha yüksek olduğu yönünde çalışmalar yayınlanmış olmakla birlikte, başka çalışmalarca bu doğrulanmamıştır. PSAD ölçümü için transrektal ultrason kullanılmasının gerekliliği nedeniyle PKa taramalarında önerilmemektedir (Bensalah, vd., 2008).

PSA velositesi ve PSA'nın ikiye katlanma hızı: PSA velositesi ve PSA'nın ikiye katlanma hızı birbirine benzer ama farklı kavramlardır. PSA velositesi bir yıl içerisinde PSA'daki artış hızıdır. PSA'nın ikiye katlanma hızı ise PSA değerlerinin iki katına çıktığı süre dikkate alınarak hesaplanır. Bu süre aylar olabileceği gibi yıllarda olabilir. PSA'nın ikiye katlanma hızının daha çok tedavi sonrası kullanılması nedeniyle, PKa'da biyolojik potansiyelin belirlenmesinde PSA velositesinin daha yararlı olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, 2 ng/mL/yıl'dan daha az PSA velositesine sahip hastalara kıyasla, 2 ng/mL/yıl'dan daha yüksek PSA velositesine sahip hastaların cerrahi

tedavi sonrası 7 yıl içerisinde PKa'dan ölme risklerinin 10 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Carter, 2012).

2.6.6. Prostat kanseri tanısında PSA dışı biyobelirteçler

PKa tanısında PSA ölçümlerinin sahip olduğu, yukarıda bahsedilen kısıtlılıkları aşmak için PSA kökenli parametrelerin dışında bir çok farklı molekülün PKa'daki tanılabilirliği araştırılmıştır. Bunlardan bazıları aşağıda açıklanmaktadır.

4K skoru: Bu skor hesaplamasında tPSA, sPSA, intactPSA ve insan kallikreini 2 (hK2) parametreleri ile hastanın yaşı, parmakla rektal muayene bulguları, daha önceden varsa negatif biyopsi sonuçlarının kombinasyonu kullanılır. Bütün bu parametreler bir algoritma kapsamında değerlendirilerek, hastada gleason skoru 7 veya daha büyük bir PKa olma ihtimalinin yüzde olarak verildiği bir skor hesaplanmış olur. Parekh vd. tarafından klinik olarak PKa şüphesi olan 1012 erkek üzerinde yapılan bir prospektif çalışmada, 4K skorunun gleason skoru 7 veya daha büyük olan PKa'yı tahmin etmedeki doğruluğunun (AUC=0.821), sadece PSA ölçümüne göre (AUC=0.751) daha yüksek olduğu gösterilmiştir (McGrath, vd., 2016; Parekh, vd., 2015).

Prostat kanser antijeni 3 (PCA3): DD3 olarak da adlandırılan PCA3, kromozom 9q21-22'de bulunan bir gen tarafından kodlanan, fonksiyonu tam olarak bilinmeyen, PKa'ya özgü uzun kodlanmayan bir RNA molekülüdür. Normal prostat dokusunda tespit edilememektedir. BPH'da hafif düzeyli bir ekspresyonu olan PCA3, PKa'da yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Primer ve metastatik PKa'ların %95'inde yüksek seviyelerde eksprese edilen PCA3'ün PKa'da faydalı bir biyobelirteç olabileceği belirtilmektedir. 2012 yılında "progenisa PCA3 test" (Hologic) ticari adı ile FDA tarafından onaylanmıştır (Saini_2016).

TMPRSS2-ERG: TMPRSS2, bir füzyon proteinini kodlayan, prostat spesifik ve androjen ile düzenlenen bir gendir. Bu genin, PKa vakalarının >%50'sinde aşırı eksprese olması nedeniyle, PKa için bir onkogen olarak tanımlanmıştır. Bu genin transkripsiyon faktörü ve düzenleyicisi olan ERG geni ile füzyonu neticesinde TMPRSS2-ERG füzyon geni ortaya çıkmakta ve lokalize PKa'ların %48'inde bulunmaktadır. TMPRSS2-ERG füzyon geni ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi tek başına %24.3-37 arasında düşük bir sensitiviteye sahipken, %93 civarında yüksek bir spesifisiteye sahiptir. Ancak, serum PSA ve idrarda PCA3 ölçümü ile birlikte kombine

değerlendirildiğinde, AUC 0.88, sensitivitesi %80 ve spesifisitesi %90 olmaktadır (McGrath, vd., 2016).

Endoglin (CD 105): Endoglin, insan vasküler endotel hücreleri tarafından üretilen bir transmembran glikoproteinidir. Endoglin seviyelerinin PKa'nın ilerlemesi ile ilişkili olduğu ve serum endoglin düzeylerinin PKa ile ilişkisi bulunmamış olmakla birlikte, organa sınırlı kanser ile organa sınırlı olmayan kanser vakaları arasında farklı seviyelerde olduğu bildirilmektedir. İdrarda ölçülen endoglin düzeylerinin biyopsi sonucu pozitif olan grupta, biyopsi sonucu negatif olan gruba göre daha yüksek olduğu ve tümör çapı ile korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, endoglin düzeylerinin PKa'nın tanısı ve evrelendirilmesinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Fujita, vd., 2009).

Ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) ve plazminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI-1): uPA bir serum proteazıdır ve kendi reseptörüne bağlanarak aktive olduktan sonra plazminojeni plazmine dönüştürerek, ekstrasellüler matriks proteinlerinin yıkımından sorumlu diğer proteazları aktive eder. PAI-1 ise uPA'nın inhibitörüdür. Prostat doku örneklerinde uPA/PAI-1 oranının BPH grubuna kıyasla PKa grubunda yüksek olduğu ve PKa ayırımında bir doku belirteci olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Böhm, vd., 2013).

Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta 1 (TGF- β 1) ve İnterlökin-6 (IL-6): TGF- β 1, proliferasyon, farklılaşma, anjiyogenez ve immün cevap gibi hücrel süreçlerde görev alan bir büyüme faktörüdür. TGF- β 1'in lokal ekspresyonunun, PKa'da yüksek gleason skoru, tümör invazyonu ve metastaz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Prostat biyopsisi örneklerinde yapılan bir çalışmada, TGF- β 1'in tümörün agresifliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada IL-6 seviyelerinin TGF- β 1 ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. IL-6, bağışıklık sistemi ve hematopoetik mekanizmalarda etkili bir sitokindir. Farklı çalışmalarda, IL-6 ve IL-6R'nin serumdaki yüksek düzeylerinin metastatik ve hormona dirençli PKa ile ilişkili olduğu ve PKa'lı hastaların sağkalım süresinin tahmini amacıyla kullanılabileceği belirtilmektedir (Shariat, vd., 2011; Wu, vd., 2015).

Tablo 2.6. Prostat kanserinin tanısı ve tedavi takibi için geliştirilen bazı kombine biyobelirteçler (Alford, vd., 2017'den değiştirilerek alınmıştır).

Test	Tanımlama	Örnek	Kullanım alanı
SelectMDx	DLX ve HOXC6'nın ekspresyon düzeylerinin ölçümü	İdrar	PSA ≥ 4 ng/mL'nin üzerinde olan erkeklerde Gleason ≥ 7 olan kanserlerin tahmin edilmesi
Apify	Prostat kanserinde oluşan sekiz otoantikörün seviyelerinin ölçümü	Kan	PSA ≥ 2.5 ng/mL olan hastalarda hesaplanan risk skoru Gleason ≥ 7 prostat kanseri riskini belirlenmesi (≥ 59 ise risk varlığı)
ConfirmMDx	Tümör süpresör genleri GSTP1, RASSF1 ve APC'de hipermetilasyonun ölçümü	Biyopsi	İlk biyopsi sonucu negatif olan erkeklerden ikinci bir biyopsiye gerek olup olmadığının belirlenmesi
Decifer	Yüksek derece prostat kanseri riski ile ilişkili 22 genin ekspresyonunun ölçümü	Biyopsi	5 yıl içerisinde metastaz riskinin belirlenmesi ya da 10 yıl içerisinde prostat kanseri kaynaklı ölüm riskinin belirlenmesi, bu riske göre aktif gözlem ya da ileri tedavi
Prolaris	Hücre siklusu ile ilişkili 31 genin ekspresyon seviyesinin ölçümü	Biyopsi	Prostat kanserinin agresifliğinin belirlenmesi, 10 yıl içerisinde prostat kanseri nedeniyle ölüm riskinin belirlenmesi
Promark	Prostat kanseri ile ilişki sekiz proteinin düzeylerinin ölçümü	Biyopsi	Gleason $\geq 4+3$ olan prostat kanseri riskinin belirlenmesi

Son yıllarda farklı firmalar tarafından geliştirilen ve Tablo 2.6'da özetlenen kombine testler ile birçok farklı biyokimyasal, metabolik, genetik ve epigenetik değişikliklerin tespit edilmesi ve böylelikle, PSA temelindeki taramalar nedeniyle çokça tartışılan PKa'da aşırı tanı ve gereksiz tedavilerin önüne geçilmesi hedeflenmektedir. MiRNA'lar da bu hedef doğrultusunda, üzerinde çokça çalışılan biyobelirteç adayları arasında güçlü şekilde yerini almaktadır. MiRNA'ların PKa tanısının yanı sıra prognoz tahmin edilmesi, evreleme ve tedavinin takibi süreçlerinde de etkinliği üzerinde araştırmalar bütün hızıyla devam etmektedir.

2.7. MikroRNA'lar

İnsanlarda yapılan genomik çalışmalar göstermiştir ki insan genomunun yalnızca %1'i protein kodlayan genlerden oluşmaktadır. Oysa genomun yaklaşık %85'i transkribe olmaktadır. Bu demek oluyor ki genomun büyük çoğunluğu RNA'ya

transkribe edilmekte, ancak bu RNA'lardan protein kodlaması yapılmamaktadır. Protein kodlamayan bu RNA molekülleri genel olarak "noncoding RNA" (ncRNA) olarak isimlendirilmiştir. ncRNA'lar büyüklüklerine göre iki alt grupta sınıflandırılmaktadır. 200 baz çiftinden küçük olanlar "small noncoding RNA", 200 baz çiftinden büyük olanlar ise "long noncoding RNA" olarak adlandırılmaktadır. 200 bp'den küçük olan RNA'lar; short nuclear RNA (snRNA), small nucleolar RNA (snoRNA) ve mikroRNA (miRNA) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu grupta bulunan miRNA'lar, üzerinde en çok çalışma yapılan ncRNA'lardır (Malik ve Feng, 2016; Klinge, 2018).

MikroRNA'lar memeliler, mantarlar ve bitkiler gibi ökaryotik canlıların tamamında bulunan ve genomik olarak kodlanan, yaklaşık 19-25 nükleotid uzunluğundaki RNA molekülleridir. İlk keşfedilen miRNA, 1993 yılında Lee vd. tarafından tanımlanan lin-4'tür ve bir nematod olan *Caenorhabditis elegans* larvalarının gelişimsel zamanlamasının düzenlenmesinde görevli olduğu bildirilmiştir. 2000 yılında Pasquinelli vd. tarafından, yine *C.elegans* larvalarında gelişme dönemlerinin değişimi sırasında ikinci miRNA olan let-7 keşfedilmiştir. Bundan sonra miRNA'ların, içerisinde insanların da bulunduğu diğer türlerde de varlığı gösterilmiş ve bu keşif son 20 yılda bilim dünyasını heyecanlandıran en önemli gelişmelerden biri olmuştur. Şimdiye kadar insanlarda tanımlanmış olan ve mirbase veri tabanında kayıtlı 1982 prekürsör miRNA ve 2694 olgun miRNA bulunmaktadır (Lee, vd., 1993; Pasquinelli, vd., 2000; Kavitha, vd., 2015; mirbase 2018).

Komparatif genomik analizler göstermiştir ki insanda transkribe edilen mRNA'ların %60'ı miRNA için bağlanma bölgesi taşımakta ve miRNA'lar tarafından yapılan düzenlemeye uygun durumdadırlar. Diğer bir ifade ile insan genlerinin ekspresyonu %60 oranında miRNA'lar tarafından kontrol edilmektedir. miRNA'lar geleneksel olarak mRNA'nın 3'UTR (untranslated region) bölgesinde bulunan ve son yıllarda miRNA cevap elemanı (miRNA response element) olarak da adlandırılan spesifik diziye bağlanarak, embriyogenezden kansere kadar tüm biyolojik süreçlerde görev almaktadırlar (Klinge, 2018).

2.7.1. MikroRNA genlerinin genomik yerleşimi

MikroRNA genleri, tıpkı protein kodlayan genler gibi kromozomlarda lokalizedirler. Ancak, miRNA genlerinin genomik olarak daha çeşitli ve dinamik yapıda oldukları görülmektedir. miRNA genlerinin protein kodlayan genlerden farklı şekilde

organize olmaları, miRNA'ların biyogenezini ve fonksiyonlarını büyük ölçüde etkileyen karakteristik özellikler kazandırmaktadır. Birçok miRNA, kendi genlerinin birden fazla kopyasından transkribe edilebilir ya da aynı miRNA'yı kodlayan genler farklı kromozomlarda bulunabilirler. Örneğin; insan miR-26'sının 2, 3 ve 12. kromozomda lokalize olan üç paralogu bulunmaktadır (Wang, 2013).

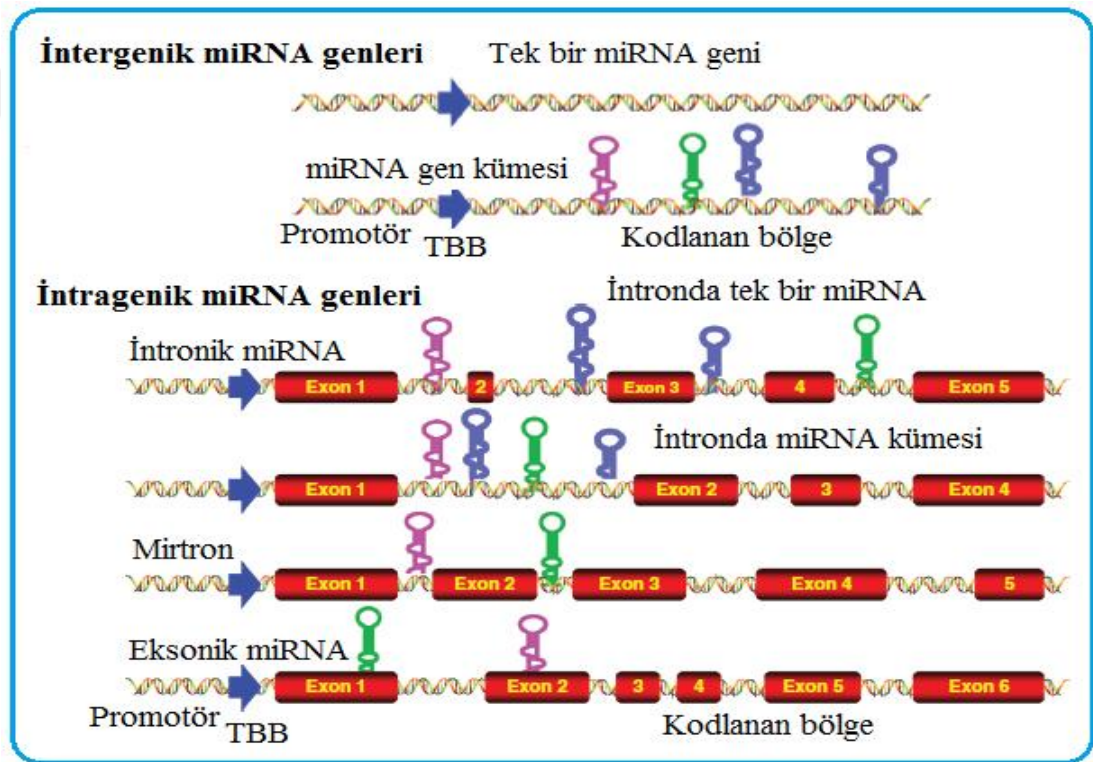
Komşu miRNA genlerinin aynı dizide ve 10 kb'lık bir alanda yerleşmesi halinde miRNA gen kümesi olarak tanımlanmaktadır. miRNA genlerinin, türden türe farklılık göstermekle birlikte, belli bir kısmı kromozomlar üzerinde gen kümeleri şeklinde organize olmuştur. İnsanda tespit edilen miRNA'lardan 352 tanesi, 99 farklı gen kümesinden transkribe edilmektedir. Bu 99 gen kümesinden 22'si aynı tohum dizisine (seed sequences) sahip iken, 62 tanesi heterojen yapıli tohum dizisine sahiptir. 15 miRNA gen kümesinde ise benzer ve heterojen tohum dizileri bir arada bulunmaktadır (Wang Y, vd., 2016). Bu gen kümelerinden transkribe edilen mikroRNA'lar prokaryotlardakine benzer şekilde polisistronik yapıdadırlar. Örneğin; miR-17-92 gen kümesinde miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20, miR-19b ve miR-92a olmak üzere 6 farklı miRNA geni yer almaktadır. Bu miRNA'lardan tohum dizileri birbirinden farklı yapıda olanların, farklı mRNA'ları hedeflemesi mümkün olabilmektedir (Olive, vd., 2013).

miRNA genleri, intergenik (genler arası) ve intragenik (gen içi) olmak üzere iki şekilde (bkz. Şekil 2.4) genomda yerleşmiş olarak bulunmaktadır.

- A. İntergenik yerleşim:** Bu tarz gen yerleşiminde, miRNA genleri protein kodlayan genler arasında yerleşmiş ayrı birer gen yapısı gösterirler. Monositronik olarak her gen bir tane miRNA kodlayabileceği gibi, polisistronik olarak birden fazla miRNA tek gende de kodlanabilmektedir (Wang, 2013).
- B. İntrogenik yerleşim:** Bu yerleşim tarzında, miRNA genleri protein kodlayan ya da uzun kodlanmayan RNA'ları (lncRNA) kodlayan genlerin içinde yer alırlar.
 - i. İntron içi genler:** miRNA genlerinin protein kodlayan genlerin intronlarında yer almasını tanımlar. İntron içerisinde yer alan genler, monositronik ya da polisistronik olabilirler. Bu tip genler, transkripsiyon için protein kodlayan genin promotorunu kullanırlar. Böylece, protein sentezi için mRNA transkribe edilirken, intronlarda kodlanan miRNA'lar da transkribe edilmiş olur. Daha sonra

“spliceosome” aşamasında intronlar uzaklaştırılırken, primer miRNA’da (pri-miRNA) serbestleştirilmektedir (Olena ve Patton, 2010).

- ii. **Mirtron:** İtronun tamamının bir prekürsör miRNA’yı (pre-miRNA) kodlaması durumudur. Bu durumda, miRNA maturasyonu için mikroişlemci kompleks (microprocessor complex) tarafından yapılan kesimin gereksiz olduğu düşünülmektedir (Olena ve Patton, 2010).
- iii. **Ekson içi genler:** Bu miRNA genleri bir kodlanmayan RNA’da intron ve eksonun üst üste gelmesi halinde görülür (Wang, 2013).

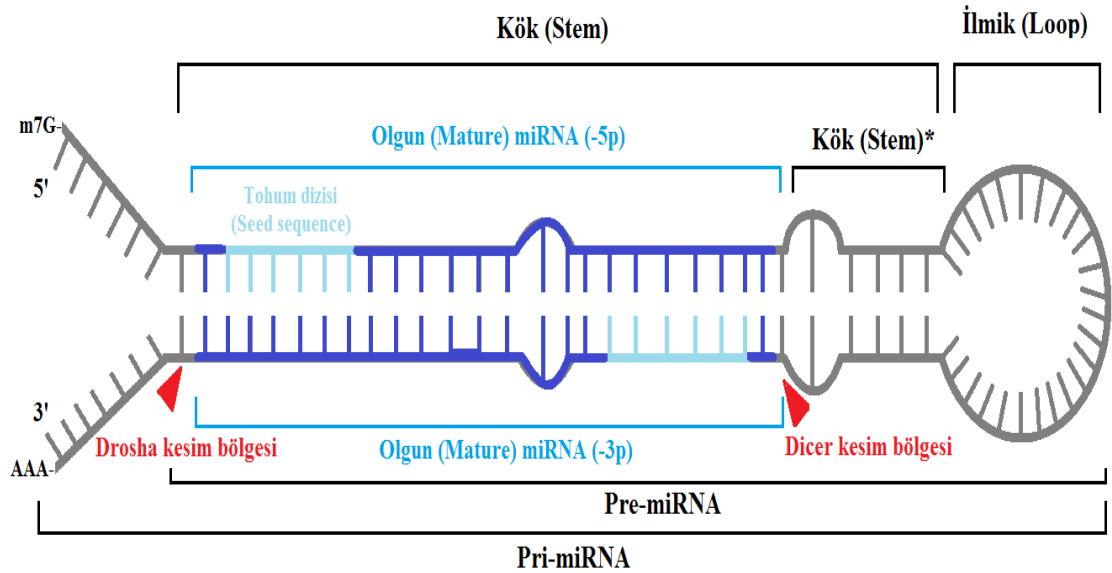


Şekil 2.4. MikroRNA genlerinin genomik organizasyonu, TBB: transkripsiyon başlama bölgesi (Wang, 2013).

2.7.2. MikroRNA'ların biyogenezi ve fonksiyonu

miRNA'ların biyogenezi, miRNA geninden polisistronik ya da monosistronik olarak, 5' şapka ve 3' poli A kuyruğu içeren yaklaşık 1000 nükleotid uzunluğunda primer miRNA transkriptinin (pri-miRNA) sentezlenmesi ile başlar. Bu transkripsiyonu katalizleyen enzim tipik olarak RNA polimeraz II olsa da bazı prekürsör miRNA'lar (pre-miRNA) RNA polimeraz III tarafından transkribe edilmektedir. Bu pri-miRNA,

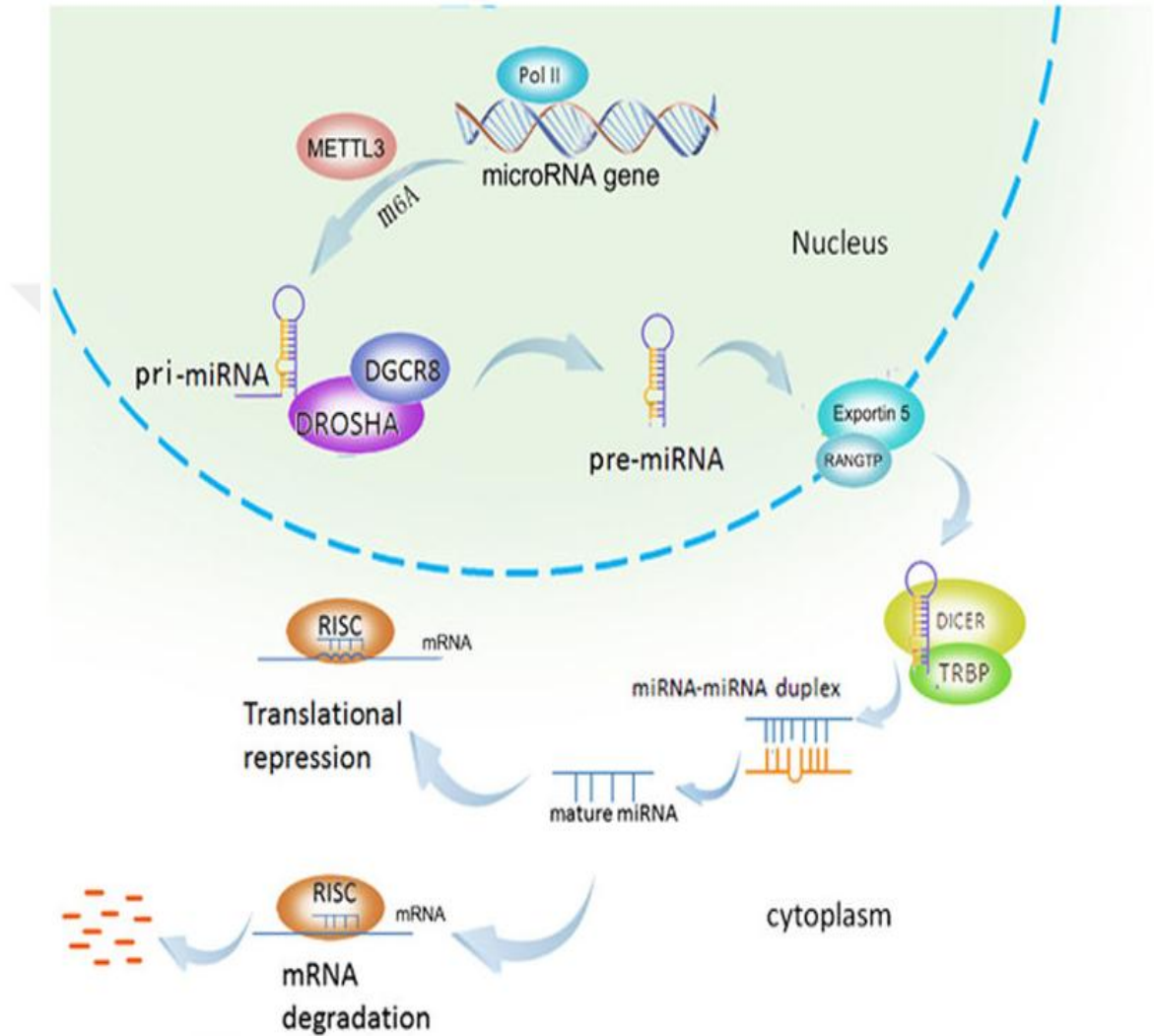
mikroışlemci kompleks adı verilen bir enzim kompleksi tarafından yaklaşık 60-70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'yı oluşturmak üzere kesilir. Mikroışlemci kompleks, çift sarmallı RNaz III enzimi olan "drosha" ve çift sarmallı RNA'ya (dsRNA) bağlanan yardımcı faktör "DiGeorge syndrome critical region 8" (DGCR8) proteininden oluşmaktadır. Drosha, iki adet RNaz III enzimi içerir ve bunların her biri kök ilmik yapısının (stem loop) tabanına doğru dsRNA'nın bir sarmalını keserek, 60-70 nükleotid uzunluğunda ve karakteristik olarak saç tokası (hairpin) yapısındaki pre-miRNA'yı serbestleştirir (Lin ve Gregory, 2015). Son zamanlarda Methyltransferase-like 3 (METTL3) enziminin pri-miRNA'yı metillediği keşfedilmiştir. Bu metilasyonun pri-miRNA'nın DGCR8 tarafından tanınması için gerekli olduğu ve miRNA'ların biyogenezinde önemli bir aşamayı teşkil ettiği belirtilmiştir (Peng ve Croce, 2016).



Şekil 2.5. MikroRNA'ların karakteristik yapısının şematik olarak gösterimi (Jevsinek Skok, vd., 2013'ten değiştirilerek yeniden çizilmiştir).

Nükleusta meydana gelen pre-miRNA, Ran-GTP bağımlı taşıyıcı bir protein olan "exportin 5" ile sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA, "dicer" isimli bir diğer RNaz III aktiviteli enzim ile kök ilmiğin yakınından kesilerek, çift sarmal yapılı miRNA:miRNA* dupleksini oluşturulur. Dicer, "transactivation-responsive RNA-binding protein" (TRBP) ile ilişkilidir. Her ne kadar dicer tarafından yapılan kesimde TRBP olması şart değilse de TRBP, çift sarmal yapıdaki RNA'ya bağlanarak, dicer tarafından yapılan kesimin doğruluğunu artırmaktadır (Lin ve Gregory, 2015). Dicer,

en komplike RNaz III enzimidir ve yapısında DExD/H-box helikaz domaini, işlevi tam olarak bilinmeyen bir domain (DUF283), bir PAZ (Piwi Argonaute Zwiller) domaini, iki adet RNase III domaini (RNase IIIa and IIIb) ve bir çift zincirli RNA bağlayıcı domaini (dsRBD) yapısında barındırır (Lau, vd., 2012).



Şekil 2.6. MikroRNA'ların biyogenezi ve etki mekanizması (Peng ve Croce, 2016).

Dicer tarafından yapılan kesim sonucu oluşan çift zincirli miRNA:miRNA* dupleksi hem olgun (mature) ya da kılavuz (guide) miRNA olarak isimlendirilen parçayı hem de komplementer ya da yolcu (passenger) miRNA olarak isimlendirilen parçayı içerir. Bu çift zincirli miRNA dupleksi, RNA ile indüklenebilir susturucu kompleks (RNA inducible silencing complex, RISC) adı verilen protein kompleksine

aktarılır. Bu aktarım sırasında TRBP'nin dicer ile RISC yapısında bulunan argonaute proteinler (AGO1, AGO2, AGO3 ya da AGO4) arasında fiziksel bir köprü vazifesi gördüğü belirtilmektedir. RISC yapısında bulunan argonaute proteinler tarafından miRNA zincirlerinden biri seçilir ve kılavuz görevini üstlenecek olgun miRNA'yı oluşturur. Diğer komplementer zincir ise degrade olur. Kılavuz olarak seçilecek miRNA zincirinin belirlenmesinde miRNA dubleksinin iki ucunun göreceli termodinamik stabilitesinin etkili olduğu ve 5' terminal nükleotidleri daha az stabil olan zincirin olgun miRNA olarak seçildiği belirtilmektedir. RISC ve kılavuz vazifesi gören olgun miRNA, birlikte miRISC olarak adlandırılır (Lin ve Gregory, 2015; Kim, vd., 2016).

miRISC yapısında AGO proteinlerinden biri ve GW182/TNRC6 (trinucleotide repeat containing 6 protein) proteini bulunur. miRISC, yapısında yer alan olgun miRNA'nın kılavuzluğunda mRNA'nın 3'UTR'sinde yer alan ve son yayınlarda miRNA cevap elamanı olarak adlandırılan yaklaşık 6-8 nükleotidlik diziyi (tohum dizisi) tanıyarak, buraya bağlanır. miRISC'in mRNA'ya bağlandığı dizideki komplementerliğin derecesine göre ya mRNA'nın translasyonu inhibe olur ya da mRNA degrade olur. Bu mekanizma ile olgun miRNA'lar protein sentezinin negatif düzenleyicisi olarak fonksiyon görmüş olurlar (Hata ve Kashima_2016).

Yapılan çalışmalarda bazı komplementer miRNA'ların da işlevsel olduğu ve translasyonun düzenlenmesinde görev alabileceği bildirilmektedir. miRanda programı ile yapılan tahminlerde aynı pre-miRNA'dan köken alan her iki miRNA zincirinin benzer sayıda geni hedeflemesinin mümkün olduğu ve olgun miRNA seçiminin miRNA'nın ortaya çıkaracağı fonksiyonel etkiyi değiştirebileceği bildirilmektedir. Ancak bu konu, bugüne kadar tam olarak aydınlatılabilmiş değildir (Marco, vd., 2012).

Yapılan bazı çalışmalarda olgun miRNA'nın mRNA'nın 3'UTR'sinin yanı sıra 5'UTR ya da açık okuma penceresine (ORF) bağlandığı yönünde de bilgiler ifade edilmiştir. İlginç olarak miRNA'nın mRNA'daki 5'UTR kısmına bağlanmasının translasyonun aktive olmasına neden olduğu bildirilmiştir. Ancak, mRNA'nın ORF bölgesi ya da 5'UTR'sinde bağlı bulunan miRNA'nın, translasyon sırasında ribozom tarafından kaldırılacağı ya da koparılacağı düşüncesi nedeniyle bu görüş genel kabul görmemiştir (Oliveto, vd., 2017).

2.7.3. MikroRNA'lar ve kanser

Kanser, kendine has bazı hücresel aşamaları içeren, çok bileşenli bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin geçirdiği bu aşamalara baktığımızda, proliferasyon yönünde uyarılma, tümör süpresör etkilerden kaçınabilme, hücre ölümüne karşı direnç kazanma, sınırsız bölünebilme yeteneği kazanma, anjiyogenezisin uyarılması, invazyon ve metastaz yeteneği kazanma, bağışıklık sisteminin etkisinden kurtulabilme gibi farklı hücresel özellikleri içerdiğini görürüz. miRNA'ların, kanserle ilişkili bu hücresel özelliklerin neredeyse tamamında rol oynadıkları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Detassis, vd., 2017). Bu hücresel süreçlerde miRNA'ların etkilerine yönelik yapılan çalışmalardan bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

Proliferasyon yönünde uyarılma: miR-27a-3p'nin sağlıklı dokulara kıyasla nazofarengeal kanserli dokularda artış gösterdiği ve nazofarengeal hücre hattı olan 5-8F hücre hattında, MAPK10'u hedefleyerek, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu artırdığı gösterilmiştir (Li ve Luo, 2017).

Tümör süpresör etkilerden kaçınabilme: miR-34a, önemli bir tümör süpresör olan p53 üzerinden etki göstermektedir. miR-34a'nın, P53 aktivasyonunun regülatörü olan "silent information regulator 1" (SIRT1) molekülünü hedeflediği gösterilmiştir. SIRT1'in miR-34a tarafından inhibisyonu P53'ün asetilasyonunda ve P21 ile "p53 upregulated modulator of apoptosis" (PUMA) ekspresyonunda bir artışa neden olarak hücre döngüsünün durmasına ve nihayetinde apoptozise yol açmaktadır (Yamakuchi, vd., 2008). Kanser hücrelerinde ise miR-34a'nın downregüle olduğu gösterilmiştir. Asadi vd. tarafından yapılan çalışmada sağlık dokulara kıyasla özofagial kanserli dokularda miR-34a'nın downregüle olduğu gösterilmiştir (Asadi, vd., 2018).

Hücre ölümüne karşı direnç kazanma: Anti-apoptotik bir protein olan bcl-2 (B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia/Lymphoma 2) ekspresyonu, miR-15a ve miR-16-1 tarafından negatif yönde düzenlenmektedir. miR-15a ve miR-16-1, kronik lenfositik lösemide genellikle downregüle olarak bulunmaktadır. Dahası miR-15a ve miR-16-1'in lösemi hücre hattına dışarıdan transfekte edilmesi ile bcl-2'nin inhibe olduğu ve hücre hattında apoptozisin aktive olduğu gösterilmiştir (Cimmino, vd., 2005).

Sınırsız bölünebilme yeteneği kazanma: PKa'lı hastaların doku ve serum örneklerinde yapılan çalışmada, miR-128'in hem serum hem de dokudaki seviyelerinin sağlıklı doku ve seruma kıyasla düşük olduğu gösterilmiştir (Sun, vd., 2015). Guzman vd. tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise miR-128'in telomeraz enziminin katalitik

kısmı olan telomeraz revers transkriptazı (TERT) inhibe ettiği gösterilmiştir. Telomeraz, telomer stabilitesinin sürdürülmesi ve kanser hücrelerinde sınırsız çoğalma kapasitesinin kazanılabilmesi için gerekli olan bir enzimdir. miR-128 tarafından TERT enziminin inhibisyonu, kanser hücrelerinin sınırsız çoğalma yeteneğinin ve onkogenik fenotipin inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (Guzman, vd., 2018).

Anjiyogenezin uyarılması: Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), kanserin progresyonu sırasında anjiogenez ve metastaz sürecinde rolü olan bir moleküldür. Ghosh vd. tarafından yapılan çalışmada, miR-199a-3p'nin hepatosellüler kanserli (HCC) dokularda downregüle olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada invitro ortamda miR-199a-3p'nin deneysel olarak aşırı ekspresyonunun; VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve matriks metalloproteinaz 2 (MMP2) molekülleri üzerinden anjiogenezi, invazyonu ve tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Ghosh, vd., 2017).

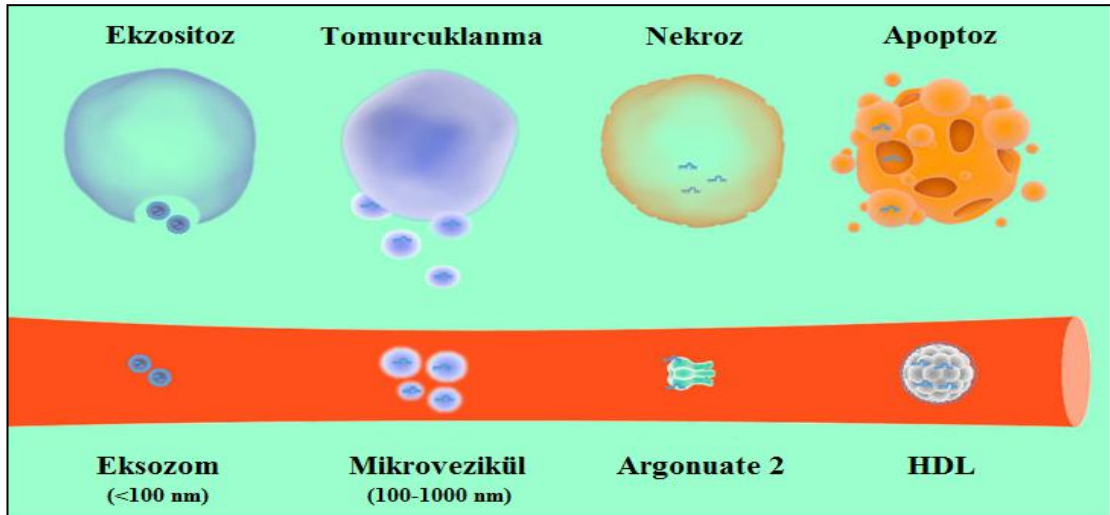
İnvazyon ve metastaz yeteneği kazanma: Kanser kaynaklı ölümlerin temel nedeni kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yeteneklerinin olmasıdır. İnvazyon ve metastaz sürecinde miRNA'ların rol oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin; Daugaard vd. tarafından akciğer adenokarsinomlu dokular üzerinde yapılan bir çalışmada, miR-30a-3p'nin azalmış ekspresyonu ve miR-210-3p'nin artmış ekspresyonunun, uzak metastaz ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Daugaard, vd., 2017). Bir diğer çalışmada ise over kanseri hücrelerinde miR-9'un e-kaderin ekspresyonunu baskılayarak, mezenkimal belirteçler olan vimentin ve N-kaderin ekspresyonunu artırdığı belirtilmiştir. Böylece, miR-9'un over kanserinde hücre migrasyonu ve invazyonla ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Zhou, vd., 2017).

Bağışıklık sisteminin etkisinden kurtulabilme: miRNA'ların kanser hücreleri ile bağışıklık sistemi arasındaki ilişkide rolü olup olmadığını Khorrami vd., tarafından miR-146a örneği üzerinden araştırılmıştır. Bunun için kolorektal kanser hücre hattı ile sağlıklı gönüllülerden elde edilen periferik kan mononükleer hücreleri birlikte kültüre edilmiştir. Sonuçta, kanser hücrelerinde miR-146a'nın aşırı ekspresyonunun, immun sistemi baskılayıcı özelliği olan T_{reg} hücrelerinin (regulatory t cell) sayısında artışa neden olduğu ve aynı zamanda, anti-inflamatuvar sitokinlerden TGF- β ve IL-10 seviyelerinin de arttığı bildirilmiştir (Khorrami, vd., 2017).

2.7.4. Dolaşımdaki miRNA'lar, biyobelirteç olma özellikleri ve tespit yöntemleri

miRNA'ların dolaşımda tespit edildiği ilk çalışmalar 2008 yılında Lawrie vd. ile Mitchell vd. tarafından yapılan çalışmalardır. Lawrie vd. yaptıkları çalışma ile diffuz büyük B hücreli lenfomada miR-21'in serumda yüksek düzeylerde bulunduğunu göstermişlerdir. Mitchell vd. ise PKA'da miR-141'in serumdaki seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, miRNA'ların oda ısısında 24 saat inkübasyon sonrası serumdaki seviyelerinin değişmediği, çoklu dondurma ve çözündürme reaksiyonlarına karşı dirençli oldukları ve bu özellikleri nedeniyle stabil bir biyobelirteç olabilecekleri belirtilmiştir (Lawrie, vd., 2008; Mitchell, vd., 2008).

miRNA'ların dolaşımdaki varlıklarının tespiti ile birlikte, dolaşımda yer alan miRNA'ların kaynağı ve nasıl dolaşıma geçtikleri ayrı bir çalışma konusu olmuştur. Bu konuda yapılan çalışmalarda, miRNA'ların başlıca 4 şekilde dolaşımda bulundukları söylenebilir. Bunlar; eksozom ya da mikroveziküller içinde, apoptotik cisimlerin içinde, HDL gibi lipoproteinlerin içinde ve RISC'i oluşturan proteinlerden biri olan Ago-2 proteinle ya da nükleofosmin gibi bir proteinle birlikte dolaşımda bulunabildikleri gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda miRNA'ların sadece kanda bulunmayıp, idrar, süt, göz yaşı, tükürük, beyin omurilik sıvısı, bronşial lavaj sıvısı, amniyon sıvısı, peritoneal ve plevral sıvıda da yer aldıkları gösterilmiştir (Endzelins, vd., 2016).



Şekil 2.7. Dolaşımdaki miRNA'ların kaynakları (Hamam, vd., 2017'den değiştirilerek alınmıştır).

Mevcut araştırmalar göstermektedir ki miRNA'lar sadece dolaşımda pasif olarak bulunmayıp, aynı zamanda eksozomlar içerisinde ya da proteinlere bağlı olarak taşınarak, hücreler arası iletişimde hormon benzeri bir şekilde endokrin etkilere sahip olması muhtemel moleküllerdir (Cortez, vd., 2011).

miRNA'ların, uygun bir biyobelirte te olması gereken stabiliteye sahip olup olmadıkları çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiştir. Balzano vd. tarafından yapılan çalışmada sekiz miRNA'nın (miR-125b-5p, miR-425-5p, miR-200b-5p, miR-200c-3p, miR-579-3p, miR-212-3p, miR-126-3p ve miR-21-5p) dondurulmuş plazma örneklerindeki stabiliteleri değerlendirilmiştir. -80 C'de 6 ay ve 12 ay dondurulan örneklerde miRNA seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Aynı çalışmada 3 yıl süreyle dondurulan plazma örneklerinde dahi miRNA seviyelerinin değişmediği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada 4 yıl, 10 yıl ve 11 yıl süre ile dondurulmuş örneklerde, sadece miR-126-3p seviyelerinin azaldığı diğer miRNA seviyelerinin ise stabil oldukları belirlenmiştir (Balzano, vd., 2015).

miRNA'ların dondurularak uzun süre saklanabilme özelliklerinin yanı sıra vücut sıvılarında bulunan RNazlara da dirençli oldukları bildirilmiştir. RNaz'lara dirençli olmaları, dolaşımda proteinlere bağlı halde bulunmaları ya da lipid yapılı veziküller içerisinde yer almaları ile ilişkilendirilmiştir. miRNA'lar aynı zamanda yüksek ve düşük pH seviyelerine de dirençlidirler. Yapılan çalışmalarda miRNA'ların her iki cinsiyette de benzer düzeylerde dolaşımda yer aldıkları, yaşa göre de dolaşımdaki seviyelerinin değişiklik göstermediği belirtilmiştir. Bütün bu özellikleri, miRNA'ların stabil bir biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri yönündeki düşünceyi desteklemiştir (Allegra, vd., 2012).

miRNA'lar çeşitli vücut sıvılarından kolayca tespit edilebiliyor olmaları, yukarıda bahsedilen biyobelirteç olma özelliklerini destekler mahiyettedir. miRNA'ların dolaşımdaki seviyeleri, kantitatif RT-PCR, mikroarray ve yeni nesil dizileme (next generation sequencing) teknikleri ile belirlenebilmektedir. Kantitatif real time PCR, miRNA tespitinde kullanılan sensitif bir yöntemdir ve çok küçük miktarlarda örnek kullanılarak, miRNA seviyelerinin belirlenebilmesine izin verir. Mikroarray platformu, miRNA'yı tespit etmek için alternatif bir yöntemdir. Bu yöntemin avantajı, çok sayıda dolaşımdaki miRNA'yı eşzamanlı olarak tespit etme kabiliyetidir. Yeni nesil dizileme tekniği temelinde derin dizi analizi (deep sequencing) yönteminin kullanılmasıyla, yeni miRNA'ların tespit edilmesinde keskin artışlar yaşanmıştır. Bu

teknik, bilinen ya da bilinmeyen bir çok miRNA'yı tespit edebilmektedir. En önemli dezavantajı, büyük miktarda başlangıç materyali gerektirmesi ve ancak kompleks biyoinformatik araçlarla analiz edilebilecek bol miktarda veri ortaya çıkarmasıdır (Hamam, vd., 2017).

Bahsedilen yöntemlere ilaveten, elektrokimyasal bir yöntem kullanarak, PCR kullanmaksızın, hızlı ve basit bir şekilde dolaşımdaki miRNA'ların tespit edilebildiği belirtilen bir yöntem tanımlanmıştır (Lusi, vd., 2009). Ayrıca son yıllarda, dijital moleküler barkod teknolojisinin kullanıldığı "NanoString nCounter" teknolojisi ile miRNA'ların amplifiye etmeye gerek kalmaksızın düzeylerinin belirlenebileceği bir yöntem geliştirilmiştir (Wang H, vd., 2016). Ayrıca dijital PCR olarak tanımlanan bir teknik ile küçük miktarlardaki miRNA seviyeleri, herhangi bir endojen ya da eksojen kontrol kullanmaksızın sayısal olarak belirlenebilmektedir. Bu yöntemin analitik duyarlılığı ve tekrarlanabilirliğinin geleneksel qRT-PCR uygulamalarına göre daha iyi olduğu bildirilmektedir (Ma, vd., 2013).

Dolaşımdaki miRNA'ların ölçümünde en önemli aşamalardan birisi, qRT-PCR ile elde edilen Ct (threshold cycle) değerlerinin normalizasyonudur. Normalizasyon için kullanılan endojen ve eksojen kontroller hakkında, literatürde farklı görüşler bulunmaktadır. PKa'da dolaşımdaki miRNA'ların normalizasyonu için kullanılmak üzere validasyonu yapılmış bir referans kontrol bulunmamaktadır. Sanders vd. tarafından yapılan çalışmada SNORD43'ün üriner sistem malignitelerinde dolaşımdaki miRNA'ların normalizasyonu için uygun bir endojen kontrol olduğu ifade edilmiştir. Aynı çalışmada RNU6-2, RNU1-4, miR-106a, let-7a ve SNORD48'in stabilitelerinde yüksek olduğu ve kontrol olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir. Schaefer vd. ise PKa dokusunda yapılacak çalışmalarda miR-130b ya da miR-130b ve RNU6-2'nin geometrik ortalamasının normalizasyon için kullanılmasını önermişlerdir. Endojen kontrollerin kullanılarak miRNA'ların kantifikasyonlarındaki net olmayan durum ve hemoliz gibi faktörlerden etkilenebiliyor olmaları nedeniyle, eksojen kontrol kullanımı önerilmiştir. Eksojen kontrol olarak, *C. Elegans* miR-39 (ce-miR-39), ce-miR-54, ce-miR-238 ve *Arabidopsis thaliana* miR-159a (ath-miR-159a) sentetik miRNA'larının fenolik fazda numunelere ilave edilerek kullanılması önerilmiştir. Daha sonra eksojen kontroller arasında yapılan çeşitli çalışmalarda en ideal normalizasyonun ce-miR-39 ile yapılan normalizasyon olduğu ifade edilmiştir (Sanders, vd., 2012; Schaefer, vd., 2010; Filella ve Foj, 2017).

2.7.5. MikroRNA'lar ve prostat kanseri

MikroRNA'lar hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptoz gibi süreçlerde rol oynamaktadır. Bu nedenle miRNA'lar ile kanser arasında ilişki olabileceği düşündürmüştür. Bu düşünceden hareketle yapılan çalışmalarda miRNA'lardaki ekspresyon değişikliklerinin birçok kanser türünün başlangıcı ve prognozu ile ilişkili olduğunun belirlenmesi ve miRNA genlerinin yaklaşık yarısının kanserle ilişkili gen bölgelerinde bulunduğu gösterilmesi ile kanserle ilişkili biyolojik süreçlerde, miRNA'ların onkogenik ve tümör süpresör olarak işlev görebileceği keşfedilmiştir. Kanserde upregüle olarak tespit edilen miRNA'lar onkogenik olarak sınıflandırılırken, downregüle olarak tespit edilen miRNA'lar tümör süpresör olarak sınıflandırılmaktadırlar (Pang, vd., 2010).

Kanser ve miRNA'lar arasındaki ilişki ilk olarak 2002 yılında Calin vd. tarafından yapılan çalışma ile ortaya konulmuştur. Bu çalışmada, KLL hastalarında miR-15a ve miR-16-1'in downregülasyonu gösterilmiştir (Calin, vd.,2002). Bu çalışmadan sonra PKa ve diğer kanser türlerinde miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve progresyon gibi bir çok süreçte gösterilmiştir. İlk başları daha çok hücre hatları ve PKa dokuları üzerinde miRNA'ların PKa gelişiminde ve ilerlemesindeki rolleri araştırılmıştır. Daha sonraları ise miRNA'ların PKA'lı dokularda biyobelirteç olarak rolleri ve nihayetinde kan , idrar ve prostatik sekresyon gibi örneklerdeki seviyelerinin; PKa'nın agresifliği, evreleme, prognoz tahmini, metastazın belirlenmesi ve tedavi süreçlerinde hedef molekül olma özellikleri gibi konular üzerindeki çalışmalar yoğunluk kazanmıştır.

Lewis vd. tarafından yapılan çalışmada miR-888'in PKa metastatik hücre hattında (PC3-ML) non-invaziv hücre hattına (PC3-N) kıyasla aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda miR-888 özellikle seminal vezikül invazyonu olan PKa hastalarından alınan tümör örneklerinde de yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Bu çalışmada miR-888'in tümör süpresör proteinler olan "retinoblastoma-like 1" (RBL1) ve SMAD4 ekspresyonunu baskılayarak, PKa'nın ilerlemesine katkı sağladığı bildirilmiştir (Lewis, vd., 2014).

Liu vd. PKa hücre hattında yaptıkları çalışmada, miR-21'in DU145 hücre hattına transfeksiyonu ile sağlanan aşırı ekspresyonunun, PTEN'i hedefleyerek kanser gelişimini indüklediği, Akt (diğer adı Protein Kinaz B) ve hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2) yolu aktivasyonu ile hipoksiyle uyarılabilir faktör 1α (HIF1α) ve

vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu artırdığını ve angiogenezde önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir (Liu, vd., 2011). Li vd. tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise anti-miR-21 oligonükleotidi verilen PKa hücre hatlarında, hücre proliferasyonunda bir değişim gözlenmemiş ancak, hücre motilitesi ve invazyon kabiliyetinde azalma gözlenmiştir. Bu çalışmada, hücre motilitesinde anahtar role sahip "myristoylated alanine-rich protein kinase c substrate" (MARCKS)'ın miR-21'in hedeflerinden biri olduğu gösterilmiştir (Li, vd., 2009).

miRNA'ların PKa'lı doku örneklerindeki seviyelerini belirlemeye yönelik ilk çalışma, 2006 yılında Volinia vd. tarafından yapılmıştır. Mikroarray temelinde yapılan bu çalışmada, 56 adet PKa'lı dokuyu da içeren 363 primer tümör dokusu ve 177 normal doku örneği üzerinde 228 miRNA'nın düzeyleri araştırılmıştır. PKa'lı dokularda 39 miRNA (let-7d, let-7i, miR-101-1 prec, -106a, -124a-1, -135-2, -146, -148, -16-1, -17-5p, -181b-1, -181b-1 prec, -184 prec, -187, -191, -195, -196-1, -196-1, -197, -198, -199a-1, -199a-2, -203, -206, -20a, -21, -214, -223, -25, -26a-1, -27a, -29a, -29b-2, -30c, -32, -34a, -92-2, -93-1, -95) upregüle olarak tespit edilirken, 6 miRNA (let-7a-2 prec, miR-128a prec, -218-2, -29a prec, -149, -24-1) downregüle olarak tespit edilmiştir (Volinia, vd., 2006).

Porkka vd. tarafından yapılan dokuz PKa'lı doku ve dört BPH'lı doku örneği üzerinde 319 miRNA'nın değerlendirildiği bir çalışmada ise 22 miRNA'nın (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7g, miR-16, -23a, 23b, 26a, -92, 99a, -103, -125a, 125b, -143, -145, -195, -199a, -199a*, -221, -222, -497) PKa örneklerinde downregüle olduğu, 8 miRNA'nın (miR-202, -210, -296, -320, -370, -373*, -498, -503) upregüle olduğu bildirilmiştir (Porkka, vd., 2007).

Daha yakın zamanlarda Carlsson vd. tarafından 20 PKa hastasından alınan kanserli doku ve komşu normal dokular üzerinde yapılan çalışmada mikroarray tekniği ile 667 miRNA seviyesi araştırılmıştır. Bu çalışmada 9 miRNA'nın (miR-126, -34a, -622, -195, -26a, -30d, -29a, -425, -342-3p) tutarlı bir şekilde kanserli doku ve komşu normal dokular arasında farklı olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda kanserli doku örneklerinde belirlenen bu dokuz miRNA profilinin gleason skoru ile de uyumlu olduğu belirtilmiştir (Carlsson, vd., 2011).

Farklı etnik kökene sahip hasta grubunun da değerlendirildiği, PKa dokusu ve idrar örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada, 377 adet miRNA'nın seviyeleri mikroarray tekniği ile değerlendirilmiş, değişim tespit edilen miRNA'lar qRT-PCR ile

doğrulanmıştır. Bu çalışmada miR-205, miR-214, miR-221 ve miR-99b'nin PKa'lı doku örneklerinde, komşu normal dokulara kıyasla önemli düzeyde downregüle olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, miR-99b'nin Afrika kökenli Amerikalılar'dan alınan PKa'lı dokularda, Beyaz Amerikalılar'dan alınanlara kıyasla daha fazla oranda downregüle olduğu bildirilmiştir. İdrar örneklerinde yapılan çalışmada ise miR-205 (AUC=0.708) ve miR-214'ün (AUC=0.743) PKa'lı hastaları sağlıklı kişilerden ayırt edebileceği bildirilmiştir (Srivastava, vd., 2013).

Dolaşımda yer alan miRNA'ların 2008 yılında ilk olarak tespit edilmesinden sonra miRNA'ların PKa'nın tanısı, prognozu ve progresyonunun belirlenmesinde biyobelirteç olarak performanslarının değerlendirildiği çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda 74 adet miRNA PKa'da biyobelirteç olarak aday gösterilmiş, bunlardan 25'i için ise birden fazla çalışmada uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Filella ve Foj, 2017).

Chen vd. ilk önce 25 PKa'lı hasta ve 17 BPH'lı hastanın plazma örneklerinde mikroarray tekniği ile 1146 adet miRNA'nın seviyelerini araştırmışlardır. PKa ile BPH arasında farklılık gözlemlenen miRNA'lar, aynı hasta örnekleri üzerinde qRT-PCR tekniği ile çalışılmıştır. En sonunda 80 PKa, 44 BPH ve 54 sağlıklı kontrolden oluşan hasta plazmalarında qRT-PCR ile doğrulama çalışması yapmışlardır. Çalışma sonunda, 5 miRNA'dan oluşan bir panelin (miR-622, miR-1285, let-7e, let-7c ve miR-30c) PKa'lı hasta grubunu BPH'dan ayırmadaki AUC değerini 0.924 ve sağlıklı kontrollerden ayırmadaki AUC değerini ise 0.860 olarak hesaplamışlardır. Bu miRNA'ların PKa'yı sağlıklı kontrollerden ayırmadaki ayrı ayrı sensitivite ve spesifisiteleri sırasıyla; let-7c için %68.5 ve %70, let-7e için %77.8 ve %75, miR-30c için %79.6 ve %68.8, miR-622 için %90 ve %63, miR-1285 için %61.3 ve %57.4 olarak bildirilmiştir (Chen, vd., 2012).

Moltzahn vd. CAPRA skoruna göre düşük, orta ve yüksek riskli gruplara ayrılan 36 PKa ve 12 sağlıklı gönüllünün serumunda, multiplex qRT-PCR kullanarak yaptıkları çalışmada, 10 miRNA düzeyinde farklılık tespit etmişlerdir. Bu miRNA'lardan 4 tanesi (miR- 223, -26b, -30c ve -24) PKa'da downregüle iken, 6 tanesi (miR-20b, -874, -1274a, -1207-5p, -93 ve -106a) ise upregüle olarak belirlenmiştir. ROC analizi ile miRNA'ların PKa'nın ayırımındaki tanısal performansları değerlendirildiğinde; miR-106a, -223, -1207, -24, -93, -874 ve -1274 için AUC sırasıyla 0.928, 0.876, 0.812, 0.778, 0.907, 0.845 ve 0.928 olarak tespit edilmiştir (Moltzahn, vd., 2011).

Dolaşımda yer alan miRNA'ların belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalardan biri de Nguyen vd. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, 28 adet düşük riskli lokalize PKa'lı, 30 adet yüksek riskli PKa'lı ve 26 adet metastatik ve kastrasyona dirençli PKa'lı hastadan alınan serum örnekleri üzerinde yapılmıştır. Mikroarray tekniği ile 669 miRNA'nın düzeyi araştırılmış ve gruplar arası farklılık tespit edilen miRNA'lar qRT-PCR ile kantifiye edilmiştir. Sonuçta, miR-375, miR-141 ve miR-378* düzeyleri metastatik kastrasyona dirençli PKa grubunda, düşük riskli lokalize PKa'lı gruba kıyasla upregüle olarak tespit edilmiş iken, miR-409-3p düzeyleri downregüle olarak tespit edilmiştir (Nguyen, vd., 2013).

Cochetti vd. literatürde yer alan çalışmalarda tespit edilmiş olan bazı miRNA'ları (let-7c, let-7e, let-7i, miR-26a-5p, miR-26b-5p, miR-24-3p, miR-23b-3p, miR-27b-3p, miR-106a-5p, miR-20b-5p, miR-18b-5p, miR-19b-2-5p, miR-363-3p, miR-497, miR-195, miR-25-3p, miR-30c-5p, miR-622, miR-874-3p, miR-346 ve miR-940) seçerek, bu miRNA'ların 64 PKa'lı hasta ve 60 BPH'lı hastanın serumundaki seviyelerini qRT-PCR ile araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda let-7c, let-7e, let-7i, miR-26a-5p, miR-26b-5p, miR-18b-5p ve miR-25-3p'nin serumdaki ekspresyon seviyelerinin BPH'lı hasta grubuna kıyasla PKa'lı hastalarda downregüle olduğunu gözlemlemişlerdir. Bunlar içerisinde en yüksek spesifisitenin %93.75 ile miR-18b-5p için hesaplandığı, en yüksek sensitivitenin ise %38.46 ile miR-25-3p için hesaplandığını bildirmişlerdir. Ayrıca miR-25-3p ve miR-18-5p'nin kombinasyonunun sensitivitesinin yaklaşık 5 puan artarak %44.44 olduğunu bildirmişlerdir (Cochetti, vd., 2016).

Konu ile ilgili son yıllarda yapılan bir diğer çalışma Kachakova vd. tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada let-7c, miR-30c, miR-141 ve miR-375'in ekspresyon seviyeleri; 59 PKa'lı hasta, 16 BPH'lı hasta ve 11 asemptomatik genç erkekten (ortalama yaş 27) oluşan kontrol grubundan alınan plazma örneklerinde ölçülmüştür. Bu çalışmada PKa'da BPH grubuna kıyasla en fazla downregülasyon miR-375'te izlenmiştir. miR-375'in PKa'yı BPH'tan ayırmadaki tanısal doğruluğu %83.5 olarak hesaplanmıştır. Bu dört miRNA'nın kombinasyonunun AUC değeri ise 0.877 olarak hesaplanmıştır (Kachakova, vd., 2015).

Tablo 2.7. Prostat kanserinin ayırıcı tanısında dolaşımda tespit edilen miRNA'lar (Filella ve Foj, 2017'den değiştirilerek alınmıştır).

Kaynak	Çalışmaya katılan hasta sayısı	Artan miRNA	Azalan miRNA	Metot	Normalize edici	Örnek
Mitchell, vd., 2008	25 metastatik PKa, 25 sağlıklı kontrol	miR-141	-	qRT-PCR	ce-miR-39 ce-miR-54 ce-miR-238	Serum
Moltzahn, vd., 2011	12 düşük riskli PKa, 12 orta riskli PKa, 12 yüksek riskli PKa, 12 sağlıklı erkek	PK'da sağlıklı gruba kıyasla: miR-874, -1274a, -1207-5p, -93 ve -106a Yüksek riskli grupta sağlıklı gruba kıyasla: miR-451	PK'da sağlıklı gruba kıyasla: miR-223, -26b, -30c ve -24	Multipleks qRT-PCR	Ortanca Δ Ct	Serum
Zhang, vd., 2011	20 lokalize PKa, 20 androjen bağımlı PKa, 10 hormona dirençli PKa ve 6 BPH	miR-21	-	qRT-PCR	RNU6	Serum
Agaoglu, vd., 2011	51 PKa (20 metastatik), 20 sağlıklı kontrol	miR-21 ve -221	-	qRT-PCR	RNU1A	Plazma
Mahn, vd., 2011	37 lokalize PKa, 8 metastatik PKa, 18 BPH, 20 sağlıklı kontrol	PKa'da BPH'a kıyasla: miR-26a, -195 ve let7i	-	qRT-PCR	ce-miR-39	Serum
Brase, vd., 2011	Tarama: 14 lokalize PKa ve 7 metastatik PKa 1. Doğrulama: 45 PKa 2. Doğrulama: 71 PKa (42 N1 ile 23 N0; 29 gleason $\geq$ 8 ile 42 gleason 7)	miR-375, -9*, -141, -200b ve -516a-3p	-	Mikroarray qRT-PCR	ce-miR-39 ce-miR-54 ce-miR-238	Serum
Shen, vd., 2012	82 PKa (D'Amico skoruna göre 38 düşük risk, 27 orta risk, 17 yüksek risk)	Yüksek ve orta risk skorunda düşük risk skoruna kıyasla: miR-21 ve -145	-	qRT-PCR	Standart eğri ile kantitatif	Plazma
Selth, vd., 2012	25 metastatik kastrasyona dirençli PKa, 25 sağlıklı kontrol	miR-141, -298 ve -375	-	qRT-PCR	ce-miR-39	Serum
Bryant, vd., 2012	1. çalışma: 78 PK, 28 sağlıklı erkek 2. çalışma: 119 radikal prostatektomi sonrası PKa (72 rekürrens olmayan, 47 metastazi olan)	miR-107, -130b, -141, -2110, -301a, -326, -331-3p, -432, -484, -574-3p ve -625	miR-181a-2*	Mikroarray qRT-PCR	ce-miR-39	Plazma ve Serum (Mikro vezikül)
Chen vd., 2012	Tarama: 17 BPH ve 25 PKa Doğrulama : 44 BPH, 80 PKa, 54 sağlıklı kontrol	miR-622 ve -1285	let-7e, let-7c ve miR-30c	Mikroarray qRT-PCR	RNU6	Plazma
Sanders, vd., 2012	24 PKa, 48 diğer kanser, 48 sağlıklı kontrol	-	-	qRT-PCR	ce-miR-39 SNORD43	Serum
Nguyen, vd., 2013	28 düşük riskli PKa, 30 yüksek riskli PKa, 26 metastatik kastrasyona dirençli PKa	Metastatik PKa'da düşük riskli PKa'ya kıyasla: miR-375, -378*, -141	Metastatik PKa'da düşük riskli PKa'ya kıyasla: miR-409-3p	Mikroarray qRT-PCR	RNU6	Serum

Tablo 2.7. Prostat kanserinin ayrııcı tanısında dolaşımda tespit edilen miRNA'lar (Devam ediyor).

Kaynak	Çalışmaya katılan hasta sayısı	Artan miRNA	Azalan miRNA	Metot	Normalize edici	Örnek
Watahiki, vd., 2013	25 lokalize PKa, 25 metastatik kastrasyona dirençli PKa	Metastatik PKa'da lokalize PKa'ya kıyasla: miR-141, -375, -200c, -126, -21, -151-3p, -152 ve -423-3p	Metastatik ile lokalize PKa kıyaslaması: miR-205 ve -16	Mikroarray qRT-PCR	miR-30e	Plazma
Cheng, vd., 2013	Tarama: 25 metastatik kastrasyona dirençli PKa, 25 yaşları benzer kontrol Doğrulama: 21 metastatik kastrasyona dirençli PKa, 20 yaşları benzer sağlıklı kontrol	miR-141, -200a, -200c, -210, -375	-	Mikroarray qRT-PCR	ce-miR-39 ce-miR-54 ve ce-miR-238	Serum
Sapre, vd., 2014	37 düşük riskli PKa ve 33 yüksek riskli PKa	-	-	Mikroarray qRT-PCR	Geometrik ortalama	Plazma
Srivastava, vd., 2014	Tarama: 12 PKa Doğrulama: 40 PKa ve 32 sağlıklı kontrol	-	miR-25, -101, -628-5p	Mikroarray qRT-PCR	miR-223	Serum
Wang, vd., 2014	Araştırma: 48 düşük riskli PKa, 48 gleason $\geq$ 7 PKa Doğrulama: 25 düşük riskli PKa, 35 gleason $\geq$ 7 PKa	miR-19a, -19b	-	Multipleks qRT-PCR	Ortanca Ct	Serum
Haldrup, vd., 2014	13 BPH, 11 lokalize PKa, 9 lenf nodu ya da uzak metastazı olan, 11 kastrasyona dirençli PKa	PKa'da BPH'a kıyasla: miR-17*, -200b*, -210, -297, -375, -501-3p, -551b ve -562	-	Kullanıma hazır PCR qRT-PCR	miR-320a UniSp3	Serum
Huang X, vd., 2014	Tarama: 23 ADT başarısız olan PKa Takip eden çalışma: 100 ADT başarısız olan PKa	miR-1290 ve -375	-	RNA dizileme qRT-PCR	miR-30a-5p miR-30e-5p	Plazma eksozom
Westerman n, vd., 2014	54 PKa, 79 malign olmayan kontrol	-	-	qRT-PCR	RNU1-4 SNORD43	Serum
Singh, vd., 2014	Radikal prostatektomi sonrası progresyon gösteren 31 PKa, progresyon göstermeyen 62 PKa	miR-125b ve -222	miR-103	qRT-PCR	Tüm miRNA ortalaması	Serum
Santos, vd., 2014	45 PKa hastası	Kastrasyona dirençli PKa gelişimi sırasında: miR-7 ve -221	-	qRT-PCR	RNU44	Periferal tam kan

Tablo 2.7. Prostat kanserinin ayırıcı tanısında dolaşımda tespit edilen miRNA'lar (Devam ediyor).

Kaynak	Çalışmaya katılan hasta sayısı	Artan miRNA	Azalan miRNA	Metot	Normalize edici	Örnek
Kotb, vd., 2014	10 PKa, 10 BPH	miR-21 ve -221	-	qRT-PCR	SNORD47	Serum
Mihelich, vd., 2015	100 tedavi edilmemiş PKa (50 düşük risk, 50 yüksek risk), 50 BPH	-	Yüksek riskli grupta düşük riskli ve BPH'a kıyasla: let-7a, miR-24, -26b, -30c, -93, -103, -106a, -107, -130b, -146a, -223 ve -451	qRT-PCR	Sp3, Sp6 ce-miR-39 Total RNA	Serum
Li, vd., 2015	8 metastatik PKa, 6 radikal prostatektomi uygulanmış PKa, 10 sağlıklı kontrol	miR-375, -21 ve -574	-	qRT-PCR	Ortalama Ct değerleri	Serum eksozom
Kelly, vd., 2015	75 PKa, 27 biyopsi sonucu negatif hasta	miR-141, -145 ve -155	let-7a	qRT-PCR	miR-16 miR-425	Tam kan
Kachakova, vd., 2015	59 PKa, 16 BPH, 11 asemptomatik genç erkek	-	PKa'da BPH'a kıyasla: miR-375	qRT-PCR	RNU6	Plazma
Cochetti, vd., 2016	64 PKa, 60 BPH	-	let-7c, let-7e, let-7i, miR-26a-5p, -26b-5p, -18b-5p ve -25-3p	qRT-PCR	miR-191-5p miR-425-5p	Serum
Sharova, vd., 2016	36 PKa, 31 BPH	miR-21, -106a ve -20a	miR-223	qRT-PCR	miR-24	Plazma
Wang J, vd., 2016	149 PKa, 57 sağlıklı kontrol, 122 BPH ve diğer ürolojik hastalıklar	miR-410-5p	-	qRT-PCR	RNU6	Serum
Souza, vd., 2017	102 PKa, 50 sağlıklı kontrol	miR-200b ve -200c	-	qRT-PCR	RNU6B RNU48	Plazma
Endzelins, vd., 2017	50 PKa (26 gleason ≤ 6 ve 24 gleason ≥ 8), 22 BPH	PKa'da BPH'a kıyasla plazmada: miR-375 PKa'da BPH'a kıyasla hücre dışı veziküllerde: miR-21-5p, -200c-3p	-	qRT-PCR	UniSp6	Plazma Hücre dışı vezikül

PKa: Prostat kanseri, BPH: Benign prostat hiperplazisi

Tablo 2.7'de özetlendiği gibi 2008 yılından bu yana serum ve plazma örnekleri kullanılarak PKa'nın tanı, prognoz ve progresyonunun tahmini için miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımlarına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların yanı sıra idrar ve prostatik sekresyon örneklerinde bulunan miRNA'ların biyobelirteç olarak performanslarının değerlendirildiği bazı çalışmalar da yayınlanmıştır.

Bryant vd. tarafından 70 lokal PKa, 48 ileri evre kanser ve 17 sağlıklı kontrolden alınan idrar örnekleri üzerinde yapılan çalışmada, seçilmiş 5 miRNA'nın (miR-107, -574-3p, -375, -200b ve -141) seviyeleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, miR-107 ve miR-574-3p'nin idrardaki seviyelerinin PKa'lı hasta örneklerinde sağlıklı gönüllülere kıyasla önemli düzeyde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu miRNA'ların tanısal performansının (miR-107 ve miR-574-3p için AUC değerleri sırasıyla 0.74 ve 0.66) PCA 3'ten (AUC=0.61) daha iyi olduğu belirtilmiştir (Bryant, vd., 2012).

Haj-Ahmad vd. tarafından yapılan çalışmada 8 PKa'lı, 12 BPH'lı ve 10 sağlıklı gönüllüden alınan idrar örneklerinde, 894 miRNA'nın ekspresyon seviyeleri mikroarray ile taranmış ve sonrasında seçilen 7 miRNA'nın PKa'daki tanısal yeterliliği araştırılmıştır. Bu çalışmada, miR-1825'in ekspresyon seviyeleri PKa'da sağlıklı gönüllülere kıyasla upregüle olarak tespit edilirken, miR-484'ün ekspresyon seviyeleri PKa ve BPH'ta sağlıklı gönüllülere kıyasla downregüle olarak bulunmuştur. miR-1825'in PKa'yı BPH'tan ayırmadaki sensitivite ve spesifisitesi sırasıyla %60 ve %69 olarak hesaplanmış iken, miR-484 için sensitivite ve spesifisite sırasıyla %80 ve %19 olarak belirlenmiştir. Her iki miRNA'nın birlikte değerlendirilmesinin PKa ile BPH'ın ayırımındaki sensitivitesi %45, spesifisitesi ise % 75 olarak hesaplanmıştır (Haj-Ahmad, vd., 2014).

Guzel vd. tarafından ülkemizde yapılan bir çalışma ise prostat sekresyonu örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. PKa'lı 23 hasta ve BPH'lı 25 hastadan prostat masajı sonrası prostat sekresyonu örnekleri alınmıştır. Bu örneklerde yapılan analizde BPH'a kıyasla PKa'da miR-361-3p, miR-133b ve miR-221 downregüle olarak tespit edilirken, miR-203 upregüle olarak tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların kombinasyonun PKa tanısındaki performansı (AUC=0.950) PSA'ya (AUC=0.463) kıyasla çok daha yüksek tespit edilmiştir (Guzel, vd., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Örneklerinin Elde Edilmesi

Çalışma örnekleri, 2013 yılında tamamlanan tıpta uzmanlık tezinde kullanılan ve daha sonra -80°C'de saklanan serumlardan oluşturulmuştur. Hasta serumları 2012-2013 yılları arasında Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Kliniğinde tıpta uzmanlık tez çalışması kapsamında, aynı hastanenin Üroloji Kliniğine başvuran ve PSA yüksekliği, AÜSS ya da şüpheli dijital rektal muayene nedeniyle TRUS eşliğinde prostat iğne biyopsisi yapılan hastalardan elde edilmiştir. Hastalar daha sonra biyopsi sonuçlarına göre aşağıdaki 3 gruba ayrılmıştır.

1. Benign Prostat Hiperplazisi Grubu (n=25)
2. Asemptomatik Prostatit Grubu (n=10)
3. Prostat Kanseri Grubu (n=33)

Biyopsi sonucuna göre sadece BPH tanısı alanlar BPH grubuna, BPH ile birlikte KP tanısı alanlar KP grubuna ve adenokarsinom tanısı alanlar ise PKa grubuna dahil edildi. PKa tanısı alan her hasta için gleason skoru hesaplanmıştır. Daha önce başka bir kanser tanısı almış olanlar, tedavi edilmiş olsalar dahi çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır.

Numune toplanması aşamasında hastalara aydınlatılmış onam formu imzalatılmıştır. Ayrıca bu sunulan doktora tezi çalışması için hasta örneklerinin kullanılması noktasında, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmıştır. Bu doktora tezi çalışması, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Komisyonunca maddi olarak desteklenmiştir.

3.2. Hastalardan Kan Örneklerinin Toplanması ve Biyopsi Yapılması

Üroloji Kliniğinden prostat iğne biyopsisi istemi yapılan hastalara, transrektal ultrason eşliğinde 8-12 kadran biyopsi yapılarak formaldehit içerisinde patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Biyopsi sonucu en az iki patolog tarafından değerlendirilmiştir.

Kan örneklerinin alınması ve saklanması aşamasında Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) önerileri dikkate alındı (Kiechle, vd., 2010). Hastalardan kan alma işlemi, biyopsi yapılmadan önce deneyimli kan alma hemşirelerince

gerçekleştirildi ve antikoagülan içermeyen kırmızı kapaklı 8 mL'lik jelli tüpler (VACUETTE®, SST) kullanıldı. Her hastadan iki tüp kan alındı. Alınan numune tüpleri en geç iki saat içerisinde santrifüj edildi. Santrifüj işlemi NF800 santrifüj cihazında (nüve®), PSA için 2500xg'de ve mikroRNA çalışması için 2100xg'de 10 dk olarak uygulandı. PSA düzeyleri aynı gün ölçüldü. MikroRNA çalışması için elde edilen serum, RNaz ve DNaz içermeyen 1.5 mL ependorf tüplere (greiner bio-one) ayrılarak -80°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

3.3. Total PSA Ölçümlerinin Yapılması

Çalışmaya alınan hastaların tamamında total PSA ölçümleri yapıldı. Total PSA (Siemens, USA) ölçümleri hormon otoanalizöründe (Advia Centaur® XP, Siemens, Ireland) immünkemilüminesans yöntem kullanılarak yapıldı.

Advia Centaur PSA testi iki bölgeli sandviç immün testtir. Lite reaktifi içindeki birinci antikor, akridinyum ile işaretlenmiş poliklonal anti-PSA keçi antikorudur. Katı faz içindeki ikinci antikor, paramanyetik partiküllere kovalent bağlanmış bir monoklonal fare anti-PSA antikorudur.

Sistem aşağıdaki adımları otomatik olarak gerçekleştirir.

1. Bir küvet içine 35 µL örnek aktarır.
2. 250 µL katı faz ve 100 µL Lite reaktifi aktarır ve 37 °C'de 7.5 dk inkübe eder.
3. Küvetleri ayırır, aspire eder ve reaktif suyu ile yıkar.
4. Kemilüminesans reaksiyonu başlatmak için 300'er µL asit reaktif ve baz reaktif aktarır.
5. Bu şekilde örnekte meydana gelen kemilüminesans kaynaklı ışımaya, detektörler tarafından rölatif ışık birimi (RLU) olarak saptanır. RLU ile PSA konsantrasyonu arasında doğrudan ilişki vardır.

3.4. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için RNeasy MinElute spin kolon kiti (Qiagen) kullanılmıştır. Ticari firma protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu aşamaları aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Örnekler -80°C'den çıkarılarak, oda ısısında çözülmesi sağlandı.
2. Örnekler çözüldükten sonra vortekslendi.

3. 100 µL serum bir eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine 500 µL QIAzol lizis reaktifinden ilave edildi. Pipetle çekip bırakarak ve vorteksleyerek reaktif ile serum örneğinin karışması sağlandı.
4. Lizatı içeren tüp oda ısısında (15-25°C) 5 dk kadar beklemeye bırakıldı.
5. miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control çalışma solüsyonundan (çalışma solüsyonunun hazırlanması Tablo 1'de gösterildi) 3,5 µL ilave edildi.
6. Lizatı içeren tüpe 100 µL kloroform ilave edildi. Tüpün kapağı kapatılarak, 15 sn kadar vortekslendi. Daha sonra 3 dk kadar oda ısısında (15-25°C) beklemeye bırakıldı.
7. Lizatı içeren tüpler soğutmalı santrifüje yerleştirilerek, +4°C'de 15 dk boyunca 12.000xg'de santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası yaklaşık olarak 300 µL kadar berrak olan üst faz dikkatli bir şekilde pipetle alınarak, yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Bu işlem sırasında orta ve alt faza değmeden üst fazın pipetlenmesine dikkat edildi.
9. Yeni bir tüpe aktarılan aköz fazın üzerine 450 µL %100 etanol ilave edildi ve pipetle çek bırak yaparak, karıştırıldı.
10. Etanol ve örnek karışımından 700 µL kadar pipetlenerek, 2 mL'lik tüpün içerisinde bulunan RNeasy MinElute spin kolona aktarıldı. Tüpün kapağı kapatılarak 8000xg'de 15 sn boyunca oda ısısında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolondan süzülerek, tüpün içerisinde biriken kısım atıldı.
11. Dokuzuncu adımda oluşturulan etanol ve örnek karışımından kalan kısım (yaklaşık 50µL kadar) için onuncu adım tekrar edildi.
12. Kolonun yıkanması amacıyla spin kolon üzerine 700 µL RWT buffer ilave edildi. Spin kolonun kapağı kapatılarak, 8000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Alttaki tüpe süzülen kısım atıldı.
13. Kolonun yıkanması amacıyla spin kolon üzerine 500 µL RPE buffer ilave edildi. Spin kolonun kapağı kapatılarak, 8000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Alttaki tüpe süzülen kısım atıldı.
14. Spin kolon membranının yıkanması amacıyla 500 µL %80 etanol RNeasy MinElute spin kolon üzerine ilave edildi. Spin kolonun kapağı kapatılarak, 8000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Süzülen kısım tüple birlikte atıldı.

15. RNeasy MinElute spin kolon yeni bir 2 mL'lik tüpe alındı. Membranın kuruması amacıyla spin kolonun kapağı açık bir şekilde tam hızda 5 dk boyunca santrifüj edildi. Alttaki tüpe süzülen kısım tüple birlikte atıldı.
16. RNeasy MinElute spin kolon yeni bir 1,5 ml'lik tüpe alındı. 14 µL RNaz içermeyen su direkt olarak membranın merkezine ilave edildi. Kolonun kapağı kapatılarak, 1 dk süreyle tam hızda santrifüj edildi. Böylelikle tüpün dibindeki kısmın içinde RNA izole edilmiş oldu.

3.5. Reverse Transkripsiyon ve cDNA Sentezi

cDNA sentezi aşamasında miScript II RT Kit (Qiagen) kullanıldı. cDNA sentez aşamasına ilişkin basamaklar maddeler halinde aşağıda sıralanmıştır.

1. Çalışma gününe kadar -20°C'de saklanan kit içerisinde bulunan miScript Reverse Transcriptase Mix, 10x miScript Nucleics Mix, 5x miScript HiSpec Buffer ve RNaz içermeyen su oda ısısında çözüldü.
2. Kit içerisinde bulunan 5x miScript HiFlex Buffer prekürsör miRNA, mRNA, ncRNA gibi RNA'lar için kullanıldığından, bizim çalışmamızda kullanılmamış olup, onun yerine ticari firmanın önerisi doğrultusunda mature miRNA için dizayn edilen 5x miScript HiSpec Buffer kullanılmıştır.
3. Ticari firma protokolünün önerileri doğrultusunda, toplam hacim 20 µL olacak şekilde bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon bileşenlerinin kullanım oranları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri ve oranları.

Bileşen	Hacim (1 örneklik)	Hacim (24 örneklik)
RNaz içermeyen su	8 µL	8x24=192 µL
5x miScript HiSpec Buffer	4 µL	4x24=96 µL
10x miScript Nucleics Mix	2 µL	2x24=48 µL
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µL	2x24=48 µL
Toplam reaksiyon karışımı (master mix)	16 µL	16x24=384 µL

4. Hazırlanan reaksiyon karışımından her bir örnek için 16 μL ve izole edilen RNA'yı içeren örneklerden (template RNA) 4 μL uygun tüpe aktarıldı. Dikkatlice karıştırılıp, kısa süreli santrifüj uygulandı.
5. 37°C'de 60 dk termal cycler cihazında inkübasyona bırakıldı.
6. Reverse transkriptaz karışımını inaktive etmek için 95 °C'de 5 dk inkübe edildi ve daha sonra tüpler buz üzerine alındı.
7. Sentez edilen cDNA'ların (20 μL) üzerine 200 μL RNaz içermeyen su ilave edilerek karıştırıldı.
8. Tüpler -20°C'ye kaldırılarak, qRT-PCR aşamasına kadar saklandı.

3.6. miRNA'ların Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR ile Amplifikasyonu

miRNA'ların amplifiye edilmesi ve düzeylerinin ölçülmesi Agilent Aria MX cihazında miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) kullanılarak ticari firma protokolleri çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. PCR aşamasında uygulanan protokolün basamakları aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

1. miRNA'ların amplifiye edilmesi ve düzeylerinin ölçülmesi Agilent Aria MX cihazında miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) kullanılarak ticari firma protokolleri çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.
2. Kitin içerisinde bulunan 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 10x miScript Universal Primer, 10x miScript Primer Assay, RNase free water ve bir önceki aşamada örneklerden elde ettiğimiz cDNA oda ısısında çözüldü. Tablo 3.2'de yer alan reaksiyon bileşenleri ve oranlarına göre toplam hacim 25 μL olacak şekilde (örneğe ait cDNA dahil) reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3.2. PCR aşamasında kullanılan reaksiyon bileşenleri ve oranları.

Bileşen	Hacim (1 örneklilik)	Hacim (68 örneklilik)
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5 μL	68x12,5=850 μL
10x miScript Universal Primer	2,5 μL	68x2,5=170 μL
10x miScript Primer Assay	2,5 μL	68x2,5=170 μL
RNaz içermeyen su	5,5 μL	68x5,5=374 μL
Toplam	23 μL	23x68=1564 μL

3. Hazırlanan reaksiyon karışımı dikkatli bir şekilde iyice karıştırıldı.
4. PCR aşamasında 96 kuyucuklu plate kullanılarak, her bir kuyucuğa Tablo 3'e göre hazırlanan reaksiyon karışımından her örnek için 23 μ L aktarıldı. Üzerine her bir örnek için 2 μ L cDNA ilave edildi.
5. Plate PCR cihazına yerleştirilmeden önce üzeri film ile sıkıca kapatıldı.
6. Oluşması muhtemel hava kabarcıklarının giderilmesi için 1000xg'de 1 dk boyunca oda ısısında santrifüj edildi.
7. Plate cihaza yerleştirildi ve PCR reaksiyonu Tablo 3.3'te gösterildiği şekilde programlanarak, PCR aşaması tamamlandı.

Tablo 3.3. miRNA analizi için PCR reaksiyonu aşamaları.

Aşama	Süre	Sıcaklık	Açıklama
PCR başlangıç aktivasyonu	15 dk	95°C	HotStarTaq DNA polimeraz bu aşamada aktive edilmektedir.
Denatürasyon	15 sn	94°C	
Bağlanma	30 sn	55°C	
Uzama	30 sn	70°C	Floresans okuma değerleri her siklusta bu aşamanın sonunda alınmıştır.
Siklus sayısı	45 siklus		

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz PASW Statistics 18 programı kullanılarak yapıldı. Fold change hesaplamaları için online olarak qiagen web sitesinden faydalanıldı.

Ct değeri (threshold cycle) kantitatif real-time PCR'da floresans ile ölçülen eşik değerdir. miRNA'ların Ct değerleri ce-miR-39 Ct değerine göre normalize edilerek $-\Delta Ct$ değerleri hesaplanmıştır. Bunun için $-(Ct_{\text{hedef miRNA}} - Ct_{\text{referans miRNA}})$ formülünden faydalanılmıştır.

Fold change hesaplamalarında ce-miR-39 Ct değerlerinin normalizasyonda kullanıldığı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünden faydalanılmıştır.

Yaş değişkeni normal dağılıma uyduğu için kanser olmayan ve kanserli hasta grupları arasında farklı olup olmadığı parametrik test olan bağımsız örneklem t testi ile değerlendirildi. Alt gruplar arası yaş değişkeni açısından fark olup olmadığı yine parametrik test olan tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve post hoc test olarak Tukey HSD testi ile değerlendirildi.

PSA değişkeni normal dağılıma uymadığı ve uç değerler içerdiği için tanımlayıcı istatistiklerde ortanca değerleri gösterildi. Kanser olmayan ve kanserli hasta grupları arasında PSA değişkeni açısından fark olup olmadığı non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Alt gruplar arasında PSA değerleri açısından fark olup olmadığı, PSA değerlerinin normal dağılıma uymaması nedeniyle non-parametrik test olan Kruskal Wallis varyans analizi ile test edildi. Post-hoc test olarak Mann Whitney U testi yapıldı ve p değerlerinin anlamlılık sınırı Bonferroni düzeltmesi ile 0.017 olarak kabul edildi ($0.05/3=0.017$).

Gleason skoru ile miRNA serum seviyeleri arasında ilişki olup olmadığı, gleason skorunun ordinal değişken olması sebebiyle, nonparametrik test olan Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi.

miRNA seviyelerinin kanser olmayan ve kanserli hasta grupları arasında farklı olup olmadığı, bağımsız örneklem t testi kullanılarak analiz edildi. BPH, KP ve kanser grupları arasında fark olup olmadığı One-way ANOVA testi ile analiz edildi. Post-hoc test olarak Tukey HSD testinden faydalanıldı.

Tanısal yeterlilik değerlendirilmesi için ROC analizi yapıldı. ROC analizi ile spesifisite, sensitivite, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer (NPD) değerleri hesaplandı. Cut-off değerlerinin belirlenmesinde ROC eğrisinin sol üst köşeye en yakın olduğu nokta esas alınmıştır.

Tüm hesaplamalarda istatistiksel anlamlılık için P değeri 0.05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Gruplarının Tanımlayıcı İstatistik Verileri

Çalışma grupları biyopsi sonuçlarına göre PKa ve kanser olmayan hastalardan oluşturulmuştur. Kanser hasta grubunda biyopsi sonucuna göre PKa tanısı almış 33 (otuzüç) hasta bulunmaktadır. Bu hastalar bazı istatistiki analizlerde ayrıca kendi arasında gleason skorlamasına göre gruplandırılmıştır. Kanser olmayan hasta grubunda ise biyopsi sonucuna göre BPH ve KP tanısı alan hastalardan oluşan toplam 35 (otuzbeş) hasta yer almaktadır.

Tablo 4.1. Çalışmaya katılan gönüllülerin yaş (yıl) ve PSA (ng/mL) değerleri.

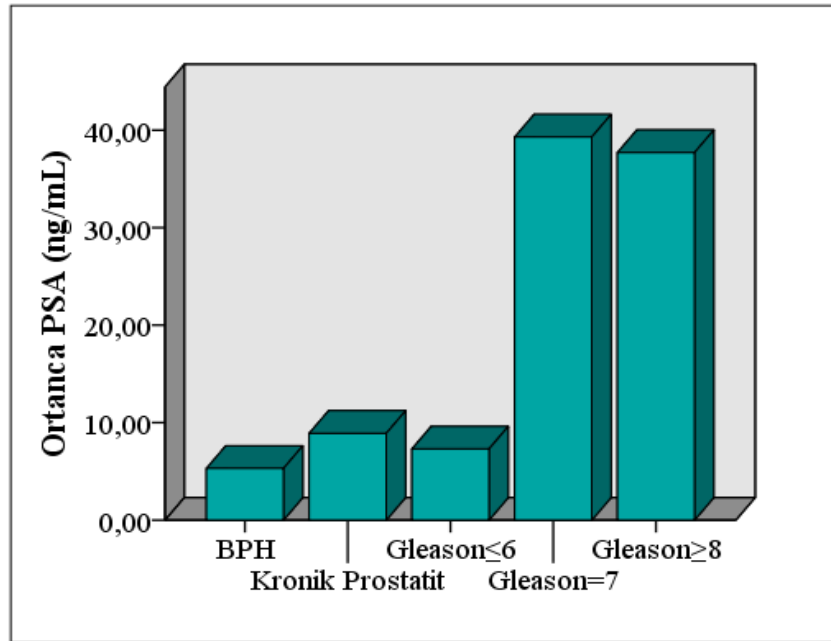
Grup	N		Ortalama Ortanca	Minimum	Maksimum	SD
Kanser Olmayan	35	Yaş	64.3	50.0	79.0	7.30
		PSA	6.0	2.20	137.90	35.62
BPH	25	Yaş	63.6	50.0	79.0	7.60
		PSA	5.30	2.20	137.90	41.84
KP	10	Yaş	66.0	57.0	75.0	6.70
		PSA	8.90	4.70	22.60	5.97
Kanser	33	Yaş	69.4	51.0	82.0	8.40
		PSA	23.10	2.80	1654.00	311.06
Gleason≤6	9	Yaş	64.7	53.0	76.0	7.50
		PSA	7.30	2.80	328.9	106.77
Gleason=7	10	Yaş	67.3	51.0	79.0	8.90
		PSA	39.30	7.40	119.40	41.21
Gleason≥8	14	Yaş	74.5	61.0	82.0	5.90
		PSA	37.70	7.60	1654.00	465.45
Toplam	68					
BPH: Benign prostat hiperplazisi, KP: Kronik prostatit, N: Kişi sayısı, SD: Standart sapma						

Tablo 4.1'de hasta gruplarına ait tanımlayıcı istatistiki veriler gösterilmiştir. PSA değişkeni uç değerler içerdiğinden ve normal dağılıma uymadığından ortanca değerleri verilmiştir. Yaş değişkeni için ise aritmetik ortalama değerleri verilmiştir.

Tablo 4.1'e bakıldığında kanser olmayan hasta grubunda yaş ortalaması 64.3 iken, kanser hasta grubunda yaş ortalaması 69.4 olarak hesaplanmıştır. Kanser olmayan hasta grubunda yer alan BPH ve KP gruplarında yaş ortalaması sırasıyla; 63.6

ve 66.0 olarak hesaplanmıştır. Kanser hasta grubu içerisinde gleason skorlamasına göre yapılan gruplandırmada yaş ortalaması; gleason ≤ 6 grubunda 64.7, gleason =7 grubunda 67.3 ve gleason ≥ 8 grubunda 74.5 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.1 PSA değerleri açısından incelendiğinde, kanser olmayan hasta grubunun PSA ortancası 5.90, kanser hasta grubunun ise 15.00 olarak bulunmuştur. Alt grupların PSA değerlerine bakıldığında, kanser olmayan hasta grubunda yer alan BPH ve KP grubunda PSA ortancaları sırasıyla; 5.20 ve 8.90 iken, kanser hasta grubunda yer alan gleason ≤ 6 , gleason =7 ve gleason ≥ 8 gruplarında sırasıyla; 7.30, 39.30 ve 37.70 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. PSA ortancalarının alt gruplara göre dağılımı.

4.2. PSA ve Yaş Değişkeninin Gruplar Arası Farklılığının İncelenmesi

Yapılan bağımsız örneklem t testi ile kanser ve kanser olmayan hasta grupları arasında yaş değişkeni açısından anlamlı fark bulundu ($p=0.010$). Alt gruplar arasında yaş değişkeni açısından fark olup olmadığının tespiti için tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve daha sonrasında post-hoc test olarak Tukey HSD testi yapıldı. Yapılan analiz sonucunda BPH ve KP ile KP ve kanser grupları arasında yaş değişkeni açısından fark olmadığı (sırasıyla $p=0.704$ ve $p=0.461$), BPH ile kanser grupları arasında ise anlamlı fark olduğu ($p=0.020$) görüldü.

PSA değerleri açısından kanser olmayan ve kanserli hasta grupları arasında fark olup olmadığı Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. İki grup arasında anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.001$).

Alt gruplar arasında PSA değerleri açısından fark olup olmadığı, PSA değerlerinin normal dağılıma uymaması nedeniyle non-parametrik test olan Kruskal Wallis varyans analizi ile test edildi. Post-hoc test olarak Mann Whitney U testi yapıldı ve p değerlerinin anlamlılık sınırı Bonferroni düzeltmesi ile 0.017 olarak kabul edildi ($0.05/3 = 0.017$). Buna göre yapılan varyans analizinde gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi ($p < 0.001$). Hangi gruplar arasında fark olduğunun tespiti amacıyla yapılan Mann Whitney U testinin sonuçları ise tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. PSA değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.

Karşılaştırılan gruplar	P değeri
BPH - KP	0.096
BPH - Kanser	<0.001
KP - Kanser	0.024

Tablo 4.2'ye bakıldığında Bonferroni düzeltmesinden sonra anlamlılık için p değeri 0.017 kabul edildiği göz önüne alındığında, PSA değerleri açısından BPH ile kanser grupları arasında anlamlı farklılık bulundu. Diğer gruplar arasında ise anlamlı farklılık yoktu.

4.3. Kanser ve Kanser Olmayan Hasta Grupları Arasında miRNA Serum Seviyelerinin Gruplar Arası Farklılığının İncelenmesi

Kanser ve kanser olmayan hasta grupları arasında miRNA serum seviyeleri açısından fark olup olmadığı ve "fold change" olarak ne kadarlık bir fark olduğuna yönelik analiz sonuçları Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

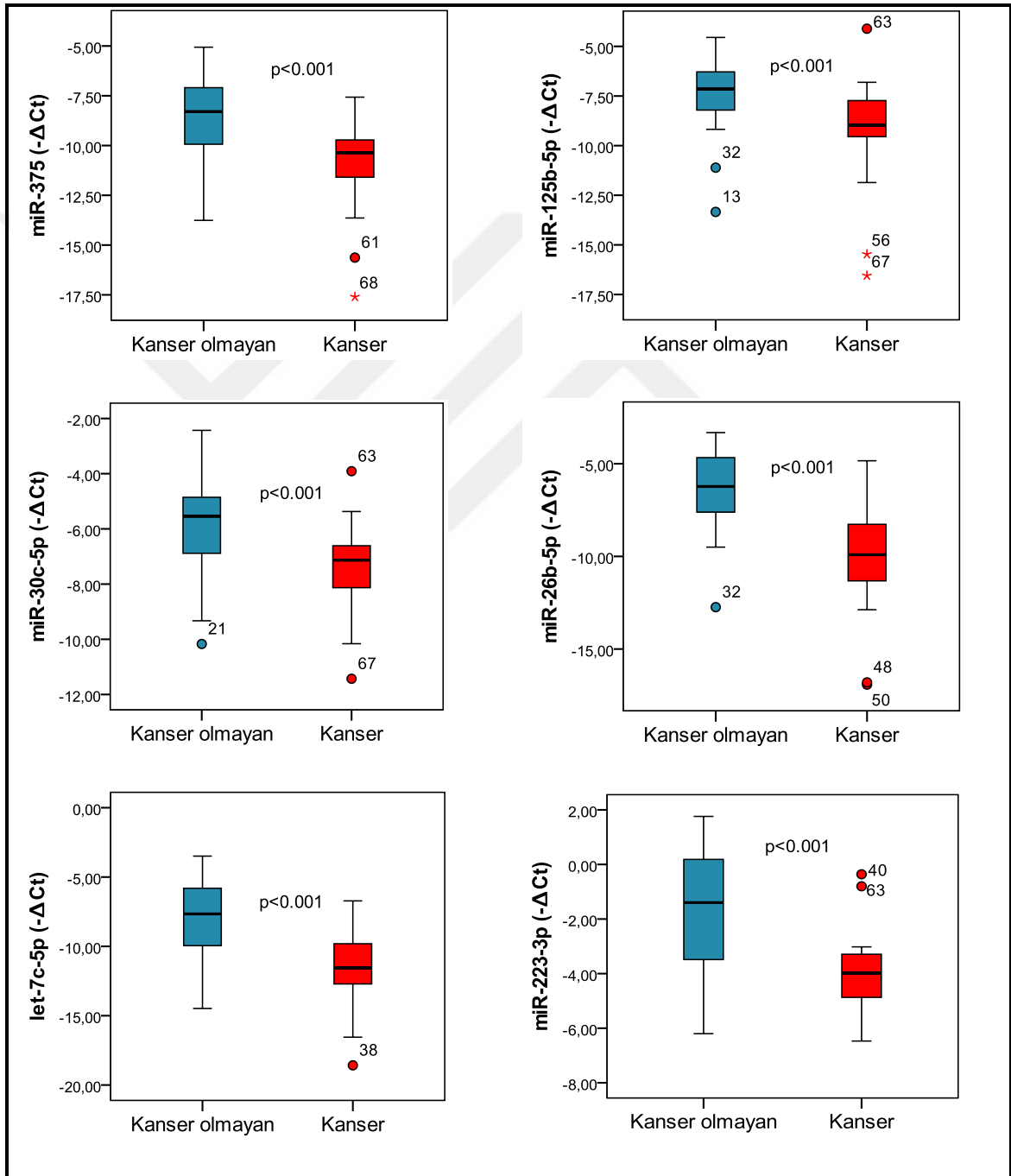
Tablo 4.3. Kanser ve kanser olmayan hasta gruplarında serum miRNA seviyelerindeki değişim.

miRNA	Grup (n=kişi sayısı)	Ortalama (-ΔCt)	SD	Fold Change	P değeri
miR-375	Kanser olmayan (n=35)	-8.56	2.05	-4.48	<0.001
	Kanser (n=33)	-10.72	2.13		
miR-93-5p	Kanser olmayan (n=35)	-6.74	1.73	-1.79	0.022
	Kanser (n=33)	-7.58	1.65		
miR-125b-5p	Kanser olmayan (n=35)	-7.33	1.78	-3.60	0.016
	Kanser (n=33)	-9.18	2.31		
miR-30c-5p	Kanser olmayan (n=35)	-5.96	1.62	-2.64	0.005
	Kanser (n=33)	-7.36	1.40		
miR-26b-5p	Kanser olmayan (n=35)	-6.35	2.09	-12.43	<0.001
	Kanser (n=33)	-9.98	2.62		
let-7c-5p	Kanser olmayan (n=35)	-7.83	2.57	-13.01	<0.001
	Kanser (n=33)	-11.53	2.61		
miR-181a2-3p	Kanser olmayan (n=35)	-13.03	2.45	-1.78	0.172
	Kanser (n=33)	-13.86	2.51		
miR-221-3p	Kanser olmayan (n=35)	-7.72	1.69	-1.40	0.264
	Kanser (n=33)	-8.21	1.30		
miR-222-3p	Kanser olmayan (n=35)	-7.65	1.56	-1.41	0.223
	Kanser (n=33)	-8.14	1.17		
miR-223-3p	Kanser olmayan (n=35)	-1.58	2.22	-5.67	<0.001
	Kanser (n=33)	-4.08	1.33		
miR-141-3p	Kanser olmayan (n=26)	-13.10	3.37	-2.18	0.106
	Kanser (n=12)	-14.62	2.28		
miR-331-3p	Kanser olmayan (n=35)	-12.05	2.49	-1.10	0.142
	Kanser (n=33)	-12.12	1.94		

Çalışmaya dahil edilen 12 miRNA'dan 6 tanesinin serumdaki seviyelerinin, kanser ve kanser olmayan hasta grupları arasında istatistiksel olarak farklı olduğu belirlenmiştir. Bu miRNA'lar; miR-375, miR125b-5p, miR-30c-5p, miR-26b-5p ve let-7c-5p'dir. miR-93-5p'nin serum seviyeleri her ne kadar kanser olmayan ve kanser grubu arasında farklı ise de 2 kattan daha az bir değişim olduğu için bu farklılık göz ardı edilmiştir. Diğer beş miRNA'nın serum seviyelerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Bu miRNA'lar; miR-181a2-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-141-3p ve miR-331-3p'dir (Tablo 4.3). Kanser olmayan gruba kıyasla kanser grubunda 12 miRNA'nın tamamında downregülasyon izlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı değişim görülen miRNA'lardan let-7c-5p'de 13.01 kat, miR-

26b-5p'de 12.43 kat, miR-375'te 4.48 kat, miR-125b-5p'de 3.60 kat ve miR-30c 5p'de 2.64 katlık bir downregölasyon hesaplanmıştır (Tablo 4.3).

Kanser olmayan ve kanser grupları arasında anlamlı değişim görölen miRNA'ların $-\Delta Ct$ değerlerinin gruplar arasındaki seviyeleri Şekil 4.2'de boksör torbası grafiği ile gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Kanser olmayan ve kanser gruplarında miRNA serum seviyeleri.

4.4. miRNA Ölçüm Sonuçlarında Alt Gruplar Arası Farklılığın Değerlendirilmesi

miRNA ölçüm sonuçları açısından alt gruplar arasında fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile incelendi. Varyans analizi ile gruplar arası farklılık olduğu belirlenen miRNA'ların hangi gruplar arasında farklı olduğu Tukey HSD testi ve online olarak fold change hesaplamaları ile incelendi.

Tablo 4.4. Alt gruplar arasındaki miRNA değerleri için varyans analizi sonuçları.

miRNA	Grup	N	Ortalama (-ΔCt)	SD	F	P değeri
hsa-miR-375	BPH	25	-8.24	1.96	10.330	<0.001
	KP	10	-9.35	2.15		
	Kanser	33	-10.72	2.13		
hsa-miR-93-5p	BPH	25	-6.99	1.63	3.131	0.050
	KP	10	-6.11	1.89		
	Kanser	33	-7.58	1.65		
hsa-miR-125b-5p	BPH	25	-7.26	1.70	6.823	0.002
	KP	10	-7.51	2.06		
	Kanser	33	-9.18	2.31		
hsa-miR-30c-5p	BPH	25	-5.96	1.39	7.143	0.002
	KP	10	-5.96	2.17		
	Kanser	33	-7.36	1.40		
hsa-miR-26b-5p	BPH	25	-5.77	1.65	24.309	<0.001
	KP	10	-7.78	2.46		
	Kanser	33	-9.98	2.62		
hsa-let-7c-5p	BPH	25	-7.16	2.36	21.880	<0.001
	KP	10	-9.50	2.39		
	Kanser	33	-11.53	2.61		
hsa-miR-181a2-3p	BPH	25	-12.54	2.34	2.733	0.072
	KP	10	-14.25	2.41		
	Kanser	33	-13.86	2.51		
hsa-miR-221-3p	BPH	25	-7.98	1.32	2.224	0.116
	KP	10	-7.07	2.33		
	Kanser	33	-8.21	1.30		
hsa-miR-222-3p	BPH	25	-7.75	1.45	1.303	0.279
	KP	10	-7.40	1.87		
	Kanser	33	-8.14	1.17		
hsa-miR-223-3p	BPH	25	-0.76	1.78	32.481	<0.001
	KP	10	-3.63	1.90		
	Kanser	33	-4.08	1.33		
hsa-miR-141-3p	BPH	21	-13.01	3.62	1.356	0.271
	KP	5	-13.31	3.05		
	Kanser	12	-14.62	2.28		
hsa-miR-331-3p	BPH	25	-12.60	2.33	2.905	0.062
	KP	10	-10.65	2.43		
	Kanser	33	-12.12	1.94		

Tablo 4.4'e bakıldığında serum düzeyleri ölçülen miRNA'lardan miR-141, hasta örneklerinin 2/3'ünden azında amplifiye olmuştur. Tablo 4.4'de çalışmaya dahil edilen

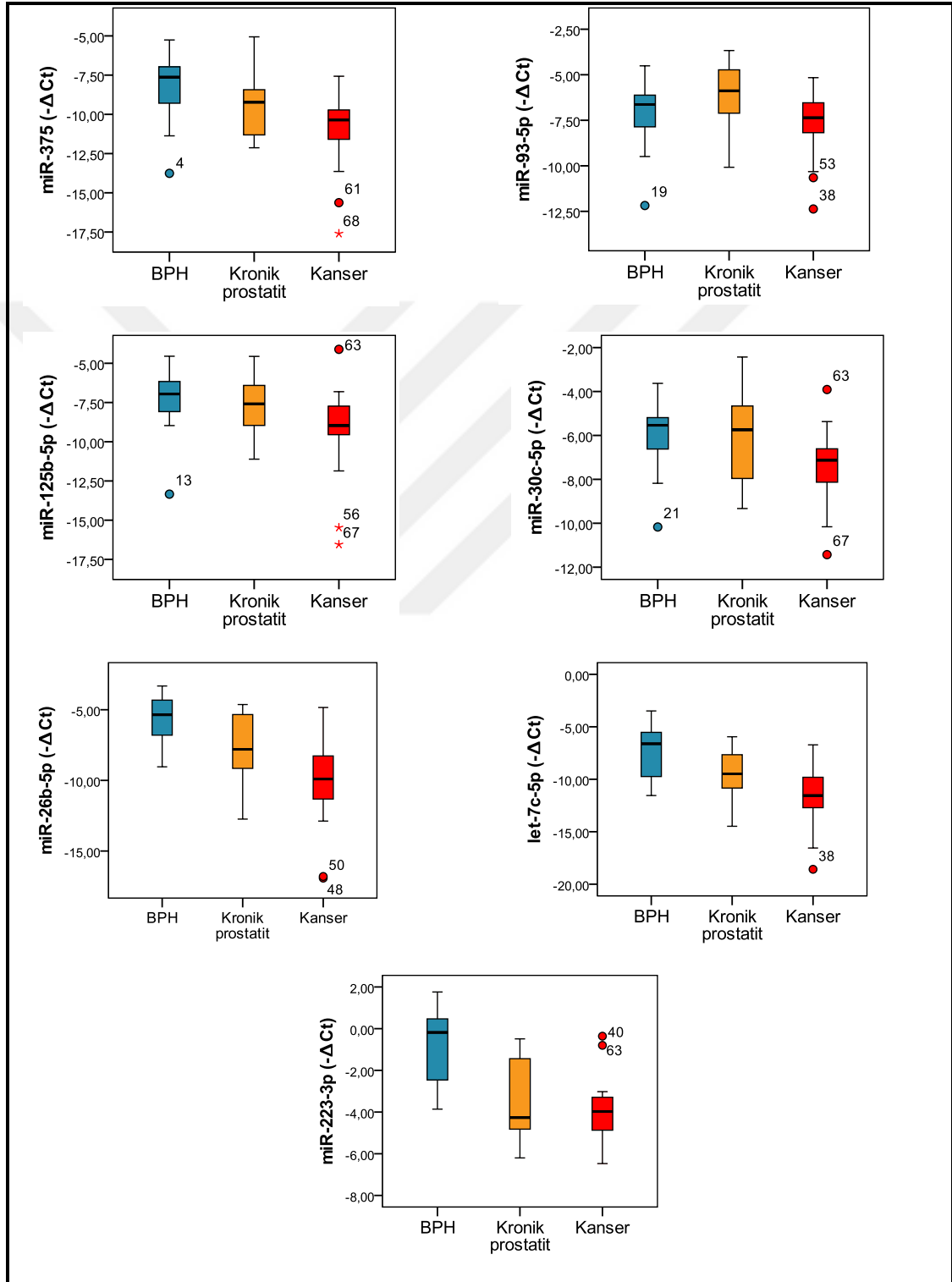
toplam 12 miRNA için varyans analizi sonuçları görülmektedir. Buna göre; miR-375, miR-93, miR-125b, miR-26b, let-7c, miR-30c ve miR-223 için hesaplanan p değeri 0.05'den küçük olduğu için gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu kabul edilmiştir. miR-141, miR-181a2, miR-221, miR-222 ve miR-331-3p için ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur ($p < 0.05$).

Tablo 4.5. Alt gruplar arasında serum miRNA seviyelerinin fold change olarak değişimi

miRNA	Gruplar	Fold Change	P değeri
miR-375	BPH - KP	-2.17	0.579
	BPH - Kanser	-5.60	<0.001
	KP - Kanser	-2.58	0.038
miR-93-5p	BPH - KP	+1.85	0.025
	BPH - Kanser	-1.50	0.141
	KP - Kanser	-2.78	0.001
miR-125b-5p	BPH - KP	-1.19	0.615
	BPH - Kanser	-3.79	0.028
	KP - Kanser	-3.18	0.062
miR-30c-5p	BPH - KP	-1.00	0.185
	BPH - Kanser	-2.64	0.001
	KP - Kanser	-2.64	0.006
let-7c-5p	BPH - KP	-5.06	0.051
	BPH - Kanser	-20.67	<0.001
	KP - Kanser	-4.09	0.021
miR-26b-5p	BPH - KP	-4.04	0.042
	BPH - Kanser	-18.53	<0.001
	KP - Kanser	-4.59	0.012
miR-223-3p	BPH - KP	-7.29	0.009
	BPH - Kanser	-10.00	<0.001
	KP - Kanser	-1.37	0.227

Tablo 4.5 incelendiğinde miR-375, miR-125b-5p, miR-30c-5p, miR-26b-5p, miR-223-3p ve let-7c-5p ekspresyon seviyelerinde, BPH grubuna kıyasla kanser grubunda downregülasyon olduğu görülmektedir. BPH grubuna kıyasla kanser grubunda miR-375, miR-125b-5p, miR-30c-5p, miR-26b-5p, miR-223-3p ve let-7c-5p'nin serumdaki ekspresyon düzeyleri sırasıyla 5.60, 3.79, 2.64, 18.53, 10.00 ve 20.67 kat downregüle olarak tespit edilmiştir. KP'ye kıyasla kanser grubunda miR-375, miR-93-5p, miR-30c-5p, miR-26b-5p ve let-7c-5p serum seviyelerinin sırasıyla 2.58, 2.78, 2.64, 4.59 ve 4.09 kat downregüle bulunmuştur. BPH grubuna kıyasla KP grubunda ise miR-26b-5p, miR-223-3p ve let-7c-5p ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 4.04, 7.29 ve 5.06 katlık bir downregülasyon izlenmiştir.

BPH, kronik prostatit ve kanserli hasta grupları arasında serum seviyeleri açısından istatistiksel olarak farklılık olduğu tespit edilen miRNA'lara ilişkin çizilen boksör torbası grafikleri Şekil 4.3'de sunulmuştur.



Şekil 4.3. Gruplar arası miRNA seviyelerinin boksör torbası grafiği ile gösterimi.

4.5. miRNA Ölçüm Sonuçlarının Kansere Alt Grupları Arasındaki Farklılığı ve Gleason Skoru ile İlişkisi

PKa'lı hastalar gleason skoruna göre; gleason ≤ 6 , gleason=7 ve gleason ≥ 8 olmak üzere 3 farklı alt gruba ayrılmıştır. Serum miRNA seviyelerinin kanser alt grupları arasında farklı olup olmadığı post hoc test olarak Tukey HSD testinin kullanıldığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Gleason skoru ile serum miRNA seviyeleri arasındaki ilişki olup olmadığı, gleason skorunun ordinal veri olması sebebiyle Spearman korelasyon analizi ile test edilmiştir.

Kanser alt grupları arasında serum miRNA seviyeleri açısından fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Gleason skoru ile çalışmaya dahil edilen miRNA'ların serum seviyeleri arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

4.6. Prostat Kanserinin Ayırıcı Tanısında, Çalışma Kapsamında Düzeyleri Ölçülen miRNA'ların Tanısal Yeterliliğinin Hesaplanması

Çalışma kapsamında yer alan miRNA'ların tanısal yeterliliğinin hesaplanması için ROC analizi yapıldı. Sensitivite, spesifisite, PPD ve NPD hesaplamaları yapıldı. Birden çok parametrenin birlikte etkinliğinin değerlendirilmesi için lojistik regresyon (binary) analizi ve ROC analizi yapıldı.

PKa tanısında miRNA'ların tanısal yeterliliğinin hesaplanmasında iki farklı gruplama yapılmıştır. İlk grupta kanser olmayan hastalar (BPH+KP) bir gruba, kanserli hastalar diğer gruba alınmıştır. Böylelikle PKa'nın diğer prostat hastalıklarından ayırımında miRNA'ların etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. İkinci hesaplamada ise KP'li hastalardan oluşan grup, kanserli hasta grubuna ilave edilmiş ve oluşturulan grubun BPH'lı hasta grubundan ayırımında miRNA'ların tanısal yeterlilikleri değerlendirilmiştir. Bu gruplama ile de BPH'ın diğer prostat hastalıklarından ayırımında miRNA'ların tanısal yeterliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

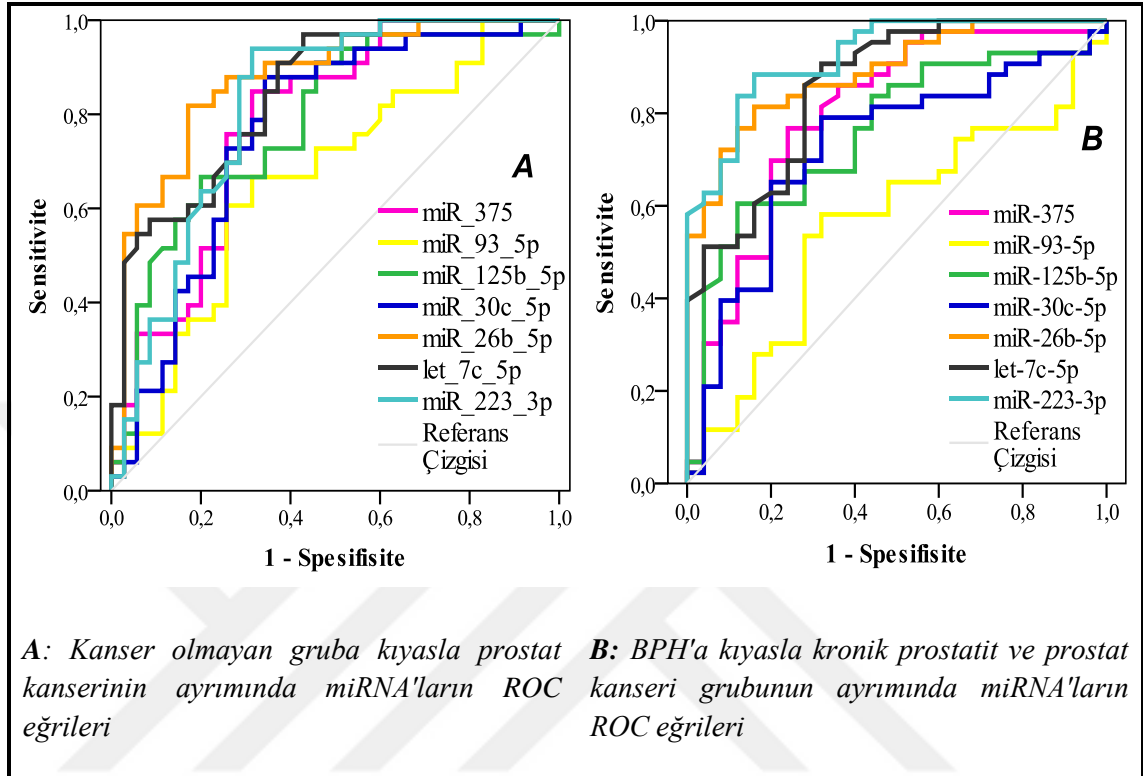
Tanısal yeterliliği istatistiksel olarak anlamlı bulunan miRNA'lar için elde edilen AUC değerleri ile sensitivite, spesifisite, PPD ve NPD yüzdeleri Tablo 4.8'de sunulmuştur.

Tablo 4.6. Kanserli olmayan hasta grubu ile kanserli hasta grubunun ayırımında miRNA'ların tanısal yeterlilikleri.

miRNA	Gruplar	AUC	P değeri	Sens. (%)	Spes. (%)	PPD (%)	NPD (%)
hsa-miR-375	Kanser olmayan - Kanser	0.781	<0.001	76	74	74	76
	BPH - (KP+Kanser)	0.798	<0.001	70	80	86	61
hsa-miR-93-5p	Kanser olmayan - Kanser	0.662	0.022	61	74	69	67
	BPH - (KP+Kanser)	0.564	0.384	54	72	77	47
hsa-miR-125b-5p	Kanser olmayan - Kanser	0.782	<0.001	67	80	76	72
	BPH - (KP+Kanser)	0.758	<0.001	61	88	90	56
hsa-miR-30c-5p	Kanser olmayan - Kanser	0.762	<0.001	73	71	71	74
	BPH - (KP+Kanser)	0.724	0.002	65	80	85	57
hsa-miR-26b-5p	Kanser olmayan - Kanser	0.874	<0.001	82	83	82	83
	BPH - (KP+Kanser)	0.889	<0.001	81	84	90	72
hsa-let-7c-5p	Kanser olmayan - Kanser	0.845	<0.001	76	71	71	76
	BPH - (KP+Kanser)	0.857	<0.001	86	72	84	75
hsa-miR-223-3p	Kanser olmayan - Kanser	0.817	<0.001	88	71	74	86
	BPH - (KP+Kanser)	0.924	<0.001	84	88	92	76

Tablo 4.8 incelendiğinde, kanser olmayan gruptan kanser grubunun ayırımında en yüksek AUC'ler 0.874 ile miR-26b-5p ve 0.845 ile let-7c-5p için hesaplanmıştır. BPH'lı hasta grubundan KP'li ve kanserli hastalardan oluşan grubun ayırımında da en yüksek AUC'ler 0.924 ile miR-223-3p ve 0.889 ile miR-26b-5p'ye aittir. Kanser olmayan gruptan kanser grubunun ayırımındaki sensitivite ve spesifisite değerleri miR-26b-5p için sırasıyla %82 ve %83, let-7c-5p için %76 ve %71 olarak bulunmuştur. Bu cut-off değerlerinde miR-26b-5p, %82 PPD ve %83 NPD'ye sahip iken, let-7c-5p %71 PPD ve %76 NPD'ye sahiptir. BPH grubundan KP ve kanserli hastalardan oluşan grubun ayırımında sensitivite ve spesifisite değerleri miR-223-3p için sırasıyla %84 ve %88, miR-26b-5p için %81 ve %84 olarak bulunmuştur. Bu cut-off değerlerinde miR-

223-3p için PPD %92 ve NPD %76 iken, miR-26b-5p için PPD %90 ve NPD %72 olarak belirlenmiştir. Diğer miRNA'lara ait veriler Tablo 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Kanser ile kanser olmayanların ayırımında miRNA'lara ait ROC eğrileri.

Şekil 4.4'te ve Tablo 4.6'da görüldüğü üzere KP'nin kanser grubu içerisinde değerlendirilmesi ile miR-375, miR-26b-5p, miR-223-3p ve let-7c-5p AUC değerlerinde artış gözlenirken, miR-125b-5p ve miR-30c-5p değerlerinde azalma gözlenmiştir. miR-93-5p AUC değeri ise BPH'tan KP'li ve kanserli hastalardan oluşan grubun ayırımında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.384$).

KP'nin, kanserli hasta grubu ile kanser olmayan hasta gruplarını ayırmada tanısal yeterliliği etkileyen interfere edici bir durum olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla, KP'li hasta grubunun ayrı bir grup olarak değerlendirildiği alt grupların birbirinden ayırımında, söz konusu miRNA'ların tanısal yeterlilikleri ROC analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir.

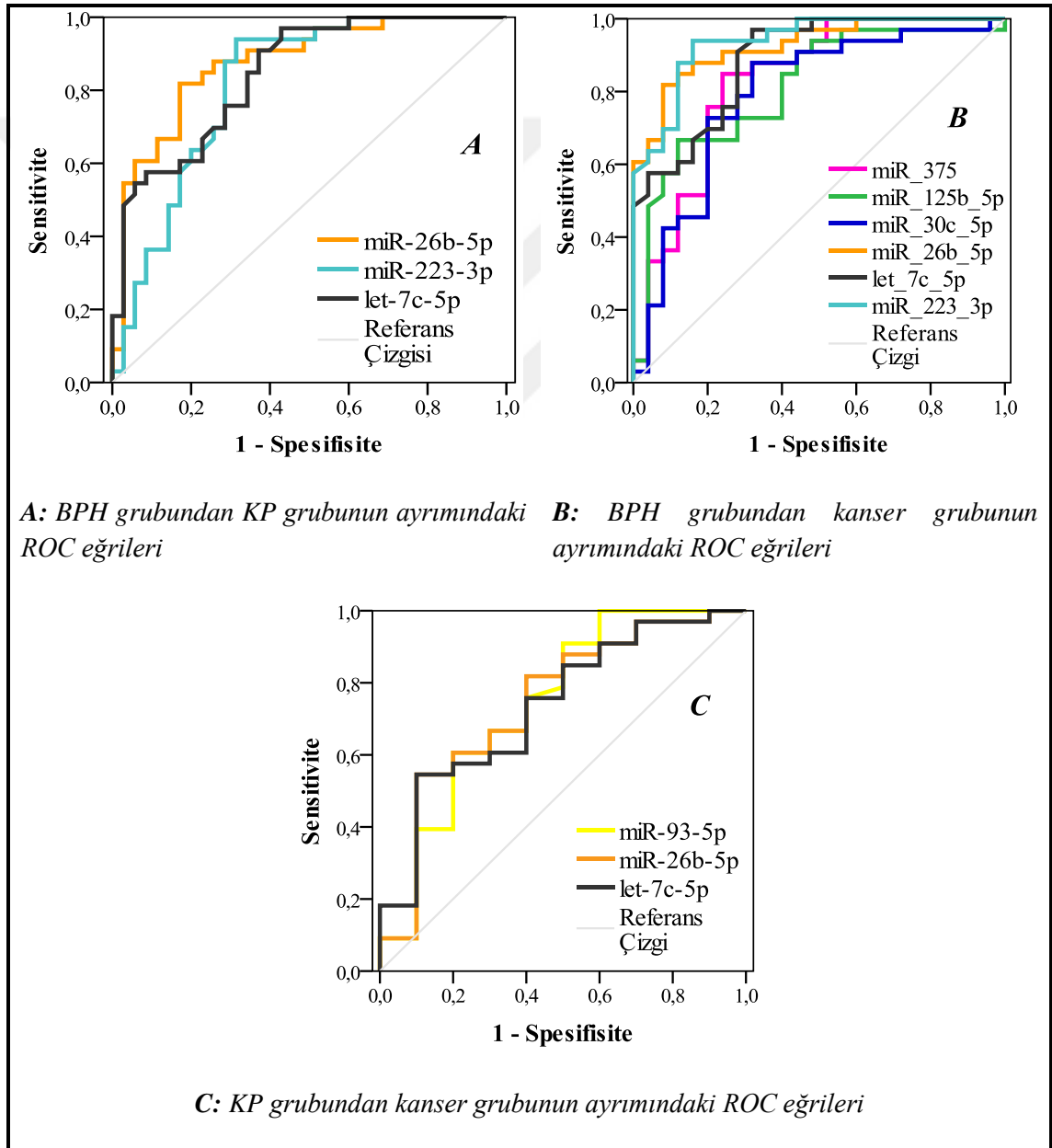
Tablo 4.7. Alt grupların birbirinden ayırımında miRNA'ların tanısıl yeterliliği.

miRNA	Gruplar	AUC	P değeri	Sens. (%)	Spes. (%)	PPD (%)	NPD (%)
miR-375	BPH-KP	0.694	0.077	80	64	44	84
	BPH-Kanser	0.829	<0.001	76	80	83	71
	KP-Kanser	0.661	0.128	76	60	86	43
miR-93-5p	BPH-KP	0.348	0.165	40	52	25	68
	BPH-Kanser	0.629	0.094	61	72	74	58
	KP-Kanser	0.744	0.021	61	80	91	38
miR-125b-5p	BPH-KP	0.580	0.465	60	56	35	78
	BPH-Kanser	0.812	<0.001	67	88	88	67
	KP-Kanser	0.709	0.047	67	60	85	35
miR-30c-5p	BPH-KP	0.504	0.971	50	68	39	77
	BPH-Kanser	0.790	<0.001	73	80	83	69
	KP-Kanser	0.691	0.070	88	60	91	60
hsa-miR-26b-5p	BPH-KP	0.768	0.014	70	72	50	86
	BPH-Kanser	0.926	<0.001	82	92	93	79
	KP-Kanser	0.745	0.020	82	60	87	50
hsa-let-7c-5p	BPH-KP	0.754	0.020	70	72	50	86
	BPH-Kanser	0.888	<0.001	91	72	81	86
	KP-Kanser	0.736	0.025	61	70	87	35
hsa-miR-223-3p	BPH-KP	0.880	0.001	70	92	78	89
	BPH-Kanser	0.938	<0.001	88	88	91	85
	KP-Kanser	0.517	0.874	49	50	76	23

BPH'lı hasta grubunu KP'li hasta grubundan ayırmada miR-26b-5p, miR-223-3p ve let-7c-5p için hesaplanan AUC değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. miR-26b-5p için AUC değeri 0.768, miR-223-3p için 0.880 ve let-7c-5p için 0.754 olarak hesaplanmıştır. BPH'lı hasta grubunu KP'li hasta grubundan ayırmada sensitivite ve spesifisite değerleri miR-26b-5p için sırasıyla %70 ve %72, miR-223-3p için %70 ve %92, let-7c-5p için %70 ve %72 olarak hesaplanmıştır (bkz. Tablo 4.7 ve Şekil 4.5A).

BPH'lı hasta grubunu kanserli hasta grubundan ayırmada en yüksek AUC değerleri 0.938 ile miR-223-3p, 0.926 ile miR-26b-5p ve 0.888 ile let-7c-5p'ye aittir. Bu miRNA'ların BPH'lı hasta grubunu kanserli hasta grubundan ayırmada sahip oldukları sensitivite ve spesifisite değerleri sırasıyla miR-223-3p için %88 ve %88, miR-26b-5p için %82 ve %92, let-7c-5p için %91 ve %72 olarak belirlenmiştir (bkz. Tablo 4.7 ve Şekil 4.5B).

KP'li hasta grubu ile kanserli hasta grubunun ayırımında miR-93-5p, miR-26b-5p ve let-7c-5p için hesaplanan AUC değerleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu iki grubun ayırımında AUC değerleri miR-26b-5p için 0.745, miR-93-5p için 0.744 ve let-7c-5p için 0.736 olarak hesaplanmıştır. KP'li hasta grubu ile kanserli hasta grubunun ayırımında sensitivite ve spesifisite değerleri miR-26b-5p için sırasıyla %82 ve %60, miR-93-5p için %61 ve %80, let-7c-5p için %61 ve %70 olarak belirlenmiştir (bkz. Tablo 4.7 ve Şekil 4.5C).



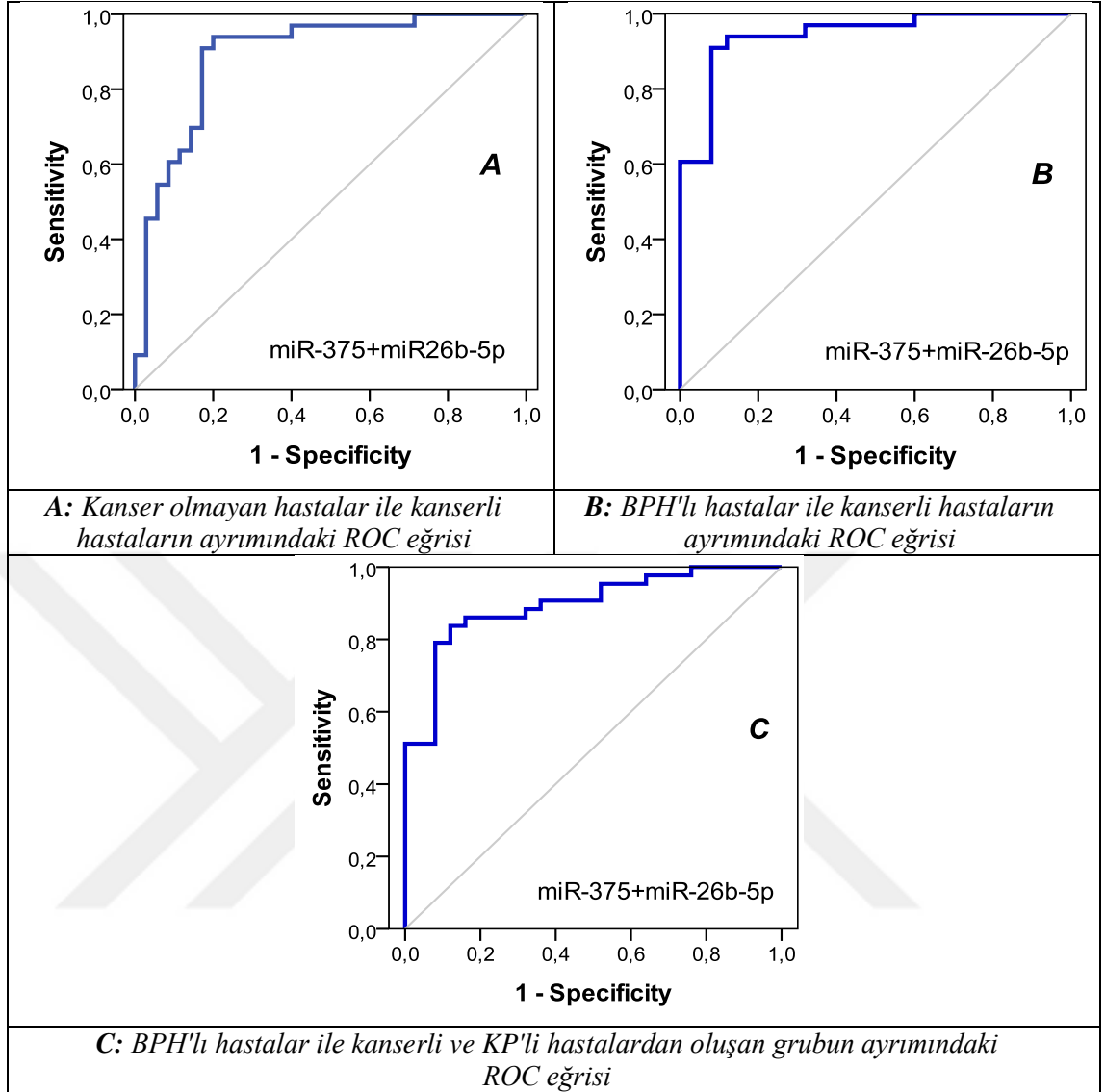
Şekil 4.5. Alt grupların birbirinden ayırımında miRNA'lara ait ROC eğrileri.

miRNA'ların kombine olarak tanısal yeterliliklerinin araştırılması için lojistik regresyon ve ROC analizi yapıldı. Sonuçlar Tablo 4.8 ve Şekil 4.6'te gösterilmiştir.

Tablo 4.8. miRNA'ların kombinasyonunun gruplar arası tanısal yeterliliği.

miRNA	Grup	AUC	P değeri	Spes. (%)	Sens. (%)	PPD (%)	NPD (%)
	Kanser olmayan - Kanser	0.891	<0.001	83	91	83	91
miR-375+miR-26b	BPH - Kanser	0.944	<0.001	92	91	94	89
	BPH - (KP+Kanser)	0.896	<0.001	88	84	92	76

Yapılan farklı kombinasyonlarda en yüksek AUC değerini miR-375 ve miR-26b-5p kombinasyonu sağlamıştır. Bu kombinasyona diğer miRNA'ların ilave edilmesi ya da tüm miRNA'ların aynı anda kombine edilmesi, daha yüksek bir AUC değeri sağlamamıştır. Buna göre, miR-375 ve miR-26b-5p kombinasyonunun kanser olmayan hasta grubundan kanser grubunun ayırımında AUC değeri 0.891, sensitivite %91, spesifisite %83, PPD %83 ve NPD %91 olarak belirlenmiştir. miR-375 ve miR-26b-5p kombinasyonunun BPH'tan kanser grubunun ayırımında AUC değeri 0.944'e yükselmektedir. Bu durumda sensitivite %91, spesifisite %92, PPD %94 ve NPD %89 olmaktadır. miR-375 ve miR-26b-5p kombinasyonunun, BPH'lı hasta grubundan KP'li ve kanserli hastalardan oluşan grubun ayırımında ise AUC değeri 0.896, sensitivitesi %84, spesifisitesi %88, PPD %92 ve NPD %76 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. miR-375 ve miR-26b-5p'nin kombinasyonunun ROC eğrileri.

5. TARTIŞMA

PKa, erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür ve kanser kaynaklı ölümlerde beşinci sırada yer almaktadır (GLOBOCAN, 2012). BPH ve prostatitler erkeklerde sık görülen diğer prostat hastalıklarıdır. PSA testi PKa taramalarında yaygın olarak kullanılan bir test olsa da önemli kısıtlılıklara sahiptir. Her ne kadar prostata spesifik olsa da PKa'ya spesifik değildir ve bir çok farklı durumda düzeyleri yükselebilmektedir. Bunlar arasında BPH ve prostatitler önde gelen nedenlerdendir (Bailey ve Brewster, 2011; Lim, 2017). PKa tanısında serum total PSA düzeyleri ölçümünün tanısal yeterliliğinin sınırlı olması, PKa tanısı için yeni biyobelirteç arayışlarına hız kazandırmıştır. 2000'li yılların başından itibaren kanserle ilişkileri kurulan miRNA'lar da PKa tanısında biyobelirteç adayları arasında yer almaktadır.

miRNA'lar yaklaşık 20-22 nükleotid uzunluğunda, genlerin düzenlenmesinde post-transkripsiyonel aşamada görev alan, kodlanmayan RNA molekülleridir. miRNA'lar nükleusta sentezlendikten sonra sitoplazmaya aktararak, mRNA'ya bağlanıp, eşleşmenin düzeyine göre translasyonun baskılanması ya da mRNA'nın parçalanması yoluyla protein sentezini ve dolayısıyla gen ifadesini düzenleyen RNA molekülleridir (Peng ve Croce, 2016).

miRNA'ların kanserle ilişkisi ilk olarak Calin vd. tarafından 2002 yılında KLL hastalarında miR-15a ve miR-16-1'in downregülasyonunun gösterilmesiyle ortaya konulmuştur (Calin, vd., 2002). Bu tarihten itibaren dokular, hücre hatları ve dolaşımda yer alan miRNA'lar üzerinde yapılan çalışmalarda, çeşitli kanser türlerindeki rolleri ortaya konulmaya çalışılmıştır (Jansson ve Lund, 2012).

miRNA'ların kanser tanısı, tedavi takibi ve prognoz tahmininde invaziv olmayan birer biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri fikrini oluşturan ilk çalışmalar, 2008 yılında Lawrie vd. ile Mitchell vd. tarafından yapılan çalışmalardır. Lawrie vd. yaptıkları çalışma ile diffuz büyük B hücreli lenfomada miR-21'in serumda yüksek düzeylerde bulunduğunu göstermişlerdir. Mitchell vd. ise PKa'da miR-141'in serumdaki seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, miRNA'ların oda ısısında 24 saat inkübasyon sonrası serumdaki seviyelerinin değişmediği, çoklu dondurma ve çözündürme reaksiyonlarına karşı dirençli oldukları ve bu özellikleri nedeniyle stabil bir biyobelirteç olabilecekleri belirtilmiştir (Lawrie, vd., 2008; Mitchell, vd., 2008).

Çalışmamızda BPH, KP ve PKa'lı hasta serumlarında literatürde PKa ile ilişkisine yönelik çalışmalar bulunan miRNA'lardan miR-375, miR-93-5p, miR-125b-5p, miR-30c-5p, let-7c-5p, miR-26b-5p, miR-223-3p, miR-181-a2-5p, miR-141-3p, miR-221-3p, miR-222-3p ve miR-331-3p'nin serumdaki düzeylerinin tanısal yeterliliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda ayrıca, KP'li hasta grubunun PKa tanısında miRNA'ların tanısal yeterliliğini etkileyip etkilemediği de değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda kanser ve kanser olmayan grup (BPH ve KP) arasında yedi miRNA'nın serumdaki düzeylerinin farklı olduğu görülmüştür. Bu miRNA'lar; miR-375, miR-93-5p, miR125b-5p, miR-30c-5p, miR-26b-5p, let-7c-5p ve miR-223-3p'dir. Beş miRNA'nın serum seviyelerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Bu miRNA'lar ise miR-181a2-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-141-3p ve miR-331-3p'dir.

Literatürde yer alan konu ile ilgili çalışmalara baktığımızda bizim bulgularımızla örtüşen çalışmalar olduğu gibi, bizim bulgularımıza zıt olan çalışmalarda yer almaktadır. PKa'da dolaşımdaki miRNA'ların değerlendirildiği ilk çalışmada; 25 metastatik PKa hastası ve 25 sağlıklı kontrol grubu arasında, miR-141'in serum düzeyinin farklı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, tek başına miR-141'in serumdaki seviyelerinin AUC değeri 0.907 olarak hesaplanmış ve PKa'yı sağlıklı kontrolden ayırmadaki spesifitesi %100, sensitivitesi %60 olarak bildirilmiştir (Mitchell, vd., 2008).

Bizim çalışmamızda, miR-141-3p, toplam 68 örneğin yalnızca 38'inde (21 BPH, 5 KP ve 12 PKa) eşik değerin üzerinde amplifiye olmuş, diğer 30 örnekte ise tespit edilememiştir (bkz. Tablo 4.4). miR-141'in amplifiye olduğu hasta serumları dikkate alınarak yapılan istatistiksel analizde, miR-141'in serum seviyelerinin gruplar arasında anlamlı olmadığı görülmüştür ($P=0.106$).

miR-141'in PKa hastalarının kanında (plazma ya da serum), kontrol grubuna kıyasla yüksek tespit edildiği bazı çalışmalar vardır. Selth vd. ve Cheng vd. tarafından yapılan çalışmalarda, metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri (mKDPK) hasta grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla serum miR-141 seviyelerinin yüksek olduğunu tespit edilmiştir (Selth, vd., 2012; Cheng, vd., 2013). Bryant vd. 78 PKa'lı hasta plazmasından izole edilen mikroveziküllerdeki miR-141 seviyelerinin sağlıklı

kontrollere göre 4.29 kat arttığını bildirmişlerdir (Bryant, vd., 2012). Kelly vd. tarafından yapılan ve 75 PKa'lı hasta ve 27 BPH'lı hastanın dahil edildiği çalışmada, PKa'lı hasta plazmalarındaki miR-141 seviyeleri, BPH'a kıyasla upregüle olarak bulunmuştur. Bu çalışmada miR-141'in AUC değeri 0.655 olarak hesaplanmıştır (Kelly, vd., 2015). Watahiki vd., Brase vd. ve Nguyen vd. tarafından yapılan çalışmalarda ise miR-141'in PKa'da prognozun değerlendirilmesindeki rolüne yönelik bulgular sunulmuştur. Bu çalışmalarda; mKDPK grubunda, lokalize PKa grubuna göre dolaşımdaki miR-141 seviyelerinin upregüle olduğu bildirilmiştir. Watahiki vd.'nin çalışmalarında mKDPK ve lokalize PKa'nın ayrımında, miR-141'in AUC değeri 0.878, spesifisite ve sensitivite değerleri sırasıyla %96 ve %56 olarak hesaplanmıştır. Nguyen vd.'nin yaptıkları çalışmada miR-141 seviyeleri mKDPK'de düşük riskli PKa'ya kıyasla upregüle olarak tespit edilmişken, yüksek riskli lokalize PKa grubu ile mKDPK grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Brase, vd., 2011; Watahiki, vd., 2013; Nguyen, vd., 2013).

miR-141'in PKa'da dolaşımdaki seviyelerinin değerlendirildiği bazı çalışmalar ise bizim çalışmamızla aynı yönde bulgular içermektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada 51 PKa'lı hasta ve 20 sağlıklı kontrolün plazma örneklerinde miR-141 seviyeleri açısından fark tespit edilmemiştir (Agaoglu, vd., 2011). Kachakova vd. tarafından yapılan çalışmada, 59 PKa'lı hasta ile 16 BPH'lı hasta ve 27 sağlıklı genç erkekten oluşan gruplar arasında miR-141'in plazma seviyeleri açısından fark izlenmemiştir (Kachakova, vd., 2015).

Yukarıda bahsedilen çalışmalara bakıldığında miR-141'in dolaşımda upregüle olarak tespit edildiği hasta gruplarının, genellikle mKDPK hastalarından oluştuğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda PKa grubunda yer alan hastalarda her ne kadar metastaz değerlendirilmemiş olsa da örnek toplama zamanı itibariyle tedavi görmemiş, medikal kastrasyona tabi tutulmamış ve dolayısıyla kastrasyona direnç geliştiği söylenemeyecek hastalardan oluşmaktadır. Bu itibarla, literatürde yer alan çalışmalardan bazılarına kıyasla bizim çalışmamızda, PKa ve kanser olmayan kontrol grubu arasında miR-141'in serum seviyeleri açısından anlamlı fark olmamasının nedeni, miR-141'in PKa'da androjen yoksunluk tedavisi sırasında ya da metastaz aşamasında yükselmiş olabileceği ihtimalidir. Nitekim, bu görüşümüzü destekleyen bazı bulgular Xiao vd. ve Agaoglu vd. tarafından yapılan çalışmalarda sunulmuştur. Xiao vd.'nin

yaptığı çalışmada, miR-141'in androjen reseptörünün (AR) ko-represörü olan bir proteini (small heterodimer partner, shp) hedefleyerek, androjene duyarlı PKa hücre hatlarında AR transkripsiyonunu artırdığı bildirilmiştir (Xiao, vd., 2012). Agaoglu vd.'nin yaptığı çalışmada ise sağlıklı kontrol grubu ile PKa grubu arasında miR-141'in plazma seviyeleri açısından fark görülmezken, metastatik PKa hasta grubunda (n=20), lokalize PKa'lı hastalara kıyasla miR-141'in upregüle olduğu görülmüştür (Agaoglu, vd., 2011). Ayrıca, Kachakova vd.'nin yaptıkları ve miR-141'in plazma seviyeleri açısından PKa, BPH ve sağlıklı kontrol grupları arasında fark bulamadıkları çalışmada, 59 hastadan oluşan PKa'lı hasta grubunun 55 tanesi metastatik değildir ve miR-141, üç PKa ve dört BPH hastasında çalışmamızla uyumlu bir şekilde hiç tespit edilememiştir (Kachakova, vd., 2015).

Çalışmamızda miR-221-3p, miR-222-3p, miR-331-3p ve miR-181-a2-3p'nin serumdaki seviyeleri açısından PKa ve kanser olmayan gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Literatürde, bu miRNA'ların dolaşımdaki seviyelerinin değerlendirildiği çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir.

miR-221 ve miR-222, X kromozomunun kısa kolunda kodlanan bir gen kümesinde sıralı olarak kodlanmaktadır. Çeşitli kanser türlerinde onkogenik ya da tümör süpresör olarak fonksiyon gördüklerine dair çalışmalar bulunmaktadır (Garofalo, vd., 2012).

miR-221 ve -222'nin PKa'da doku ya da dolaşımdaki seviyeleri çeşitli amaçlarla araştırılmıştır. miR-221 ve miR-222'nin tanısal ve prognostik biyobelirteç olarak performansı, üç farklı çalışmada değerlendirilmiştir. Bu çalışmalardan Agaoglu vd. tarafından 20'si metastatik toplam 51 PKa'lı hasta ve 20 sağlıklı kontrolün plazmalarında yapılan çalışmada ve Kotb vd.'nin 10 PKa'lı ve 10 BPH'lı hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, miR-221'in PKa'da sağlıklı kontrollere kıyasla upregüle olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Agaoglu vd.'nin çalışmasında metastatik PKa grubunda miR-221'in dolaşımdaki seviyeleri lokalize PKa'ya kıyasla daha yüksek tespit edilmiştir. (Agaoglu, vd., 2011; Kotb, vd., 2014). Bizim çalışmamızda ise PKa'lı hasta grubunda metastaz değerlendirilmemiş olup, yukarıda bahsedilen çalışmalara kıyasla elde edilen zıt sonuçların, miR-221'in metastatik PKa'lı hastalarda upregüle olmasından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Kelly vd. tarafından 75 PKa ve 27 BPH'lı hasta üzerinde yapılan çalışmada, bizim çalışmamızla uyumlu bir şekilde miR-221'in periferik tam kan örneklerindeki ekspresyon seviyelerinin PKa ile BPH arasında farklı olmadığı görülmüştür (Kelly, vd., 2015). Bu çalışmanın bizim çalışmamızla ortak yanı sadece miR-221'in gruplar arası farklı bulunmaması değil, hasta gruplarının seçimi ve kan alınma aşamasındaki benzerliktir. Zira, tıpkı bizim çalışmamızda olduğu gibi Kelly vd. tarafından yapılan çalışmada da biyopsi öncesi kan alımı yapılmış, biyopsi ile kanser tanısı konulanlar ve konulmayanlar farklı gruplara ayrılmıştır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde bu çalışmada da metastaz değerlendirilmesi yapılmamıştır. Bu çalışma ile bizim çalışmamızın temel farkı ise periferik kan örneklerinin işleme biçimidir. Bizim çalışmamızda serum örnekleri kullanılmışken, Kelly vd.'nin çalışmasında tam kan örnekleri kullanılmıştır. Agaoglu vd. ile Kotb vd.'nin çalışmalarının tersine, bizim çalışmamızla Kelly vd.'nin çalışmasının sonuçlarının uyumlu olması, miR-221'in PKa'da metastazla ilişkili olabileceği şeklindeki yorumumuzu kuvvetlendirmektedir (Agaoglu, vd., 2011; Kotb, vd., 2014; Kelly, vd., 2015).

Literatürde miR-221 ve -222'nin PKa'da biyokimyasal rekürrens tahmininde kullanılıp kullanılmayacağını araştırıldığı iki farklı çalışmada iki farklı sonuç alınmıştır. Singh vd. tarafından yapılan çalışmada, radikal prostatektomi sonrası biyokimyasal rekürrens riskinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada düzeyleri ölçülen miRNA'lardan ikisi miR-221 ve -222'dir. Çalışma sonucunda miR-222'nin serumdaki yüksek seviyelerinin radikal prostatektomi sonrası rekürrens riskini 2.8 kat artırdığı belirtilmiştir. miR-221 için ise anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (Singh, vd., 2014). Amankwah vd. ise obez ve obez olmayan PKa'lı hasta gruplarında radikal prostatektomi sonrası rekürrens riski ile miR-221 ve miR-222'nin prostat dokusundaki seviyeleri arasında ilişki olmadığını bildirmişlerdir (Amankwah, vd., 2013).

miR-221 ve miR-222'nin PKa'da kastrasyona direnç gelişimi ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda birbiriyle çelişen sonuçlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda kastrasyona dirençli PKa'da miR-221 ve miR-222 seviyeleri upregüle bulunurken (Santos, vd., 2014; Sun, vd., 2012; Yang, vd., 2014), bazı çalışmalarda downregüle olarak tespit edilmiştir (Goto, vd., 2015; Gui, vd., 2017). Bu çalışmalara kısaca bakacak olursak; Santos vd. tarafından yapılan çalışmada miR-221 ve -222 ekspresyon seviyelerinin kastrasyona dirençli PC3 hücre hattında upregüle olduğu bildirilmiştir. Bu

çalışmada, periferik tam kan örneklerinde miR-221 seviyeleri yüksek olan PKa'lı hastaların, medikal kastrasyona daha erken direnç geliştirdikleri belirtilmiştir (Santos, vd., 2014). Sun vd. tarafından yapılan çalışmada miR-221 ve -222 ekspresyon seviyelerinin kastrasyona dirençli PKa dokusunda, normal komşu prostat dokularına ve hormona duyarlı PKa dokularına kıyasla upregüle olduğu bildirilmiştir. İlginç bir şekilde aynı çalışmada, miR-221 ve -222'nin hormona duyarlı PKa dokularında normal dokulara kıyasla anlamlı seviyede downregüle oldukları bildirilmiştir (Sun, vd., 2012). Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada miR-221 ve -222'nin kastrasyona dirençli PKa hücre hattında androjen duyarlı hücre hattına kıyasla yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, miR-221 ve -222'nin inhibisyonunun, kastrasyona dirençli PKa hücrelerinde proliferasyonu azalttığı ve apoptozisi artırdığı bildirilmiştir (Yang, vd., 2014). Goto vd.'nin 38 kanser olmayan, 54 PKa ve 8 kastrasyona dirençli prostat dokusu örnekleri kullanarak yaptıkları çalışmada, miR-221 ve miR-222'nin PKa'da normal prostat dokusuna kıyasla downregüle oldukları gösterilmiştir. Dahası, kastrasyona dirençli PKa doku örneklerinde de bu iki miRNA normal prostat dokusuna kıyasla downregüle bulunmuştur. Ayrıca, PKa'lı dokularda düşük miR-222 seviyelerinin, daha kısa süreli progresyonsuz dönem ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Goto, vd., 2015). Kastrasyona dirençli PKa hücre hattı olan C4-2B'de miR-221 ve -222 ekspresyon seviyelerinin androjene duyarlı hücre hatlarına kıyasla downregüle olduğu çok kısa zaman önce gösterilmiştir. Bu downregülasyonun AR aracılığı ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Gui, vd., 2017).

Çalışmamızda miR-331-3p'nin serum seviyeleri PKa ve kanser olmayan grup arasında yapılan t-test ve PKa, BPH ve KP grupları arasında yapılan varyans analizi sonucuna göre gruplar arasında farklı bulunmamıştır ($p=0.062$). Aynı şekilde, <https://www.qiagen.com> sitesi üzerinden online olarak gerçekleştirilen log 2 (fold change) hesaplamalarında miR-331-3p seviyeleri kanser ve kanser olmayan gruplar arasında farklı değildir.

PKa'da miR-331-3p ve miR-181-a2 seviyeleri ile ilgili olarak literatüre baktığımızda birbirinden farklı sonuçlar olduğu görülmektedir. Bryant vd. tarafından yapılan çalışmada iki farklı hasta seti kullanılmıştır. İlk çalışma 15'i metastatik 78 PKa'lı hasta ve 28 normal kontrol grubu plazmalarından izole edilen mikroveziküller üzerinde yapılmıştır. İkinci çalışma ise radikal prostatektomi sonrası takip edilen

hastalardan, hastalığın yeniden ortaya çıkması sonucu (rekürrens) metastaz gelişen 47 hasta ve biyokimyasal rekürrens görülmeyen 72 hastanın serumlarından izole edilen eksozom ve mikroveziküller üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada ilk hasta seti üzerinde PKa'lı hastalarda normal gruba kıyasla miR-331-3p'nin 5.39 kat upregüle olduğu, miR-181-a2-3p'nin ise 2.69 kat downregüle olduğu bildirilmiştir. İkinci hasta seti grupları arasında ise bu iki miRNA açısından bir farklılık tespit edilmemiştir (Bryant, vd., 2012). Dolayısıyla, bu iki miRNA'nın PKa'nın tanısında biyobelirteç olarak değeri olabileceği söylenebilir. Bu çalışmanın aksine bizim çalışmamızda miR-331 ve miR-181-a2 seviyelerinde prostat kanseri ile BPH arasında farklılık görülmemesinin nedeni, Bryant vd.'nin çalışmasında miRNA ölçümlerinin periferel kandan izole edilen mikroveziküller kullanılarak yapılması olabilir. Zira, bizim çalışmamızda serumda bulunan miRNA'ların seviyeleri belirlenmiştir. Bu görüşümüzü destekleyici olarak, Sapre vd. tarafından 33 yüksek riskli (gleason ≥ 7 , tümör hacmi $>1cc$, metastaz varlığı) ve 34 düşük riskli (gleason=6, PSA <10 ng/mL, T2a) hasta üzerinde yapılan çalışmada, bizim çalışmamızla uyumlu bir şekilde miR-331'in plazma seviyelerinin gruplar arasında farklı olmadığı bildirilmiştir (Sapre, vd., 2014). Bizim çalışmamızla Sapre vd.'nin çalışmasında elde edilen sonuçların, Bryant vd.'nin çalışmasının aksine birbirleri ile uyumlu olması, plazma ile serum elde edilmesindeki aşamaların mikrovezikül elde edilmesine kıyasla benzer olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Literatürde yer alan bu iki çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki benzer ve zıt ilişki, miRNA ölçümlerinde kullanılan periferel kan örneğinin işleniş biçimindeki farklılığın, miRNA'ların dolaşımdaki seviyeleri üzerinde etkili olabileceği şeklindeki görüşümüzü desteklemektedir. Ayrıca, çok yakın bir zaman önce Epis vd. tarafından 46 PKa'lı doku ve normal komşu dokular üzerinde yapılan çalışmada, miR-331-3p'nin PKa'lı doku örneklerinin %54'ünde (25/46) normal komşu dokulara kıyasla 1.5 kattan daha fazla downregüle olduğu bildirilmiştir (Epis vd_2017). Doku seviyelerinde tespit edilen bu downregülasyon ve dolaşımdaki seviyelerinde elde edilen farklı sonuçlar, miR-331-3p'nin prostat kanseri tanısında kullanımına yönelik daha ileri çalışmaların yapılması gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda; miR-375, miR-93-5p, miR125b-5p, miR-30c-5p, miR-26b-5p, let-7c-5p ve miR-223-3p serum seviyelerinin PKa'lı hasta grubu ve kanser olmayan grup arasında farklı olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.3). Yapılan "fold change"

hesaplamasında, PKa'lı hasta serumlarında kanser olmayan gruba kıyasla miR-375'in 4.48 kat, miR-93-5p'nin 1.79 kat, miR-125b-5p'nin 3.60 kat, miR-30c'nin 2.64 kat, miR-26b-5p'nin 12.43 kat, let-7c-5p'nin 13.01 kat ve miR-223-3p'nin 5.67 kat downregüle olduğu belirlenmiştir. miRNA'ların PKa'daki prognostik özellikleri de çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Yapılan Spearman korelasyon analizinde gleason skoru ile miRNA'ların serum seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Aynı şekilde gleason $\leq$ 6 (n=9), gleason=7 (n=10) ve gleason $\geq$ 8 (n=14) grupları arasında miRNA'ların serum seviyeleri açısından farklılık gözlenmemiştir.

Çalışmamız kapsamında kanser olmayan grup altında değerlendirilen KP'li hasta grubundaki miRNA'ların serum seviyelerinin, BPH ve PKa'ya kıyasla farklı olup olmadığı da araştırıldı. BPH, KP ve PKa grupları ayrı ayrı değerlendirildiğinde miR-375, miR-93-5p, miR-125b-5p, miR-30c, miR-26b, let-7c-5p ve miR-223-3p serum seviyelerinin gruplar arasında farklı olduğu görüldü (Bkz. Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

Çalışmamızda dikkat çekici bir bulgu miR-375'in PKa'lı hasta serumlarında kanser olmayan gruba kıyasla 4.48 kat downregüle bulunmasıdır. Literatürde yer alan çalışmalara baktığımızda bir çok çalışmada miR-375'in dolaşımdaki seviyelerinin PKa'da upregüle olduğu bildirilmiştir. Kısaca bu çalışmalara inlemek gerekirse; Brase vd. ilk olarak 7 metastatik ve 14 lokalize PKa'lı hasta serumlarında miRNA seviyelerini araştırmış ve miR-375'in metastatik PKa'lı hasta serumlarında lokalize PKa'ya kıyasla 4.3 kat upregüle olduğu bildirmişlerdir. Daha sonra 45 PKa'lı hasta serumunda yaptıkları birinci validasyon çalışmasında, yüksek risk faktörü (yüksek gleason skoru, lenf nodu metastazı, uzak metastaz) içeren hastalarda miR-141 ve miR-375'in serum seviyelerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada toplam 71 PKa'lı hastada yapılan ikinci validasyon çalışmasında da yüksek riskli (gleason $\geq$ 8 veya N1) hasta grubunda miR-141 ile birlikte miR-375'in serum seviyelerinin orta riskli (gleason=7 veya N0) hasta grubuna kıyasla upregüle olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada 36 PKa'lı doku ve 36 benign prostat dokusu üzerinde yapılan çalışmada ise PKa'lı doku örneklerinde miR-141 ve miR-375'in upregüle olduğunu belirtmişlerdir (Brase, vd., 2011). Bryant vd. tarafından yapılan çalışmada, miR-375'in plazmadan elde edilen mikroveziküllerdeki seviyesi metastatik PKa'da lokalize prosPKa'ya kıyasla 3.69 kat upregüle olarak bulunmuşken, normal kontrol ve PKa arasında ya da normal kontrol ile lokalize PKa arasında fark tespit edilmemiştir. Aynı çalışma için farklı hasta

gruplarından alınan serumlardan izole edilen mikrovezikül ve eksozomların her ikisinde birden, metastatik PKa'da non-rekürren PKa hastalarına kıyasla miR-375'i upregüle olarak tespit etmişlerdir (Bryant, vd., 2012). Selth vd. tarafından yapılan ve 25 mKDPK ve 25 sağlıklı kontrolün dahil edildiği çalışmada, miR-375'in serum seviyelerinin mKDPK'de sağlıklı kontrole kıyasla upregüle olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca miR-375'in intratümöral yüksekliğinin radikal prostatektomi sonrası biyokimyasal relapsın tahmininde gleason skoru ile birlikte ya da gleason skorundan bağımsız olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Selth, vd., 2012). Nguyen vd.'nin 26 KDPK ve 28 düşük riskli PKa'lı hasta serumunda yaptıkları analizde, miR-375'in KDPK grubunda düşük riskli PKa'ya kıyasla 8 kat upregüle olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada düşük riskli PKa dokularında normal prostat dokusuna kıyasla miR-375'in upregüle olduğu, lokalize PKa ile metastatik PKa arasında miR-375'in prostat dokusu seviyelerinde bir farklılık olmadığı belirtilmiştir (Nguyen, vd., 2013). Bütün bu çalışmalarda dikkat çeken bulgu metastatik PKa gruplarında miR-375'in yüksek bulunmasıdır. Bizim çalışmamızda miR-375'in serum seviyelerinin PKa, KP ve BPH hasta grupları arasında farklı olmamasının nedeni, PKa hasta grubumuzda yer alan örneklerin metastatik ya da kastrasyona dirençli prostat kanserli hastalardan oluşmama ihtimalinin daha yüksek olması şeklinde yorumlanmıştır. Zira, çalışma gruplarımız, henüz PKa tanısı almayan ve dolayısı ile herhangi bir androjen deprivasyon terapisi almamış olan hastalardan biyopsi öncesi alınan kanlardan oluşmaktadır.

Literatürde yer alan bir çalışmada, içerisinde miR-375'in de bulunduğu miRNA panelinin plazma seviyelerinin yüksek riskli ve düşük riskli PKa'lı hastalar arasında farklı olmadığı bildirilmiştir (Sapre, vd., 2014). Kachakova vd. tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışma ise bizim çalışmamızla uyumlu bulgular içermektedir. Bu çalışmada let-7c, miR-30c, miR-141 ve miR-375'in ekspresyon seviyeleri; 59 PKa'lı hasta, 16 BPH'lı hasta ve 11 asemptomatik genç erkekten (ortalama yaş 27) oluşan kontrol grubundan alınan plazma örneklerinde ölçülmüştür. Çalışma sonucunda, PKa'da BPH grubuna kıyasla en fazla downregülasyon miR-375'te izlenmiştir (Kachakova, vd., 2015).

Çalışmamızda PKa ve kanser olmayan hasta grupları arasında 1.79 kat downregüle olarak bulunan miR-93-5p'nin ekspresyon seviyelerinin PKa'da upregüle olarak tespit edildiği çalışmalar bulunduğu gibi, dolaşımda yapılan bir çalışmada ve

doku seviyelerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak yüksek riskli PKa'da ve lenf nodu metastazı olan grupta downregüle olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalara kısaca baktığımızda; Ambs vd.'nin 60 prostat tümör dokusu ve 16 normal prostat dokusu üzerinde yaptıkları çalışmada, miR-93 düzeyleri PKa'lı dokularda normal dokulara kıyasla 1.3 kat upregüle bulunmuştur (Ambs, vd., 2008). Hart vd. tarafından yapılan çalışmada normal prostat dokularına kıyasla, organa sınırlı (pT2) ve ekstrakapsüler tutulum olan (pT3, N0) PKa dokularında miR-93 seviyelerinin upregüle olduğunu belirtmişlerdir. İlginç bir şekilde bu çalışmada düzeyleri belirlenen miRNA'lardan içlerinde miR-93'ün de bulunduğu bazılarının lenf nodu metastazı olan prostat tümörlerinde (pN1), normal dokulara kıyasla düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (Hart, vd., 2013). PKa'da miR-93'ün dolaşımdaki seviyelerinin PKa ve sağlıklı kontroller arasında dolaşımdaki değişiminin değerlendirildiği Moltzahn vd. tarafından yapılan çalışmada, PKa'da bir skorlama sistemi olan CAPRA skoruna göre 12 düşük riskli, 12 orta riskli, 12 yüksek riskli ve 12 sağlıklı kontrolün serumları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda miR-93'ün tüm risk grubundaki kanserli hastalardan oluşan grupta ve yüksek riskli hasta grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla upregüle olduğu bildirilmiştir (Moltzahn, vd., 2011). Oysa Mihelich vd. tarafından yapılan, 50 BPH'lı, 50 düşük riskli (gleason=3) ve 50 yüksek riskli (gleason=4 ve 5) hastada miRNA'ların serumdaki seviyelerinin araştırıldığı çalışmada, miR-93'ün serum seviyeleri, yüksek riskli PKa grubunda BPH'a ya da düşük riskli PKa grubuna kıyasla önemli oranda downregüle olarak tespit edilmiştir (Mihelich, vd. 2015).

Çalışmamızda miR125b-5p, -30c-5p, -26b-5p, -223-3p ve let-7c-5p serum seviyelerinin PKa'lı hasta grubunda kanser olmayan gruba kıyasla downregüle bulunması literatürde mevcut olan diğer araştırmalar ile uyumludur. Mihelich vd. tarafından yapılan, 50 BPH'lı, 50 düşük riskli (gleason=3) ve 50 yüksek riskli (gleason=4 ve 5) hastada miRNA'ların serumdaki seviyelerinin araştırıldığı çalışmada, miR-30c ve miR-223'ün serum seviyeleri, yüksek riskli PKa grubunda BPH'a ya da düşük riskli PKa grubuna kıyasla önemli oranda downregüle olarak tespit edilmiştir (Mihelich, vd. 2015). Kachakova vd. tarafından 59 PKa'lı hasta, 16 BPH'lı hasta ve 11 asemptomatik genç erkekten (ortalama yaş 27) oluşan kontrol grubundan alınan plazma örneklerinde gerçekleştirilen çalışmada let-7c ve miR-30c ekspresyon seviyeleri PKa'da BPH'a kıyasla downregüle olarak tespit edilmiştir (Kachakova, vd., 2015). Moltzahn

vd. tarafından yapılan çalışmada, PKa'da bir skorlama sistemi olan CAPRA skoruna göre 12 düşük riskli, 12 orta riskli, 12 yüksek riskli ve 12 sağlıklı kontrolün serumları kullanılarak yapılan çalışma sonucunda, miR-223, -30c ve let-7'nin serum seviyeleri, tüm risk grubundaki kanserli hastalardan oluşan grupta sağlıklı kontrollere kıyasla downregüle olarak tespit edilmiştir (Moltzahn, vd., 2011). miR-125b'nin serumdaki seviyeleri ile ilgili ilginç bir bulgu, Singh vd. tarafından yapılan çalışmada sunulmuştur. Radikal prostatektomi sonrası rekürrens gelişen 31 PKa hastası ve rekürrens gelişmeyen 62 hastanın dahil edildiği çalışmada, miR-125b'nin serum seviyelerinin rekürren PKa olan hasta grubunda rekürren PKa geliştirmeyenlere kıyasla upregüle olduğu tespit edilmiştir. Oysa aynı hastaların tümör dokuları üzerinde yapılan çalışmada, miR-125b'nin azalmış seviyelerinin rekürren PKa'nın tahminin de kullanılabileceği belirtilmiştir. Bu durum yazarlar tarafından, agresif tümörlerde miR-125b'nin aktif olarak dolaşıma taşındığı ve böylece, rekürren PKa'lı hastaların serumlarında prostat dokusuna kıyasla düşük bulunduğu şeklinde yorumlanmıştır (Singh, vd., 2014).

Dolaşımdaki çalışmalara ilave olarak, çalışmamızda PKa'da downregüle olarak tespit edilen miR-125b, -223, -30c, -26b ve let-7c'nin doku seviyelerinin değerlendirildiği çalışmalarda da bu miRNA'ların PKa'lı dokularda değişimi bildirilmiştir. He vd. tarafından Çinli hasta grubunda 4 PKa'lı doku ve bu dokuların komşu normal dokularının kullanıldığı çalışmada, miR-30c ve -26b PKa'da downregüle olarak tespit edilmiştir (He H, vd., 2013). Ling vd. tarafından yapılan çalışmada miR-30c'nin doku seviyelerinin PKa'da kontrole kıyasla downregüle olduğu bildirilmiştir. Dahası, miR-30c'nin PKa'daki downregülasyonu, yüksek gleason skoru, ileri patolojik evre ve biyokimyasal rekürrens ile ilişkili bulunmuştur (Ling, vd., 2014). Ozen vd. 10 benign prostat dokusu ve 30 PKa dokusu üzerinde yaptıkları çalışmada, miR-125b ve let-7c seviyelerinin, PKa'da önemli oranda downregüle olduğunu bildirmişlerdir (Ozen, vd., 2008).

Çalışmamızda önemli bir bulgu da BPH'a kıyasla KP'de miRNA seviyelerinin farklı olmasıdır. BPH'a kıyasla KP'de miR-93-5p ve miR-331-3p upregüle olurken, miR-26b-5p, let-7c-5p ve miR-223-3p önemli düzeyde downregüle olmuştur. Literatürde KP'de dolaşımdaki miRNA'ların değişimini gösteren bir yayına ulaşamamıştır. Bu itibarla çalışmamız KP'de miRNA'ların dolaşımdaki seviyelerinin değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Literatürde konu ile ilgili olarak çok yakın bir zamanda yayınlanan ve Kronik Prostatit/Kronik Pelvik Ağrı Sendromu (KP/KPAS) tanısı alan hastaların prostat sekresyonunda miRNA'ların seviyesi ölçüldüğü çalışma sonucunda, KP/KPAS kategori IIIA olan hasta grubunda (n=30) sağlıklı kontrol grubuna (n=33) kıyasla miR-141-3p, miR-21-5p, miR-30a-5p, miR-30d-5p ve miR-103a-3p'nin prostatik sekresyondaki seviyelerinin 2 kattan fazla upregüle olduğu bildirilmiştir (Chen, vd., 2018).

Prostat dışındaki organların kronik inflamasyonda miRNA'ların tanisal değerinin araştırıldığı bazı çalışmalar bulunmaktadır. Xin vd. tarafından 20 erken kronik pankreatit, 20 geç kronik pankreatit ve 18 sağlıklı kontrol serumlarında qRT-PCR ile yaptıkları miRNA analizinde, erken kronik pankreatitte sağlıklı kontrole kıyasla miR-221 ve miR-130a'nın seviyelerinin upregüle olduğunu, geç kronik pankreatitte ise miR-320a-d seviyelerinin upregüle olduğunu bildirmişlerdir (Xin, vd., 2017). Di Pietro vd.'nin 15 kronik endometrit ve 15 sağlıklı kadını dahil ettikleri bir diğer çalışmada ise kronik endometritte sağlıklı kontrollere kıyasla serum ve endometrium dokusunda miR-27a-3p ve -124-3p seviyelerinin upregüle olduğu ve kronik endometrit tanısında bu miRNA'ların kullanılabileceği belirtilmiştir (Di Pietro, vd., 2018).

Literatürdeki çalışmaların da ortaya koyduğu gibi çeşitli organların kronik inflamasyonda miRNA seviyeleri değişmektedir. Bizim çalışmamızda BPH'a kıyasla KP'de miRNA seviyelerindeki değişim, miR-93-5p ve miR-331-3p hariç PKa ile aynı yönde tespit edilmiştir. Bu iki miRNA'da ise BPH'a kıyasla KP'de upregülasyon varken, PKa'da downregülasyon vardır. Çalışmamızda, BPH'a kıyasla KP'li hastaların serum seviyelerinde farklılık gözlenen miRNA'ların inflamasyon sürecinde moleküler düzeydeki etkilerine yönelik bir araştırma yapılmamıştır. Ancak, literatürde konu ile ilgili yapılan çalışmalarda, miRNA'ların inflamasyon sürecinde aktif rol oynadıkları ve dahası pro-inflamatuvar sitokinler üzerinden kanser gelişiminde rollerinin olabileceği belirtilmektedir.

Fabbri vd. tarafından yapılan çalışma ile miRNA'ların "toll like receptor" (TLR) ailesi ile ilişkileri ortaya konulmuştur. Bu çalışmada miR-21 ve miR-29a'nın mürin TLR-7 ve insan TLR-8 reseptörüne ligand olarak bağlanmasının, prometastatik inflamatuvar cevaplara aracılık ederek, tümör büyümesi ve metastazına yol açabileceği belirtilmiştir (Fabbri, vd., 2012). Benzer şekilde, natural killer hücrelerinde miRNA'ların TLR-1 ile ligand olarak etkileşime girmesiyle nükleer faktör κ B sinyal

yolağını aktive ettiği ve böylece miRNA'ların, konağın enfeksiyonlara karşı cevabı ya da neoplazik dönüşümüne etki edebileceği bildirilmiştir (He S, vd., 2013). Ayrıca, miR-155 ve miR-146a gibi miRNA'ların TNF- α , IL-1 β , NF- κ B gibi moleküler yollar üzerinden inflamasyonda rol oynadığı belirtilmiştir (Raisch, vd., 2013). İnflamatuvar süreçlerde rol oynadığı gösterilen miR-21, miR-155 gibi miRNA'lara bakıldığında, bu miRNA'ların iyi tanımlanmış birer onkogen oldukları dikkat çekici bir bulgudur.

KP, PSA'nın yükselmesine neden olarak, PSA temelinde yapılan PKa taramalarında ayırıcı tanıya etki eden ve PKa'nın BPH'tan ayırımında PSA'nın performansını etkileyen önemli bir faktördür. Çalışmamızda düzeyleri ölçülen miRNA seviyelerinde, BPH'a kıyasla KP ve PKa'da kademeli bir değişimin olması, moleküler düzeyde gerçekleşen inflamasyon ve kanser dönüşümü süreçlerinin dolaşımdaki miRNA profiline de yansıdığını düşündürmektedir. Bu itibarla, dolaşımdaki miRNA seviyelerinin sadece BPH ve PKa ayırımında değil, aynı zamanda bu ikisi arasındaki ayrımı güçleştiren KP'nin ayırıcı tanısında da kullanılmasının mümkün olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, miRNA'ların tanısal yeterliliklerine yönelik analizler de gerçekleştirildi. Bu kapsamda miRNA'ların PKa'nın kanser olmayan gruptan ayırımındaki tanısal performansları ayrı ayrı ve kombine olarak değerlendirildi. Ayrıca, PKa, BPH ve KP'nin birbirlerinden ayırımında miRNA'ların tanısal performansları da değerlendirildi. Analiz sonucunda, yedi miRNA'nın PKa ile kanser olmayan grubun ayırımındaki tanısal performansı istatistiksel olarak önemli bulundu. Bu miRNA'lar için PKa'nın kanser olmayan gruptan ayırımında AUC değerleri miR-375 için 0.781, miR-93-5p için 0.662, miR-125b-5p için 0.782, miR-30c-5p için 0.762, miR-26b-5p için 0.874, let-7c-5p için 0.845 ve miR-223-3p için 0.817 olarak hesaplandı. En yüksek AUC değerine sahip olan miR-26b-5p'nin kanser olmayan hasta grubu ile kanserli hasta grubunun ayırımında sahip olduğu spesifisite değeri %83 iken, sensitivite değeri %82 olarak belirlenmiştir. Bu kestirim değerinde miR-26b-5p, %82 PPD ve %83 NPD'ye sahiptir (bkz. Tablo 4.9).

Konu ile ilgili diğer çalışmalara baktığımızda, Moltzahn vd. sağlıklı kontrolden çeşitli risk düzeylerinden oluşan kanser grubunun ayırımında miR-223'ün AUC değerini 0.876, miR-93'ün AUC değerini ise 0.907 olarak hesaplamışlardır (Moltzahn, vd., 2011). Cheng vd.'nin 21 mKDPK ve 20 sağlıklı kontrol grubunun serumlarında

yaptıkları doğrulama çalışmasında, miR-141, -375, -200a, -200c ve -210 düzeylerini sağlıklı kontrollere kıyasla mKDPK grubunda yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada miR-141'in AUC değeri 0.842, miR-375'in AUC değeri ise 0.660 olarak hesaplanmıştır (Cheng, vd., 2013). Kotb vd. 10 PKa ve 10 BPH'lı hastadan oluşan çalışma grubunda miR-21 ve -221'in serum seviyelerini PKa'da upregüle bulmuşlar ve BPH'tan PKa'nın ayrımında miR-21 için spesifisite ve sensitivite %90 olarak hesaplanmışken, miR-221 için spesifisite ve sensitivite %80 olarak hesaplanmıştır (Kotb, vd., 2014). Kachakova vd. tarafından 59 PKa'lı hasta ile 16 BPH ve 27 sağlıklı genç erkekte oluşan grupta yapılan çalışmada, BPH'tan PKa'nın ayrımında miR-375 için AUC değeri 0.809, spesifisite %73 ve sensitivite %81; let-7c için AUC değeri 0.757, spesifisite %61 ve sensitivite %75; miR-30c için AUC değeri 0.630, spesifisite %42 ve sensitivite %63; miR-141 için AUC değeri 0.510, spesifisite %71 ve sensitivite %50 olarak hesaplanmıştır (Kachakova, vd., 2015).

Çalışmamız kapsamında miRNA'ların kombinasyonlarının tanısal yeterlilikleri de lojistik regresyon analizi ile değerlendirildi. PKa'yı kanser olmayan gruptan ayırma miR-375 ve miR-26b-5p'nin kombinasyonu, tek başlarına miRNA'ların sahip oldukları AUC değerlerinden daha yüksek bir AUC değeri sağlamıştır. Bu kombinasyona diğer miRNA'ların katılması tanısal yeterliliği etkilememiş ya da azaltmıştır. Bu iki miRNA'nın PKa'nın kanser olmayan gruptan ayrımındaki AUC değeri 0.891, spesifisitesi %83, sensitivitesi ise %91 olarak hesaplanmıştır. BPH grubundan KP ve PKa'dan oluşan grubun ayrımında miR-375 ve miR-26b-5p kombinasyonunun AUC değeri ise 0.896 olmuştur ve bu değer, tek başına miR-223-3p'nin sağladığı 0.924 değerinden daha düşüktür (bkz Tablo 4.10).

Literatürde çeşitli miRNA'ların kombinasyonlarının tanısal yeterliliklerine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Chen vd. 44 BPH, 80 PKa ve 54 sağlıklı kontrolden oluşan çalışma grubunda, miR-622, -1285, -30c, let-7c ve let-7e'nin kombinasyonunun PKa'nın sağlıklı kontrolden ayrımında AUC değerini 0.860, BPH'tan ayrımında ise 0.924 olarak hesaplamışlardır (Chen, vd., 2012). Shen vd., D'Amico skoruna göre 38 düşük riskli ve 17 yüksek riskli PKa'lı hastanın plazma örneklerinde miR-20a, -21, -145 ve -221'in kombinasyonunun, düşük riskli PKa ile yüksek riskli PKa ayrımında AUC değerini 0.824, spesifisiteyi %97 ve sensitiviteyi %29 olarak hesaplamışlardır (Shen, vd., 2012). Mihelich vd. tarafından gleason skoruna göre 50 düşük risk, 50 yüksek risk

ve 50 BPH'lı hasta grubunda yapılan çalışmada, içerisinde miR-26b, -223, -30c ve -93'ün de bulunduğu 14 miRNA'nın düzeyleri yüksek riskli PKa'da BPH ve düşük riskli PKa'ya kıyasla downregüle bulunmuştur. Bu 14 miRNA'nın kombinasyonunun, düşük riskli PKa'dan yüksek riskli PKa'nın ayırımında NPD %100 ve PPD %59 olarak hesaplanmıştır (Mihelich, vd., 2015).

Çalışmamız kapsamında KP'nin, PKa ile BPH ayırımında interfere edici bir faktör olup olmadığı da değerlendirildi. Bu amaç doğrultusunda ilk önce KP grubu, PKa grubuna dahil edilerek, oluşturulan bu yeni grubun BPH'tan ayırımında miRNA'ların tanısal yeterlilikleri değerlendirildi. Daha sonra BPH, KP ve PKa gruplarının ayrı ayrı birbirlerinden ayırımında miRNA'ların tanısal yeterlilikleri değerlendirildi.

KP'li hasta grubunu PKa grubuna dahil ederek, BPH'tan PKa ve KP'li hastalardan oluşan grubun ayırımında miRNA'ların tanısal yeterliliklerinin değişip değişmediğinin değerlendirildiği analiz sonucunda, dört miRNA'nın AUC değerlerinin yükseldiği görüldü (bkz. Tablo 4.8). Bu miRNA'lar için hesaplanan AUC değerleri; miR-375 için 0.798, miR-26b-5p için 0.889, let-7c-5p için 0.857 ve miR-223-3p için 0.924 olmuştur. Dört miRNA'nın AUC değerlerinin yükselmiş olması, bu miRNA'ların KP'li hasta serumlarındaki ekspresyon seviyelerinin BPH'tan çok kanser grubuna daha yakın olduğunu göstermektedir. En yüksek AUC değerine sahip olan miR-223-3p'nin BPH'tan PKa ve KP'li hastalardan oluşan grubun ayırımında spesifisitesi %88, sensitivitesi %84 olarak hesaplandı. Aynı kestirim değerinde PPD %92, NPD %76 olarak hesaplandı.

KP grubunun analize dahil edilmemesi ile BPH'tan PKa'nın ayırımında miRNA'ların AUC değerlerinin, miR-93-5p dışında genellikle daha da arttığı görülmüştür. BPH'tan PKa'nın ayırımında en yüksek AUC değerleri sırasıyla miR-223-3p, -26b-5p ve let-7c-5p için hesaplanmıştır. miR-223-3p'nin kanser olmayan gruptan PKa'nın ayırımında AUC değeri 0.817'den 0.938'e yükselmektedir. Bu durumda miR-223-3p'nin sensitivitesi %88 olarak aynı kalırken, spesifisitesi %71'den %88'e yükselmektedir. miR-26b-5p'nin kanser olmayan gruptan PKa'nın ayırımındaki AUC değeri 0.874 iken BPH'tan PKa'nın ayırımındaki AUC değeri 0.926'ya yükselmiştir. Bu durumda miR-375'in sensitivitesi %82 olarak aynı kalırken, spesifisitesi %83'den %92'ye yükselmektedir. Benzer şekilde let-7c'nin kanser olmayan gruptan PKa'nın

ayrımındaki AUC değeri 0.845 iken, BPH'tan PKa'nın ayrımındaki AUC değeri 0.888'e yükselmiştir. İlginç olan, BPH'tan PKa ayrımında diğer miRNA'ların aksine let-7c'nin spesifisitesi değil, sensitivitesi artmıştır. Bu durumda let-7c'nin spesifisitesi yaklaşık olarak aynı kalırken (%71'den %72'e çıkmaktadır) sensitivitesi %76'dan %91'e yükselmektedir. Sadece bir istisna olarak, miR-93-5p'nin kanser olmayan gruptan PKa'nın ayrımındaki AUC değeri 0.662 ile anlamlı iken, BPH'tan PKa'nın ayrımındaki AUC değeri 0.629'a düşmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bkz. Tablo 4.8 ve Tablo 4.9).

BPH'tan PKa'nın ayrımında en yüksek AUC değeri miR-375 ve miR-26b-5p kombinasyonu ile sağlanmıştır. miR-375 ve miR-26b-5p kombinasyonunun kanser olmayan gruptan PKa'nın ayrımındaki AUC değeri 0.891'den 0.944'e yükselmektedir. Bu durumda miR-375 ve miR-26b-5p kombinasyonunun sensitivitesi %91 olarak aynı kalırken, spesifisitesi %83'ten %92'ye yükselmektedir (bkz. Tablo 4.10 ve Şekil 4.6).

Çalışmamız kapsamında ulaşılan bulgulara göre, miRNA'ların gerek tek tek gerekse kombinasyonlarının PKa'nın tanısındaki yeterlilikleri üzerinde KP'nin etkisi bulunmaktadır. Literatürde yer alan ve yukarıda bahsettiğimiz bir çok çalışmada BPH ve PKa'nın ayırıcı tanısı üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Çalışmamız, PKa tanısında miRNA'ların etkinliği değerlendirilirken, yapılan farklı çalışmalarda ~%32 (Carver, vd., 2003) ile ~%21 (Wu, vd., 2013) gibi yüksek bir prevalansa sahip olduğu ortaya konulan KP'nin de dikkate alınması gerektiğini net bir şekilde ortaya koymuştur.

6. SONUÇ

Çalışmamızda on iki adet miRNA'nın BPH, KP ve PKa'lı hasta serumlarındaki seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu miRNA'lardan altı tanesinin PKa'da istatistiksel olarak önemli oranda downregüle olduğu görülmüştür. Bu miRNA'ların PKa'nın benign durumlardan ayırımında tek tek ya da kombine olarak güçlü birer biyobelirteç adayı oldukları değerlendirilmiştir.

Literatürde yer alan çalışma sonuçları ile çalışmamızda elde edilen sonuçlar arasında uyumlu bulgular olduğu gibi bazı farklılar da bulunmaktadır. Özellikle qRT-PCR yöntemi ile yapılan ölçümlerde normalizasyon yöntemi, kullanılan farklı cihazlar ve kitler için bir standardın bulunmaması, miRNA'ların literatürde bulunan farklı sonuçlarının nedenleri arasında olabilir. Ayrıca, genel olarak kanserin ve özel olarak PKa'nın dinamik bir yapı içerisinde bulunması ve kastrasyona direnç gelişimi gibi tedaviye bağlı hücresel değişikliklerin görülebilmesi, farklı çalışmalarda PKa'lı hastaların birbirinden ayrı özellikler taşıyabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, literatürdeki farklı sonuçlara neden olabilecek faktörler arasında sayılabilir.

Çalışmamızda analiz edilen miRNA'ların tanısal yeterliliğine ilişkin bulgular neticesinde ortaya konulan önemli sonuçlardan birisi de, serum miRNA seviyeleri açısından KP grubunun PKa ile benzer olmasıdır. Böylelikle, prostatın benign hastalıkları ile PKa'nın ayırımında miRNA'ların tanısal performanslarının değerlendirilmesinde KP'nin önemli bir interferans faktörü olabileceği ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda özellikle miR-375 ve miR-26b-5p kombinasyonunun PKa'nın BPH'tan ayırımında en yüksek AUC değerini sağlaması, PKa tanısında miRNA kombinasyonlarının, tek tek miRNA'ların kullanımına kıyasla daha yüksek bir tanısal etkinlik sağlayabileceğini göstermektedir.

miRNA'ların klinik tanıda kullanımlarının netleştirilmesi ve literatürde var olan farklı sonuçların sebeplerinin ortaya konulabilmesi için daha standardize koşullarda ve çok sayıda hasta örneklerinin çalışmaya dahil edildiği daha büyük çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Ablin, R.J., "Immunologic studies of normal, benign, and malignant human prostatic tissue", *Cancer*, 29(6): 1570-1574 (1972).
- Ağaoğlu, F.Y., Kovancılar, M., Dizdar, Y., vd., "Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer", *Tumour Biology*, 32(3):583-588 (2011).
- Akbayır, S. ve Muşlu, N., "Prostat Kanseri Tanısında Prostat Spesifik Antijen ve Türevleri", *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 14(3): 189-204 (2016).
- Allegra, A., Alonci, A., Campo, S., vd., "Circulating microRNAs: New biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer", *International Journal of Oncology*, 41: 1897-1912 (2012).
- Amankwah, E.K., Anegebe, E., Park, H., vd., "miR-21, miR-221 and miR-222 expression and prostate cancer recurrence among obese and non-obese cases", *Asian Journal of Andrology*, 15: 226–230 (2013).
- Ambs, S., Prueitt, R.L., Yi, M., vd., "Genomic Profiling of MicroRNA and Messenger RNA Reveals Deregulated MicroRNA Expression in Prostate Cancer", *Cancer Research*, 68(15): 6162-6170 (2008).
- Angelis, G.D., Rittenhouse, H.G., Mikolajczyk, S.D., vd., "Twenty Years of PSA: From Prostate Antigen to Tumor Marker", *Reviews in Urology*, 9(3): 113-123 (2007).
- Asadi, M., Shanehbandi, D., Mohammadpour, H., vd., "Expression Level of miR-34a in Tumor Tissue from Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma", *Journal of Gastrointestinal Cancer*, Online ISSN 1941-6636 (2018).
- Ashley, V., Alford, MD., Joseph, M., vd., "The Use of Biomarkers in Prostate Cancer Screening and Treatment", *Reviews in Urology*, 19(4): 221–234 (2017).
- Bailey, S.V., ve Brewster, S.F. "Prostate cancer: to screen or not to screen", *Archivos Espanoles de Urologia*, 64(5): 406-418 (2011).
- Balk, S.P., Ko Y.J. ve Bubley, G.J., "Biology of Prostate-Specific Antigen", *Journal of Clinical Oncology*, 21(2): 383-391 (2003).
- Balzano, F., Deiana, M., Giudici, S.D., vd., "miRNA Stability in Frozen Plasma Samples", *Molecules*, 20, 19030-19040 (2015).
- Bashir, M.N., "Epidemiology of Prostate Cancer", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (13): 5137-5141 (2015).
- Bensalah, K., Lotan, Y., Karam, J.A. ve Shariat, S.F., "New circulating biomarkers for prostate cancer", *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 11, 112–120 (2008).
- Berman, D.M., Rodriguez, R. ve Veltri, R.W., "Development, Molecular Biology, and Physiology of the Prostate", CAMPBELL-WALSH Urology, Tenth Edition, Wein, A.J., *Elsevier Saunders*, Philadelphia, 2533-2569 (2012).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Borgono, C.A., Michael, L.P. ve Diamandis, E.P., "Human Tissue Kallikreins: Physiologic Roles and Applications in Cancer", *Molecular Cancer Research*, 2: 257-280 (2004).
- Böhm, L., Serafin, A., Akudugu, J., vd., "uPA/PAI-1 ratios distinguish benign prostatic hyperplasia and prostate cancer", *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(7): 1221-1228 (2013).
- Brase, J.C., Johannes, M., Schlomm, T., vd., "Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer", *International Journal of Cancer*, 128(3):608-616 (2011).
- Brawley, O.W., Ankerst, D.P. ve Thompson, I.M., "Screening for prostate cancer", *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 59(4): 264-273 (2009).
- Briganti, A., Capitanio, U., Suardi, N. vd., "Benign Prostatic Hyperplasia and Its Aetiologies", *European Urology Supplements*, 8: 865–871 (2009).
- Bryant, R.J., Pawlowski, T., Catto, J.W., vd., "Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer", *British Journal of Cancer*, 106(4): 768–774 (2012).
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., vd., "Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99(24): 15524-15529 (2002).
- Carlsson, J., Davidsson, S., Helenius, G., vd., "A miRNA expression signature that separates between normal and malignant prostate tissues", *Cancer Cell International*, 11: 14 (2011).
- Carter, H.B., "Differentiation of lethal and non lethal prostate cancer: PSA and PSA isoforms and kinetics", *Asian Journal of Andrology*, 14: 355–360 (2012).
- Carver, B.S., Bozeman, C.B., Williams B.J. ve Venable D.D., "The prevalence of men with National Institutes of Health category IV prostatitis and association with serum prostate specific antigen", *Journal of Urology*, 169(2): 589-591 (2003).
- Catalona, W.J., Partin, A.W., Sanda, M.G., vd., "A Multi-Center Study of [–2]Pro-Prostate-Specific Antigen (PSA) in Combination with PSA and Free PSA for Prostate Cancer Detection in the 2.0 to 10.0 ng/mL PSA Range", *Journal of Urology*, 185(5): 1650–1655 (2011).
- Catalona, W.J., Partin, A.W., Slawin, K.M., vd., "Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial", *The Journal of the American Medical Association*, 279(19): 1542-1547 (1998).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Catalona, W.J., Smith, D.S., Ratliff, T.L., vd., "Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer", *The New England Journal of Medicine*, 324(17):1156-1161(1991).
- Chen, Y., Chen, S., Zhang, J., vd., "Expression profile of microRNAs in expressed prostatic secretion of healthy men and patients with IIIA chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome", *Oncotarget*, 9(15): 12186-12200 (2018).
- Chen, Z.H., Zhang, G.L., Li, H.R., vd., "A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer", *Prostate*, 72(13): 1443-1452 (2012).
- Cheng, H.H., Mitchell, P.S., Kroh, E.M., vd., "Circulating microRNA Profiling Identifies a Subset of Metastatic Prostate Cancer Patients with Evidence of Cancer-Associated Hypoxia", *PLoS One*, 8 (7): e69239 (2013).
- Cimmino, A., Calin G.A., Fabbri, M., vd., "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102(39): 13944-13949 (2005).
- Cochetti, G., Poli, G., Guelfi, G., vd., "Different levels of serum microRNA s in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: evaluation of potential diagnostic and prognostic role", *OncoTargets and Therapy*, 9: 7545–7553 (2016).
- Coker, T.J. ve Dierfeldt, D.M., "Acute Bacterial Prostatitis: Diagnosis and Management", *American Family Physician Journal*, 93(2): 114-120 (2016).
- Cortez, M.A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., vd., "MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers", *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(8): 467–477 (2011).
- Costello, L.C. ve Franklin, R.B., "The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots", *Molecular Cancer*, 5: 17 (2006).
- Croswell, J.M., Kramer, B.S. ve Crawford, E.D., "Screening for Prostate Cancer With PSA Testing: Current Status and Future Directions", *Oncology*, 25(6): 1-14 (2006).
- Daniels, N.A., Ewing, S.K., Zmuda, J.M., vd., "Correlates and prevalence of prostatitis in a large community-based cohort of older men", *Urology*, 66(5): 964-970 (2005).
- Daugaard, I., Veno, M.T., Yan, Y., vd., "Small RNA sequencing reveals metastasis-related microRNAs in lung adenocarcinoma", *Oncotarget*, 8(16): 27047-27061 (2017).
- Dennis, L.K., Lynch, C.F. ve Torner, J.C., "Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer", *Urology*, 60(1): 78-83 (2002).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Detassis, S., Grasso, M., Vescovo, V.D. ve Denti, M.A., "microRNAs Make the Call in Cancer Personalized Medicine", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5: 86 (2017).
- Di Pietro, C., Caruso, S., Battaglia, R., vd., "MiR-27a-3p and miR-124-3p, upregulated in endometrium and serum from women affected by Chronic Endometritis, are new potential molecular markers of endometrial receptivity", *American Journal of Reproductive Immunology*, e12858 (2018).
- Doat, S., C  n  e, S., Tr  tarre, B., vd., "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and prostate cancer risk: results from the EPICAP study", *Cancer Medicine*, 6(10): 2461–2470 (2017).
- Endzelins, E., Melne, V., Berger, A., vd., "Detection of circulating miRNAs: comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients", *BMC Cancer*, 17: 30 (2017).
- Endzelins, E., Melne, V., Kalnina, Z., vd., "Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: a systematic review", *Molecular Cancer*, 15: 41 (2016).
- Epis, M.R., Giles, K.M., Beveridge, D.J., vd., "miR-331-3p and Aurora Kinase inhibitor II co-treatment suppresses prostate cancer tumorigenesis and progression", *Oncotarget*, 8(33): 55116-55134 (2017).
- Erdemir, F., "Kronik Prostatit/Kronik Pelvik A  rı Sendromunda Etiyoloji ve Tanı", *Endo  roloji B  lteni*, 9: 1-9 (2016).
- Erdemir, F., Parlakta  , B.S. ve Uluocak, N., "Prostatitlerin Patofizyolojisi, Tanısı ve Tedavisindeki Yenilikler", *  roloji B  lteni*, 18:147-155 (2007).
- Ergun, O. ve Ko  ar, A., "Prostat kanseri ve kronik prostatit ili  kisi", *S.D.  . Tıp Fak  ltesi Dergisi*, 17(3): 28-31 (2010).
- Esfahani, M., Ataei, N. ve Panjehpour, M., "Biomarkers for Evaluation of Prostate Cancer Prognosis", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (7): 2601-2611 (2015).
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., vd., "MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Published online, E2110-E2116 (2012).
- Filella, X. ve Foj, L., "miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer", *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(5): 715–736 (2017).
- Flint, M., McAlister, D.A., Agarwal, A. ve du Plessis, S.S., "Male Accessory Sex Glands: Structure and Function", *Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology*, Singh, S.K., *CRC Press*, 245-257 (2015).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Foo, K.T., "Pathophysiology of clinical benign prostatic hyperplasia", *Asian Journal of Urology*, 4: 152-157 (2017).
- Fujita, K., Ewing, C.M., Chan, D.Y.S., vd., "Endoglin (CD105) as a urinary and serum marker of prostate cancer", *International Journal of Cancer*, 124: 664–669 (2009).
- Garofalo, M., Quintavalle, C., Romano, G., vd., "miR221/222 in Cancer: Their Role in Tumor Progression and Response to Therapy", *Current Molecular Medicine*, 12(1): 27–33 (2012).
- Ghosh, A., Dasgupta, D., Ghosh, A., vd., "MiRNA199a-3p suppresses tumor growth, migration, invasion and angiogenesis in hepatocellular carcinoma by targeting VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, HGF and MMP2", *Cell Death and Disease*, 8: e2706 (2017).
- GLOBOCAN, "Prostate Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012", International Agency For Research On Cancer, <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/prostate-new.asp>, (Ziyaret Edilme Tarihi: 08.03.2018).
- Goffin, V., Hoang, D.T., Bogorad, R.L. ve Nevalainen, M.T., "Prolactin regulation of the prostate gland: a female player in a male game", *Nature Reviews Urology*, 8(11): 597-607 (2011).
- Gonzales, J.C., Fink, L.M., Goodman, O.B., vd., "Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer", *Clinical Genitourinary Cancer*, 9(1): 39-45(2011).
- Goto, Y., Kojima, S., Nishikawa, R., vd., "MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker", *British Journal of Cancer*, 113: 1055–1065 (2015).
- Gui, B., Hsieh, C-L., Kantoff, P.W., vd., "Androgen receptor-mediated downregulation of microRNA-221 and -222 in castrationresistant prostate cancer", *PLoS One*, 12(9): e0184166 (2017).
- Guzel, E., Karatas, O.F., Semercioz, A., vd., "Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer", *International Journal of Cancer*, 136: 875–879 (2015).
- Guzman, H., Sanders, K., Idica, A., vd., "miR-128 inhibits telomerase activity by targeting TERT mRNA", *Oncotarget*, 9(17): 13244-13253 (2018).
- Haj-Ahmad, T.A., Abdalla, M.A.K. ve Haj-Ahmad, Y., "Potential Urinary miRNA Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients", *Journal of Cancer*, 5(3): 182-191 (2014).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Haldrup, C., Kosaka, N., Ochiya, T., vd., "Profiling of circulating microRNAs for prostate cancer biomarker discovery", *Drug Delivery and Translational Research*, 4(1): 19-30 (2014).
- Hamam, R., Hamam, D., Alsaleh, K.A., vd., "Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers", *Cell Death and Disease*, 8: e3045 (2017).
- Harris, W.P., Mostaghel, E.A., Nelson, P.S. ve Montgomery, B., "Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion", *Nature Clinical Practise Urology*, 6(2): 76-85 (2009).
- Hart, M., Nolte, E., Wach, S., vd., "Comparative microRNA Profiling of Prostate Carcinomas with Increasing Tumor Stage by Deep Sequencing", *Molecular Cancer Research*, 12(2): 250–263 (2013).
- Hata, A., ve Kashima, R., "Dysregulation of MicroRNA Biogenesis Machinery in Cancer", *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 51(3): 121–134 (2016).
- Hatakeyama, S., Yoneyama, T., Tobisawa, Y. ve Ohyama, C., "Recent progress and perspectives on prostate cancer biomarkers", *International Journal of Clinical Oncology*, 22: 214–221 (2017).
- He, H-c., Han Z-d., Dai, Q-s., vd., "Global analysis of the differentially expressed miRNAs of prostate cancer in Chinese patients", *BMC Genomics*, 14: 757 (2013).
- He, S., Chu, J., Wu, L-C., vd., "MicroRNAs activate natural killer cells through Toll-like receptor signaling", *Blood*, 121(23): 4663-4671 (2013).
- Heidenreich A., Bastian, P.J., Bellmunt, J., vd., EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent", *European Urology*, 65: 124-137 (2014).
- Heidenreich, A., Bellmunt, J., Bolla, M., vd., Guidelines on Prostate Cancer, *European Urology*, 59(4): 572-583 (2011).
- Hennigar, S.R. ve Kelleher, S.L., "Zinc networks: the cell-specific compartmentalization of zinc for specialized functions", *Biological Chemistry*, 393: 565–578 (2012).
- Ho, E., Beaver, L.M., Williams, D.E. ve Dashwood, R.H., "Dietary Factors and Epigenetic Regulation for Prostate Cancer Prevention", *Advances in Nutrition*, 2: 497–510 (2011).
- Huang, X., Yuan, T., Liang, M., vd., "Exosomal miR-1290 and miR-375 as Prognostic Markers in Castration-resistant Prostate Cancer", *European Urology*, 67(1): 33–41 (2015).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Huang, Y-Q., Sun, T., Zhong, W-D. ve Wu, C-L., "Clinical performance of serum [-2]proPSA derivatives, %p2PSA and PHI, in the detection and management of prostate cancer", *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 2(4): 343-350 (2014).
- Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., vd., "Molecular pathology of prostate cancer", *Journal of Clinical Pathology*, 58:673–684 (2005).
- Jansson, M.D. ve Lund, A.H., "MicroRNA and cancer", *Molecular Oncology*, 6: 590-610 (2012).
- Jevsinek, S.D., Godnic, I., Zorc, M., vd., "Genome-wide in silico screening for microRNA genetic variability in livestock species", *Animal Genetics*, 44(6): 669-677 (2013).
- Kachakova, D., Mitkova, A., Popov, E., vd., "Combinations of Serum Prostate-Specific Antigen and Plasma Expression Levels of let-7c, miR-30c, miR-141, and miR-375 as Potential Better Diagnostic Biomarkers for Prostate Cancer", *DNA and Cell Biology*, 34(3): 189–200 (2015).
- Kaplan, S.A., Reis, R.B., Staimen, V.B., ve Te, A.E., "Is the ratio of transition zone to total prostate volume higher in African-American men than in their Caucasian or Hispanic counterparts?", *British Journal of Urology*, 82(6): 804-807 (1998).
- Karzai, F.H., Madan, R.A. ve Dahut, W.L., "Metabolic syndrome in prostate cancer: impact on risk and outcomes", *Future Oncology*, 12(16): 1947–1955 (2016).
- Kavanagh, J.P., "Isocitric and citric acid in human prostatic and seminal fluid: implications for prostatic metabolism and secretion", *Prostate*, 24(3): 139-142 (1994).
- Kavitha, N., Vijayarathna, S., Jothy, S.L., vd., "MicroRNAs: Biogenesis, Roles for Carcinogenesis and as Potential Biomarkers for Cancer Diagnosis and Prognosis", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (18): 7489-7497 (2014).
- Kelly, B.D., Miller, N., Sweeney K.J., vd., "A Circulating MicroRNA Signature as a Biomarker for Prostate Cancer in a High Risk Group", *Journal of Clinical Medicine*, 4: 1369-1379 (2015).
- Kgatlhe, M.M., Kalla, A.A., Islam, M.M., vd., "Prostate Cancer: Epigenetic Alterations, Risk Factors, and Therapy", *Hindawi Publishing Corporation Prostate Cancer*, 2016: 5653862 (2016).
- Khorrami, S., Zavarani, H.A., Mowla, S.J., vd., "MicroRNA-146a induces immune suppression and drug-resistant colorectal cancer cells", *Tumor Biology*, 39(5): 1010428317698365 (2017).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Kicinski, M., Vangronsveld, J. ve Nawrot, T.S., "An Epidemiological Reappraisal of the Familial Aggregation of Prostate Cancer: A Meta-Analysis", *PLoS One*, 6(10): e27130 (2011).
- Kiechle, F.L., Betsou, F., Blakeney, J., vd., "Procedures for The Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline, Fourth Edition", *CLSI Document*, 30(10): H18-A4 (2010).
- Kim, J. ve Coetzee, G.A., "Prostate Specific Antigen Gene Regulation by Androgen Receptor", *Journal of Cellular Biochemistry*, 93: 233–241 (2004).
- Kim, Y.K., Kim, B. ve Kim, V.N., "Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Published Online, E1881–E1889 (2016).
- Klinge, C.M., "Non-coding RNAs: long non-coding RNAs and microRNAs in endocrine-related cancers", *Endocrine-Related Cancer*, 25: R259–R282 (2018).
- Kotb, S., Mosharafa, A., Essawi, M., vd., "Circulating miRNAs 21 and 221 as biomarkers for early diagnosis of prostate cancer", *Tumour Biology*, 35(12): 12613-12617 (2014).
- Krieger, J.N., Lee, S.W.H., Jeon, J., vd., "Epidemiology of prostatitis", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31S: S85–S90 (2008).
- Kruslin, B., Ulamec, M. ve Tomas D., "Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression", *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(2): 1–8 (2015).
- Lau, P-W., Guiley, K.Z., De, N., vd., "The Molecular Architecture of Human Dicer", *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(4): 436–440 (2012).
- Laukkanen, J.A., Laaksonen, D.E., Niskanen, L., vd., "Metabolic Syndrome and the Risk of Prostate Cancer in Finnish Men: A Population-Based Study", *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 13(10): 1646-1650 (2004).
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop H.M., vd., "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma", *British Journal of Haematology*, 141: 672–675 (2008).
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. ve Ambros, V., "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14", *Cell*, 75: 843–854 (1993).
- Lefevre, P.L.C., Palin, M-F. ve Murphy, B.D., "Polyamines on the Reproductive Landscape", *Endocrine Reviews*, 32(5): 694-712 (2011).
- Leslie, S.W. ve Siref, L.E., "Cancer, Prostate", StatPearls Publishing, Erişim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/>, (2018).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Lewis, H., Lance, R., Troyer, D., vd., "miR-888 is an expressed prostatic secretionsderived microRNA that promotes prostate cell growth and migration", *Cell Cycle*, 13(2): 227–239,(2014).
- Lİ, L. ve Luo, Z., "Dysregulated miR-27a-3p promotes nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and migration by targeting Mapk10", *Oncology Reports*, 37: 2679-2687 (2017).
- Li, M., Rai, A.J., DeCastro, G.J., vd., "An optimized procedure for exosome isolation and analysis using serum samples: Application to cancer biomarker discovery", *Methods*, 87: 26-30 (2015).
- Li, T., Li, D., Sha, J., vd., "MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383: 280–285 (2009).
- Lim, K.B., "Epidemiology of clinical benign prostatic hyperplasia", *Asian Journal of Urology*, 4: 148-151 (2017).
- Lin, S. ve Gregory R.I., "MicroRNA biogenesis pathways in cancer", *Nature Reviews Cancer*, 15(6): 321–333 (2015).
- Ling, X.H., Han, Z.D., Xia, D., vd., "MicroRNA-30c serves as an independent biochemical recurrence predictor and potential tumor suppressor for prostate cancer", *Molecular Biology Reports*, 41(5):2779-2788 (2014).
- Liu L-Z., Lİ, C., Chen Q., vd., "MiR-21 Induced Angiogenesis through AKT and ERK Activation and HIF-1a Expression", *PLoS One*, 6(4): e19139 (2011).
- Lusi, E.A., Passamano, M., Guarascio, P., vd., "Innovative electrochemical approach for an early detection of microRNAs", *Analytical Chemistry*, 81(7):2819-2822 (2009).
- Ma, J., Li, N., Guarnera, M. ve Jiang, F., "Quantification of Plasma miRNAs by Digital PCR for Cancer Diagnosis", *Biomarker Insights*, 8: 127–136 (2013).
- Mahn, R., Heukamp, L.C., Rogenhofer, S., vd., "Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer", *Urology*, 77(5): 1265.e9-16 (2011).
- Malik B. ve Feng F.Y., "Long noncoding RNAs in prostate cancer: overview and clinical implications", *Asian Journal of Andrology*, 18: 568–574 (2016).
- Marco, A., MacPherson, J.I., Ronshaugen, M. ve Griffiths-Jones, S., "MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties", *Silence*, 3(1): 8 (2012).
- McGrath, S., Christidis, D., Perera, M., vd., "Prostate cancer biomarkers: Are we hitting the mark?", *Prostate International*, 4: 130-135 (2016).
- McNeal, J.E., "The zonal anatomy of the prostate", *Prostate*, 2(1): 35-49 (1981).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Mihelich, B.L., Maranville, J.C., Nolley, R., vd., "Elevated Serum MicroRNA Levels Associate with Absence of High-Grade Prostate Cancer in a Retrospective Cohort", *PLoS One*, 10(4): e0124245 (2015).
- Minutoli, L., Rinaldi, M., Marini, H., vd., "Apoptotic Pathways Linked to Endocrine System as Potential Therapeutic Targets for Benign Prostatic Hyperplasia", *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (8): e1311 (2016).
- miRBase, miRNA online veri tabanı, The University of Manchester, Erişim: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>, (Ziyaret Edilme Tarihi: 02.04.2018).
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., vd., "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105: 10513–10518 (2008).
- Moltzahn, F., Olshen, A.B., Baehner, L., vd., "Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients", *Cancer Research*, 71(2): 550-560 (2011).
- Nakai Y. ve Nonomura N., "Inflammation and prostate carcinogenesis", *International Journal of Urology*, 20: 150–160 (2013).
- Ngai, H-Y., Yuen, K-K.S., Ng, C-M., vd., "Metabolic syndrome and benign prostatic hyperplasia: An update", *Asian Journal of Urology*, 4: 164-173 (2017).
- Nguyen, H.C., Xie, W., Yang, M., vd., "Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer", *Prostate*, 73(4): 346-354 (2013).
- Nicholson, H.D. ve Whittington K., "Oxytocin and the human prostate in health and disease", *International Review of Cytology*, 263:253-286 (2007).
- Nicholson, T.M. ve Ricke, W.A., "Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future", *Differentiation*, 82(4-5): 184–199 (2011).
- Ntais, C., Polycarpou, A. ve Tsatsoulis, A., "Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes", *European Journal of Endocrinology*, 149: 469–477 (2003).
- Olena, A.F. ve Patton, J.G., "Genomic Organization of microRNAs", *Journal of Cellular Physiology*, 222: 540–545 (2010).
- Olive, V., Li, Q. ve He, L., "mir-17-92, a polycistronic oncomir with pleiotropic functions", *Immunological Reviews*, 253(1): 158–166 (2013).
- Oliveto, S., Mancino, M., Manfrini, N. ve Biffo, S., "Role of microRNAs in translation regulation and cancer", *World Journal of Biological Chemistry*, 8(1): 45-56 (2017).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Ozen, M., Creighton, C.J., Ozdemir, M. ve Ittmann, M., "Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer", *Oncogene*, 27: 1788–1793 (2008).
- Önem, K., Erol, B. ve Akduman, B., "2012'de PSA Bazlı Tarama: Tartışma Sürüyor (PLCO ve Avrupa Mortalite Çalışmaları, Meslek Örgütü Önerileri). *Turkish Urology Seminars*, 3: 70-74 (2012).
- Pang, Y., Young, C.Y.F. ve Yuan, H., "MicroRNAs and prostate cancer", *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42: 363–369 (2010).
- Papsidero, L.D., Wang, M.C., Valenzuela, L.A., vd., "A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients", *Cancer Research*, 40(7): 2428-2432 (1980).
- Parekh, D.J., Punnen, S., Sjoberg, D.D., vd., "A multi-institutional prospective trial in the USA confirms that the 4Kscore accurately identifies men with high-grade prostate cancer", *European Urology*, 68(3): 464-470 (2015).
- Parsons, J.K., Carter, H.B., Carter, A.W., vd., "Metabolic Factors Associated with Benign Prostatic Hyperplasia", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(7): 2562–2568 (2006).
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F. vd., "Conservation across animal phylogeny of the sequence and temporal regulation of the 21 nucleotide let-7 heterochronic regulatory RNA", *Nature*, 408: 86–89 (2000).
- Peng, Y. Ve Croce, C.M., "The role of MicroRNAs in human cancer", *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 1: 15004 (2016).
- Perdana, N.R., Mochtar, C.A., Umbas, R. ve Hamid, A.R.A.H., "The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review", *Acta Medica Indonesiana - The Indonesian Journal of Internal Medicine*, 48(3): 228-238 (2016).
- Pinsky, P.F., Prorok, P.C., Yu, K., vd., "Extended Mortality Results for Prostate Cancer Screening in the PLCO Trial With Median Follow-Up of 15 Years", *Cancer*, 123(4): 592-599 (2017).
- Platz, E.A., Kawachi, I., Rimm, E.B., vd., "Race, ethnicity and benign prostatic hyperplasia in the health professionals follow-up study", *The Journal of Urology*, 163(2):490-495 (2000).
- Pontari, M.A. ve Ruggieri, M.R., "Mechanisms in prostatitis/chronic pelvic pain syndrome", *Journal of Urology*, 179(5 Suppl): 61-67
- Porkka, K.P., Pfeiffer, M.J., Waltering, K.K., vd., "MicroRNA expression profiling in prostate cancer", *Cancer Research*, 67(13): 6130-6135 (2007).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Powell, I.J. ve Bollig-Fischer, A., "Minireview: the molecular and genomic basis for prostate cancer health disparities", *Molecular Endocrinology*, 27(6):879-891 (2013).
- Prensner, J.R., Rubin, M.A., Wei, J.T. ve Chinnaiyan, A.M., "Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers", *Science Translational Medicine*, 4(127): 127rv3 (2012).
- Raisch, J., Darfeuille-Michaud, A. ve Nguyen, H.T.T., "Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer", *World Journal of Gastroenterology*, 19(20): 2985-2996 (2013).
- Saini, S., "PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers", *Cellular Oncology*, 39(2): 97-106 (2016).
- Saker, Z., Tsintsadze, O., Jiqia, I., vd., "Importance Of Apoptosis Markers (Mdm2, Bcl-2 And Bax) in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer", *Georgian Medical News*, 249: 7-14 (2015).
- Sanda, M.G., Beaty, T.H., Stutzman, R.E., vd., "Genetic susceptibility of benign prostatic hyperplasia", *The Journal of Urology*, 152(1):115-119 (1994).
- Sanders, I., Holdenrieder, S., Walgenbach-Brünagel, G., vd., "Evaluation of reference genes for the analysis of serum miRNA in patients with prostate cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma", *International Journal of Urology*, 19: 1017-1025 (2012).
- Santos, J.I., Teixeira, A.L., Dias, F., vd., "Influence of peripheral whole-blood microRNA-7 and microRNA-221 high expression levels on the acquisition of castration-resistant prostate cancer: evidences from in vitro and in vivo studies", *Tumor Biology*, 35(7):7105-7113 (2014).
- Sapre, N., Hong, M.K., Macintyre, G., vd., "Curated microRNAs in urine and blood fail to validate as predictive biomarkers for high-risk prostate cancer", *PLoS One*, 9(4): e91729 (2014).
- Schaefer, A., Jung, M., Mollenkopf, H.J., vd., "Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma", *International Journal of Cancer*, 126(5): 1166-1176 (2010).
- Schroder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., vd., "Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up", *Lancet*, 384: 2027-2035 (2014).
- Selth, L.A., Townley, S., Gillis, J.L., vd., "Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease", *International Journal of Cancer*, 131(3): 652-661 (2012).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Shariat, S.F., Semjonow, A., Lilja, H., vd., "Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers", *Acta Oncologica*, 50(Suppl 1): 61-75 (2011).
- Sharma, M., Gupta, S., Dhole, B. ve Kumar, A., "The Prostate Gland", Basics of Human Andrology, Kumar, A. ve Sharma M., *Springer Nature Singapore Pte Ltd.*, 17-35 (2017).
- Sharova, E., Grassi, A., Marcer, A., vd., "A circulating miRNA assay as a first-line test for prostate cancer screening", *British Journal of Cancer*, 114(12): 1362-1366 (2016).
- Shen, J., Hruby, G.W., McKiernan, J.M., vd., "Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer", *Prostate*, 72(13): 1469-1477 (2012).
- Shen, M.M. ve Abate-Shen, C., "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges", *Genes & Development*, 24(18): 1967-2000 (2010).
- Singh, P.K., Preus, L., Hu, Q., vd., "Serum microRNA expression patterns that predict early treatment failure in prostate cancer patients", *Oncotarget*, 5(3): 824-840 (2014).
- Smith, C.P., "Male chronic pelvic pain: An update", *Indian Journal of Urology*, 32(1): 34-39 (2016).
- Souza, M.F., Kuasne, H., Barros-Filho, M.C., vd., "Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer", *PLoS One*, 12(9): e0184094 (2017).
- Srivastava, A., Goldberger, H., Dimtchev, A., vd., "MicroRNA profiling in prostate cancer--the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214", *PLoS One*, 8(10): e76994 (2013).
- Srivastava, A., Goldberger, H., Dimtchev, A., vd., "Circulatory miR-628-5p is downregulated in prostate cancer patients", *Tumor Biology*, 35(5): 4867-4873 (2014).
- Stark, T., Livas, L. ve Kyprianou, N., "Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting", *Translational Andrology and Urology*, 4(4): 455-463 (2015).
- Sun, T., Yang, M., Chen, S., vd., "The altered expression of MiR-221/-222 and MiR-23b/-27b is associated with the development of human castration resistant prostate cancer", *Prostate*, 72(10):1093-1103 (2012).
- Sun, X., Yang, Z., Zhang, Y., vd., "Prognostic implications of tissue and serum levels of microRNA-128 in human prostate cancer", *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(7): 8394-8401 (2015).
- Tarcan, T. ve Yazıcı, C., "BPH Tanı ve Tedavisinde EAU ve AUA Kılavuzlarının Karşılaştırılması", *Türk Üroloji Dergisi*, 32(1): 110-117 (2006).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Tek, M. ve Çayan, S., "Benign Prostat Hiperplazisine Bağlı Alt Üriner Sistem Semptomlarının Tedavisinde Fosfodiesteraz Tip-5 İnhibitörlerinin Yeri", *Turkish Urology Seminars*, 1: 14-17 (2010).
- Theophilou, G., Lima, K.M., Briggs, M., vd., "A biospectroscopic analysis of human prostate tissue obtained from different time periods points to a trans-generational alteration in spectral phenotype", *Scientific Reports*, 5:13465 (2015).
- Thompson, I.M., Pauler, D.K., Goodman, P.J., vd., "Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level $<$ or $=4.0$ ng per milliliter", *The New England Journal of Medicine*, 350(22): 2239-2246 (2004).
- Thompson, I.M., Ankerst, D.P., Chi, C., vd., "Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower", *The Journal of the American Medical Association*, 294(1): 66-70 (2005).
- Toivanen, R. ve Shen, M.M., "Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification", *Development*, 144(8): 1382-1398 (2017).
- Tran, C.P., Lin, C., Yamashiro, J. ve Reiter, R.E., "Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cells", *Molecular Cancer Research*, 1(2): 113-121 (2002).
- Vanacore, D., Boccellino, M., Rossetti, S., vd., "MicroRNAs in prostate cancer: an overview", *Oncotarget*, 8(30): 50240-50251 (2017).
- Vasanwala, F.F., Wong, M.Y.C., Ho, H.S.S. ve Foo K.T., "Benign prostatic hyperplasia and male lower urinary symptoms: A guide for family physicians", *Asian Journal of Urology*, 4(3): 181-184 (2017).
- Veeramani, S., Yuan, T-C., Chen, S-J., vd., "Cellular prostatic acid phosphatase: a protein tyrosine phosphatase involved in androgen-independent proliferation of prostate cancer", *Endocrine Related Cancer*, 12(4): 805-822 (2005).
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., vd., "A micro-RNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103: 2257–2261 (2006).
- Wagenlehner, F.M.E., Naber, K.G., Bschleipfer, T., vd., "Prostatitis and Male Pelvic Pain Syndrome", *Deutsches Arzteblatt International*, 106(11): 175–183 (2009).
- Wallis, C.J.D. and Nam R.K., "Prostate Cancer Genetics: A Review", *Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 26(2): 79–91 (2015).
- Wang, H., Horbinski, C., Wu, H., vd., "NanoStringDiff: a novel statistical method for differential expression analysis based on NanoString nCounter data", *Nucleic Acids Research*, 44(20): e151 (2016).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Wang, J., Ye, H., Zhang, D., vd., "MicroRNA-410-5p as a potential serum biomarker for the diagnosis of prostate cancer", *Cancer Cell International*, 16:12 (2016).
- Wang, S.Y., Shiboski, S., Belair, C.D., vd., "miR-19, miR-345, miR-519c-5p serum levels predict adverse pathology in prostate cancer patients eligible for active surveillance", *PLoS One*, 9(6): e98597 (2014).
- Wang, Z., Wang, Y., Zhang, J., vd., "Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer", *Molecular Medicine Reports*, 16(4): 5450-5458 (2017).
- Wang, Y., Luo, J., Zhang, H. ve Lu, J., "microRNAs in the Same Clusters Evolve to Coordinately Regulate Functionally Related Genes", *Molecular Biology and Evolution*, 33(9): 2232-2247 (2016).
- Wang, Z., "miRNA in the regulation of ion channel/transporter expression", *Comprehensive Physiology*, 3(2): 599-653 (2013).
- Watahiki, A., Macfarlane, R.J., Gleave, M.E. vd., "Plasma miRNAs as Biomarkers to Identify Patients with Castration-Resistant Metastatic Prostate Cancer", *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4): 7757-7770 (2013).
- Westermann, A.M., Schmidt, D., Holdenrieder, S., vd., "Serum microRNAs as biomarkers in patients undergoing prostate biopsy: results from a prospective multi-center study", *Anticancer Research*, 34(2):665-669 (2014).
- Wilt, T.C. ve N'Dow, J., "Benign prostatic hyperplasia. Part 1—Diagnosis", *British Medical Journal*, 336(7636): 146–149 (2008).
- Wu, C., Zhang, Z., Lu, Z., vd., "Prevalence of and Risk Factors for Asymptomatic Inflammatory (NIH-IV) Prostatitis in Chinese Men", *PLoS One*, 8(8): e71298 (2013).
- Wu, C.T., Chang, Y.H., Lin, W.Y., vd., "TGF Beta1 Expression Correlates with Survival and Tumor Aggressiveness of Prostate Cancer", *Annals of Surgical Oncology*, 22(Suppl 3): 1587-1593 (2015).
- Xiao, J., Gong, A.Y., Eischeid, A.N., vd., "miR-141 modulates androgen receptor transcriptional activity in human prostate cancer cells through targeting the small heterodimer partner protein", *Prostate*, 72(14): 1514-1522 (2012).
- Xin, L., Gao, J., Wang, D., vd., "Novel blood-based microRNA biomarker panel for early diagnosis of chronic pancreatitis", *Scientific Reports*, 7: 40019 (2017).
- Yamakuchi, M., Ferlito, M. ve Lowenstein, C.J., "miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105(36): 13421-13426 (2008).
- Yang, X., Yang, Y., Gan, R., vd., "Down-regulation of mir-221 and mir-222 restrain prostate cancer cell proliferation and migration that is partly mediated by activation of SIRT1", *PLoS One*, 9(6): e98833 (2014).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Zhang, H.L., Yang, L.F., Zhu, Y., vd., "Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy", *Prostate*, 71(3): 326-331 (2011).
- Zhou, B., Xu, H., Xia, M., vd., "Overexpressed miR-9 promotes tumor metastasis via targeting E-cadherin in serous ovarian cancer", *Frontiers in Medicine*, 11(2):214-222 (2017).



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Yakup DÜLGEROĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi : Ilgaz - 18.11.1981



Eğitim Durumu

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi - Veteriner Hekimliği

Tıpta Uzmanlık : Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğt. ve Arşt. Hastanesi - Tıbbi Biyokimya

Doktora : Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi - Moleküler Biyoloji ve Genetik

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi

Uzman Doktor (Tıbbi Biyokimya) : Bilecik Halk Sağlığı Laboratuvarı (2013-2016)

Laboratuvar Sorumlusu : Bilecik Halk Sağlığı Laboratuvarı (2014-2016)

Uzman Doktor (Tıbbi Biyokimya) : Akşehir Devlet Hastanesi (2016-2017)

Uzman Doktor (Tıbbi Biyokimya) : Kulu Devlet Hastanesi (2017- ...)

İletişim

Adres: Hürriyet Mh. Park 2 Sk. No: 2/8 Merkez / BİLECİK

E-Posta: dulgerogluyakup@gmail.com

Akademik Çalışmaları

Yakup Dülgeroğlu. Evaluation of Measurement Uncertainty of HbA2 and HbA1c Which Are Measured by Ion Exchange Chromatography. Turk Hij Den Biyol Derg. 2017; 74(4): 299-306

Yakup Dülgeroğlu. Verification Of Some Biochemistry Tests That To Be Analyzed In Spotchem EZ SP-4430 Dry Chemistry System. Turk Hij Den Biyol Derg. 2018; 75(2): 127-134

Yakup Dülgeroğlu, Onur Eroğlu. Diagnostic performance of microRNAs in the circulation in differential diagnosis of BPH, chronic prostatitis and prostate cancer. Turkish Journal of Biochemistry, 20180198, ISSN (Online) 1303-829X, DOI: <https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0198>.

15.01.2019