

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

**PROSTAT KANSERLİ HASTALARDA RADYOTERAPİ
UYGULAMALARINDA MİRNA-34A VE MİRNA-521
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selim ÖĞÜT

Enstitü Anabilim Dalı: Biyofizik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Birsen AYDEMİR

MAYIS - 2017

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT KANSERLİ HASTALARDA RADYOTERAPİ
UYGULAMALARINDA MİRNA-34A VE MİRNA-521
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selim ÖĞÜT

Enstitü Anabilim Dalı: Biyofizik

“Bu tez 23/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”

JÜRİ ÜYESİ	KANAATİ	İMZA
Prof. Dr. Yunus KARAKOÇ	BAŞARILI	
Doç. Dr. Birsen AYDEMİR	BAŞARILI	
Prof. Dr. Haldun Şükrü ERKAL	BAŞARILI	

BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 16214662/050.01.04/113 sayılı ve 01/10/2014 tarihinde onay olarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih:

..../..../2017

Selim ÖĞÜT

İmza

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi, fikir ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin her aşamasında emeğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Birsen AYDEMİR'e, tez çalışmalarımın yapılması ve yazılması aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Fatma Behice CİNEMRE'ye, hastarımızın temin edilmesi ve tezimin hazırlanması aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Didem KARAÇETİN'e, tezimin hazırlanma aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Haldun Şükrü ERKAL'a, Radyasyon Onkolojisi kliniğinde örneklerin temin edilmesinde yardımcı olan tüm sağlık personeline, deneysel çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Sevgin DEĞİRMENCİOĞLU'na, ayrıca hayatımın her döneminde beni sevgi ve hoşgörü ile yüreklendiren, maddi, manevi desteklerini eksik etmeyen ailemin tüm fertlerine minnetle, tez projemin gerçekleşmesini destekleyen Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne tarafından desteklenmiştir. Proje No:2014-8001-003

İÇİNDEKİLER

BEYAN	I
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER.....	III
KISALTMA VE SİMGELER	VI
ŞEKİLLER	IX
TABLolar	X
EKLER.....	XI
ÖZET.....	XII
SUMMARY.....	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. PROSTAT.....	2
2.2. PROSTAT KANSERİ.....	2
2.2.1. Prostat Kanseri Gelişiminde Androjen Metabolizmasının Rolü	2
2.2.2. Epidemiyoloji	3
2.2.3. Prostat Kanserinde Tanı Yöntemleri.....	3
2.2.4. Evreleme.....	4
2.2.5. Prognostik Faktörler.....	7
2.2.6. Prostat Spesifik Antijen (PSA).....	7
2.2.7. Serum PSA Düzeyini Etkileyen Faktörler.....	7
2.2.8. PSA Velositesi.....	8
2.2.9. PSA Dansitesi.....	8
2.2.10. Serbest PSA.....	8
2.2.11. ProPSA.....	8

2.2.12. Kompleks PSA Eşik Değeri.....	8
2.2.13. Prostat Kanseri Patoloji.....	9
2.2.14. Tümör Baskılayıcı Genler.....	9
2.2.15. Onkogenler	9
2.2.16. Epigenetik.....	9
2.3. PROSTAT KANSER TEDAVİSİ.....	9
2.4. miRNA’LAR	11
2.4.1. miRNA’ların Biyogenezi.....	12
2.4.2. miRNA ve Kanser	12
2.4.3. Onkogen ve Tümör Süpresör Gen Olarak miRNA.....	13
2.4.3.1. Onkogen Olarak miRNA.....	13
2.4.3.2. Tümör Süpresör Gen Olarak miRNA.....	13
2.4.4. miRNA Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisi.....	14
2.4.5. Radyosensitivite ve Radyosensitiste miRNA'ların Rolü.....	16
2.4.6. Radyoterapinin miRNA'ların Üzerindeki Etkisi.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. KİMYASAL MADDELER VE MALZEMELER	20
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR	21
3.3. RADYOTERAPİ TEDAVİSİ	21
3.4. TAM KANDAN TOTAL RNA ELDESİ.....	24
3.4.1. Total RNA İzolasyon Yöntemi	24
3.5. miRNA RT-PCR REAKSİYONU.....	26
3.5.1. miRNA Ekspresyon Düzeyleri Analizi.....	26
3.5.2. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction qRT-PCR.....	28

3.6. İSTATİKSEL ANALİZ.....	31
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	40
6. ÖZET.....	44
KAYNAKLAR.....	43
EKLER.....	50
EK 1. ETİK KURUL ONAYI.....	48



KISALTMA VE SİMGELER

ACT: Etkinleştirilmiş Pıhtılaşma Zamanı

ADT: Adjuvan Hormonoterapi

ALT: Alanin Aminotransferaz

ALP: Alkalen Fosfataz

AJCC: Amerikan Kanser Komitesi

AR: Androjen Reseptörü

AST: Aspartat Aminotransferaz

AUA: Amerikan Üroloji Derneği

BCL: Antiapoptotik Protein Ailesi

BT: Bilgisayarlı Tomografi

BPH: Bening Prostat Hipertrofisi

CTV: Klinik Hedef Hacmi

CRPC: Kastrasyona Dirençli Prostat Kanseri

DHEA: Dihidroepiandrosterone

DHEAS: Dihidroepiandrosterone Sülfat

DHT: Dihidrotestesteron

DNA: Deoksiribonükleik asit

EAU: Avrupa Üroloji Derneği

ESMO: Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği

GEN: Gen İfade Profili

GTV: Görünen Tümör Hacmi

HT: Hormonal Tedavi

LDH: Laktat Dehidrogenaz

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi

KT: Kemoterapi

ME: Merkaptoetanol

MCH: Eritrositlerdeki Hemoglobin Miktarı

MCHC: Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonunun Yüzdesi

MCV: Eritrositlerin Ortalama Çapı

MLC: Çok Yapraklı Kolimatör

MR: Manyetik Rezonans Görüntüleme

mRNA: Mesajcı RNA

miRNA: MikroRNA

MV: Megavoltaj

NCCN: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı

IUAC: Uluslararası Kanser Komisyonu

PAP: Prostat Spesifik Asit Fosfataz

PCa: Prostat Kanseri

PCT: Kanda Trombosit Yüzdesi

PDW: Trombositlerin Dağılım Genişliği

PİN: Prostat İntraepitelyal Neoplazi

PSA: Prostat Spesifik Antijen

PSAD: Prostat Spesifik Antijen Dansitesi

PTV: Planlanan Hedef Hacmi

PZ: Periferik Zon

RDW: Eritrositlerin Dağılım Genişliği

RP: Radikal Prostektomi

RT: Radyoterapi

TNM: Tümör Lenf Nodu Metastaz

TRUB: Transrektal Ultrasonografi Biyopsisi

TRUS: Transrektal Ultrasonografi

TURP: Prostatın Transüretral Rezeksiyonu

TZ: Transizyonel Zon

WBC: Lökosit

WHO: Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİLLER

Şekil 1. AJCC 2010 TNM Evreleme.....	5
Şekil 2. miRNA'nın hücre döngüsü kontrol noktaları üzerindeki etkileri	15
Şekil 3. miR-34a, p53'e bağımlı hücre apoptozu.....	16
Şekil 4. miRNA'ların tümör radyosensitivisi ile ilişkisi.....	19
Şekil 5. Eksternal Radyoterapi (Varian Unique Linac) Cihazı.....	23
Şekil 6. mir-34 a için standart eğri grafiği ve örnek değerleri.....	29
Şekil 7. mir-521 için standart eğri grafiği ve örnek değerleri.....	29
Şekil 8. mir-34 a Amplifikasyon grafiği.....	30
Şekil 9. mir-521 Amplifikasyon grafiği.....	30
Şekil 10. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-34a ekspresyon değerleri (ortalama±standart hata).....	32
Şekil 11. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-521 ekspresyon değerleri (ortalama±standart hata).....	33
Şekil 12. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların PSA değerleri (ortalama±standart hata).....	35
Şekil 13. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların serbest PSA değerleri (ortalama±standart hata).....	35

TABLÖLAR

Tablo 1. 2010 AJCC evreleme sistemi ile prostat kanserinin klinik evrelendirilmesi.....	5
Tablo 2. RNA İzolasyonu Yönteminin Akışı	25
Tablo 3. miRNA RT-PCR Reaksiyonu.....	26
Tablo 4. miRNA RT primer hazırlanması.....	27
Tablo 5. cDNA Sentezi Reaksiyon Bileşenleri.....	27
Tablo 6. Real Time PCR Reaksiyonu Bileşenler.....	28
Tablo 7. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların biyokimyasal parametre değerleri (ortalama±standart sapma).....	34
Tablo 8. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların tam kan sayımı değerleri (ortalama±standart sapma).....	36
Tablo 9. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-34a ve miR-521 ekspresyon değerleri ile biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon değerleri.....	38
Tablo 10. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-34a ve miR-521 ekspresyon değerleri ile tam kan sayımı parametreleri arasındaki korelasyon değerleri.....	39

EKLER

Ek 1. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan Etik Kurulu Onayı.....	48
---	----



ÖZET

Prostat kanseri tedavisinde radyoterapi, radyasyona duyarlı tümörlerin tedavisinde ve sağkalım oranının arttırarak tedavinin etkinliği açısından oldukça önemlidir. Ancak tümör, radyasyona dirençli olabileceğinden kanser nüks ve metastazları görülmektedir. Tümör hücrelerinde radyasyondan etkilenen genler, tümörün radyoterapiye yanıtını doğrudan etkilemektedir. mikroRNA (miRNA'lar) içsel ve dışsal streslerde çok çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol alan moleküllerdir. Radyasyona maruz kalan tümör hücrelerinde miRNA'ların sentezlenme profilinde oluşan değişikliklerin, çeşitli hücresel yanıtların ortaya çıkardığı ve birçok kanserin patofizyolojik mekanizmalarında rol aldığı gösterilmiştir. Prostat kanserinde radyoterapi sonrasında miRNA profil değişiklikleri bazı hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiş olmasına rağmen bunu teyit eden oldukça sınırlı sayıda insan çalışması bulunmaktadır. Çalışmamızda, prostat kanseri olan hastalarda radyoterapi sonrasında miR-34a ve miR-521 ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin ölçülerek uygulanan tedavinin etkinliği ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalına radyoterapi uygulaması için gelen otuz beş (n=35) hastadan tedavi öncesi ve sonrası antikoagulanlı tüplere alınan venöz kan örneklemelerinde miR-34a ve miR-521 ekspresyonları kantitatif ters-transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yöntemi ile ölçüldü. Radyoterapi sonrası grupta tedavi öncesi gruba göre PSA, fPSA, lökosit sayısı, hemoglobin, hematokrit, nötrofil, lenfosit ve PCT değerlerinin azaldığı, miR-34a, miR-521 ekspresyon düzeyleri ve MCV değerlerinin arttığı tespit edildi. Sonuç olarak bu çalışmada, prostat kanserinde radyoterapi uygulamaları ile miR-34a ve miR-521 ekspresyon düzeylerinde değişiklikler olduğu tespit edilmiştir ve bu değişiklikler radyoterapinin tedavi etkinliği ile ilişkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: miRNA-34a, miRNA-521, Radyoterapi, Prostat kanseri, PSA

SUMMARY

Investigation of miRNA-34a and miRNA-521 expression levels in radiotherapy applications in patients with prostate cancer

In prostate cancer, radiotherapy has therapeutic effect and increase treatment efficacy and thus the survival rate. However radio-resistant tumors may relapse and metastases. In cancer cells, some genes effected by radiation has direct effects on results of radiotherapy. MicroRNAs (miRNAs) are the molecules which regulate some process related with internal and external stresses. It has been showed that radiation resulted in some changes on synthesis of miRNAs and so, cellular responses in tumor cells. In the literature, although there are some information about changes of miRNA profiles in prostate cancer cell lines, there are very limited number of human studies. Our aim was to investigate expression levels of miR-34a and miR-521 in patients with prostate cancer, before and after radiation therapy. 35 patients who admitted to Radiation Oncology Department for prostate cancer radiotherapy were included in this study. Blood samples for the miRNAs were obtained before and after initiation of radiotherapy. miR-34a and miR-521 expressions were analyzed by using quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). We found that PSA, fPSA leukocyte count, hemoglobin, hematocrit, neutrophil, lymphocyte and PCT values decreased while miR-34a, miR-521 expression levels and MCV values increased in the group after radiotherapy.

In conclusion, expression of miRNAs such as miR-34a and miR-521 effected by radiotherapy in patients with prostate cancer showing that they might be related with treatment efficacy of radiotherapy of cancer patients.

Keywords: miRNA-34a, miRNA-521, Radiotherapy, Prostate cancer, PSA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri, erkeklerde kansere bağılı ölümlerde ilk sıralarda yer alan kanser türlerinden biridir. Prostat kanseri tedavi planlamasında, serumda prostat spesifik antijen (PSA) değeri, klinik tümör evresi, Gleason skorlanması başlıca kullanılan parametrelerdir. Prostat kanseri tedavisinde radyoterapi, radyosensitif tümörlerin tedavisinde ve sağ kalım oranının arttırılmasında tedavinin etkinliği açısından oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Ancak radyorezistans tümörlerin varlığında kanser nüks ve metastazları görülmektedir. Tümör hücrelerinde radyasyon ile ilişkili genler, tümörün radyoterapiye cevabını doğrudan etkilemektedir.

Prostat kanseri tanı ve tedavisinde PSA değeri rutin olarak kullanılmaktadır. PSA ile birlikte serum/plazmada yer alan nükleik asitlerin prognostik önemide tedavi kararının alınması konusunda yeni çalışmalara öncülük etmiştir. Kanserli hastalarda genel olarak serum/plazmada nükleik asitlerin sayısı artmaktadır. Son yıllarda serum/plazma örneklerinde yapılan çalışmalarda, mikroRNA'ların (miRNA) tanı ve tedavi aşamalarındaki önemi açıklanmaya çalışılmıştır. miRNA'lar içsel ve dışsal strese yanıt olarak çok çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol alan moleküllerdir. Radyasyona maruz kalan tümör hücrelerinde miRNA'ların sentezlenme profilindeki değişikliklerin çeşitli hücresel yanıtların ortaya çıkmasına neden olduğu ve birçok kanserin patofizyolojik mekanizmalarında rol oynadığı gösterilmiştir. Prostat kanserinde iyonize radyasyonun etkileri ile ilişkili olarak yapılan çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalarda miRNA profil taramalarında değişiklikler tespit edilmesine rağmen insan çalışmaları oldukça sınırlı sayıda bulunmaktadır. Tez çalışmamızda, prostat kanseri hücre hattında yapılan çalışmalarda iyonize radyasyonun hücresel yanıtlarına bağılı olarak ekspresyon düzeyleri değişen miRNA'lardan olan miR-34a ve miR-521 seçilerek çalışıldı. Çalışmamızda, prostat kanseri olan hastalarda radyoterapi uygulaması öncesi ve sonrasında kan örnekleri alınarak miRNA-34a ve miRNA-521 ekspresyon düzeyleri ölçülerek uygulanan tedavinin etkinliğinin arttırması açısından hücresel süreçlerdeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PROSTAT

Prostat, erkek üreme sisteminin parçası olan bir salgı bezidir. Esas fonksiyonu meninin sıvı kısmını oluşturmaktır. Meninin seminal kese sıvısı ile birlikte %95'ini prostatik salgı oluşturur. Böylece meninin miktarını çoğaltarak spermin dölleme kapasitesini arttırır. Prostat sadece erkeklerde pelviste bulunan en önemli cinsel salgı bezidir. Prostat bezi, mesanenin (idrar torbasının) idrar yoluna bağlandığı yerde, idrar borusunu çepeçevre saran bir organdır. Prostat, kapsül denen bir kılıf ile diğer organlardan ayrılmıştır. Prostatın çıkardığı salgının aktığı küçük kanalcıklar idrar yoluna bağlıdır. (İşler 2012).

2.2. PROSTAT KANSERİ

Prostat kanseri (PCa) ilk kez 1817 yılında Doktor George Langstaff tarafından tıp literatüründe tanımlanmıştır ve prostat ilk kez 1904 yılında Johns Hopkins Hastanesi'nde çalışan PCa günümüzde sıklığı giderek artan, tanı ve tedavisindeki yeniliklerle birlikte lokalize olarak yakalandığında tam olarak kür sağlanabilecek bir hastalıktır. Hastalığa yaklaşımla ilgili gelişmelere rağmen özellikle 50 yaş üzerindeki erkeklerde hasta sağlığını ciddi şekilde tehdit eder (Özcan 2013). Prostat kanseri; genetik yatkınlık, ileri yaş ve çevresel faktörler gibi sebeplerle gelişebilmektedir. Dokularda kanser için genetik yatkınlık oluştuğunda çevresel faktörler de tümör prekürsör lezyonlarının oluşumuna farklı oranlarda zemin hazırlar. Prekürsörlerin bağımsız yayılımı multifokal tümör yayılımına sebep olur (Güzel 2013).

2.2.1. Prostat Kanseri Gelişiminde Androjen Metabolizmasının Rolü

Androjenler normal maskülinizasyon, eksternal genitalerin gelişimi, kemik ve kardiyovasküler sağlık, eritrosit sayısının korunması, spermatogenez, cinsel istek, prostat bezinde fizyolojik büyüme ve fonksiyon için gereklidir. Dolaşımdaki androjenlerin %90-95'inin kaynağı testislerdir. Geri kalan %5-10 [androstenedione, dihidroepiandrosterone (DHEA) ve dihidroepiandrosterone sülfat (DHEAS)] ise adrenal bezler tarafından üretilmektedir.

Androjenlerin varlığı prostatta epitelyal ve stromal hücrelerde proliferasyon ve diferansiyasyona yol açarken, androjen yokluğu apoptozise yol açmaktadır. Benign prostat dokusunda epitelyal hücreler büyüme ve gelişme için indirekt olarak stromal elemanlara bağımlıdır. Androjenlerin prostatik stromal hücrelerdeki androjen reseptörüne (AR) bağlanması ile andromedinler adı verilen çözünebilir peptidler salgınır (Kordan 2010).

Prostat dokusunun gelişimi, farklılaşması ve devamlılığının sürdürülmesi androjenlere, özellikle testesteron ve dihidrotestesterona (DHT) bağlıdır. Bu androjenlerin bulunmadığı durumlarda prostat dokusu apoptozise gider ve belirgin atrofi gelişir. Androjenlerin prostat hücreleri üzerindeki proliferatif ve farklılaştırıcı etkileri AR aracılığıyla gerçekleşir. (Çal ve Şimşir 2005).

2.2.2. Epidemiyoloji

Prostat kanseri, dünyada erkekler arasında en sık görülen kanser türüdür. 2013 yılında Amerika’ da 176.450 erkekte prostat kanseri teşhis edildiği ve 27.681 kişinin de bu hastalıktan öldüğü rapor edilmiştir (U.S Working Group. *United States Cancer Statistics: 1999–2013 Incidence and Mortality Web-based Report*. Atlanta (GA): Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Cancer Institute; 2016. Available at: <http://www.cdc.gov/uscs>. Erişim Tarihi : 04.05.2017).

2.2.3. Prostat Kanseri Tanı Yöntemleri

Prostat kanserinin erken evrelerinde genellikle semptomlar gözlenmez fakat kanserin lokalizasyonuna ve büyüme hızına göre değişik semptomlar görülebilmektedir. Prostat kanserlerinin çoğu çok merkezlidir ve birden çok derecelendirme yöntemi (greyd) vardır. Bunun için prostat karsinomunda yapısal paterne dayanan ve her prostat kanseri alanına iki derece veren Gleason sistemi skorlaması kullanılmaktadır. Gleason skoru sistemine göre 2-4 iyi, 5-7 orta ve 8-10 dereceler ise kötü şekilde farklılaşan kanser türlerini gösterir. Bu sistem hastalığın prognozu hakkında bilgi sahibi olunmasını ve uygulanabilirliği olan tedavi seçenekleri konusunda yol göstermektedir. Diğer bir tanı yönteminde kullanılan PSA, PCa’nın erken teşhisinde belirleyici, evreleyici özelliğinin yanı sıra kanserin erken tanısı sayesinde ölüm oranını azaltan etkisi bilinmektedir. Sağlıklı bireylerde serumdaki PSA seviyeleri

prostat hacmine, yaşa ve ırka bağılı olarak değişkenlik gösterebilirken, PCa, Bening Prostat Hipertrofisi (BPH), sistoskopi uygulaması ve prostatit gibi hastalıklarda artış göstermesinin yanı sıra ejakülasyon, transüretal kateterizasyon, transrektal ultrasonografi, travma gibi sebeplerle de artış göstermektedir (Güzel 2013).

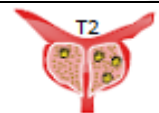
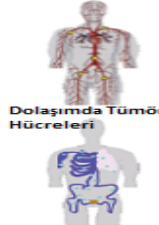
Prostat epitelinde rutin olarak 2 tane demonstratif belirleyici vardır, bunlardan biri Prostat Spesifik Asit Fosfataz (PAP) diğeri Prostat Spesifik Antijen (PSA)'dır. Poliklonal veya monoklonaldırlar. Benin ve malin lezyonları ayırmada yararlı değildir ancak metastatik tümörlerde tümörün prostat orijinli olduğunu gösterir. Aynı zamanda indifferansiye vakalarda da pozitifdir. Ayrıca hormon terapisi alan vakaların takibinde de önemlidir. Bu belirleyiciler, kötü diferansiye prostatik karsinom ve transisyonel hücreli karsinomun ayırıcı tanısında 34βE12, Leu7, CK7 ve p53 ile beraber kullanıldıklarında yararlıdır. PSA düzeyinin ölçülmesi; elle yapılan muayene, ultrason, röntgen, prostattan parça alarak prostat kanseri tanısı yapılır. PSA, prostatta üretilen bir madde olduğundan bunun kanda olması gereken miktardan fazla olması tanı konmasında önemlidir. Normal değer 4ng/dl ve daha düşük olmalıdır (İşler 2012).

Prostat adenokarsinomunu saptamada rektal muayene pratik ve güvenilir yöntem olmakla birlikte, tanı için rektal muayene, transrektal ultrasonografi ve serum PSA değerinin ölçümünü içeren üçlü kombinasyon, erken prostat kanserini saptamada değerlidir. Ancak, kesin tanı için histopatolojik inceleme gereklidir (Yıldırım 2011).

2.2.4. Evreleme

Günümüzde prostat kanseri evrelemesinde en son Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN Guidelines Version 2.2017 for Prostate Cancer) tarafından benimsenmiş Tümör-Lenf Nodu-Metastaz (TNM) evreleme sistemi kullanılmaktadır. Klinik (cTNM) ve patolojik (pTNM) olmak üzere iki tip evrelendirme yapılmaktadır. Patolojik evrelendirme klinik evrelendirme ile aynıdır; ancak patolojik evrelemedirmede T1 kategorisi yoktur, pT2'den başlar. Patolojik evrelendirme için genellikle radikal prostatektomi yapmak gerekir. Ancak pozitif rektum biyopsisi pT4 için, pozitif periprostatik yumuşak doku veya seminal vezikül biyopsisi pT3 için yeterlidir. Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı evreleme sistemi ile prostat kanserinin TNM evrelendirilmesi şekil 1 ve tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. NCCN Guidelines Version 2.2017 ile prostat kanserinin klinik evrelendirilmesi (**Kaynak:** Tablo 1. NCCN Guidelines Version 2.2017 for Prostate Cancer)

Tümörün klinik (cT) evresi		
	Tx	Primer tümör değerlendirilemez
	T0	Primer tümör bulgusu yok
	T1	Tümör klinik olarak palpe edilemez ve görüntüleme yöntemiyle görünmez
	T1a	Tümör rezeke edilen dokunun raslantısal olarak %5'den azında mevcut
	T1b	Tümör rezeke edilen dokunun raslantısal olarak %5'den fazlasında mevcut
	T1c	İğne biyopsisiyle saptanan tümör (PSA yüksekliği nedeniyle alınan biyopside)
	T2	Tümör prostata sınırlıdır
	T2a	Tümör bir lobun yarısında ya da daha azında mevcut
	T2b	Tümör bir lobun yarısından fazlasında mevcut
	T2c	Her iki lobda da tümör mevcut
 Tümör Hücreleri	T3	Prostat kapsülü boyunca uzanan tümör mevcuttur
	T3a	Prostat kapsülü dışına çıkan tümör
 Dolaşımda Tümör Hücreleri Metastaz Hücreleri	T3b	Seminal vezikül invazyonu yapan tümör
	T4	Tümör seminal vezikül dışındaki mesane, levator adalesi ve pelvik duvar gibi çevre yapılara invazyon yapmıştır

Şekil 1. AJCC2010 TNM Evreleme (**Kaynak:** Şekil 1. Cannistraci et al 2014)

İğne biyopsisiyle bir ya da her iki lobda bulunan ancak DRM'de veya görüntülemede saptanamayan tümör T1c'dir. Prostat apeksine ya da prostat kapsülünü aşmadan kapsül içine invazyon yapmış tümör T3 değil T2'dir.

NCCN Guidelines Version 2.2017 prostat kanserinin patolojik evrelendirilmesi

Patolojik (pT)

T2 Palpe edilen ve prostata sınırlı tümör.

T2a Bir prostat lobunun %50'sinden azını tutan tümör

T2b Bir prostat lobunun %50'sinden fazlasını tutan tümör

T2c Her iki prostat lobunu tutan tümör

T3 Tümörün prostatik kapsül dışında yayılımı ve/veya seminal vezikül tutulumu

T3a Tek taraflı ekstrakapsüler yayılım

T3b İki taraflı ekstrakapsüler yayılım

T3c Vezikula-seminalis invazyonu

T4 Tümörün vezikula-seminalis dışında diğer komşu yapılara invazyonu veya fiksasyonu

T4a Mesanenin boynu, eksternal sfinkter ve/veya rektum invazyonu

T4b Levator kasları ve/veya pelvik duvara fiksasyon

Bölgesel Lenf Nodları (N)

Klinik

NX Bölgesel lenf nodları değerlendirilmedi

N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1 Bölgesel lenf nodu metastazı var

Patolojik

NX Bölgesel lenf nodu (LN)'nin değerlendirilmedi

N0 Bölgesel LN metastazı yok

N1 Bölgesel LN tutulmu

Uzak Metastaz (M)

MX Uzak yayılımın değerlendirilememesi

M0 Uzak metastaz yok

M1 Uzak metastaz var

M1a Non-rejyonal LN tutulumu

M1b Kemik metastazı

M1c Diğer uzak organların tutulumu

Not: Birden fazla metastaz alanı mevcut olduğunda, en gelişmiş kategori kullanılır.

PMIc en ileri seviyededir. (NCCN Guidelines Version 2.2017 for Prostate Cancer)

2.2.5. Prognostik Faktörler

Amerikan Patoloji Topluluğu tarafından prognostik faktörler 3 kategoriye ayrılmaktadır. Preoperatif serum PSA düzeyi, prostat kanserini hem saptamada, hem de izleminde önemli rol oynamaktadır. Gleason skorlaması ile elde edilen histopatolojik derece, klinik ve patolojik evreyle direkt ilişkili olup, cerrahi tedavi sonrası progresyonu göstermede güçlü belirteçlerden birini oluşturmaktadır. TNM evresi, prognozla ilişkili en önemli prognostik faktör olup, evreleme yaparken tümör volümü, prostat kapsülü, seminal veziküllerin durumu ve lenf nodülleri de değerlendirilmektedir (Yıldırım 2011).

2.2.6. Prostat Spesifik Antijen (PSA)

Prostat kanseri tanısında kaydedilen en önemli ilerlemelerden biri, tümör belirleyicisi olan PSA'nın keşfidir. PSA'nın tanı, tedavi ve takibindeki yüksek anlamlılığı, klinik kullanıma başlanılmasından sonra prostat kanseriyle mücadelede çok kısa zamanda önemli gelişmelerin elde edilmesini sağlamıştır. Prostat bezinin epiteliyumundan sentezlenen PSA, seminal plazmaya 0.5-2.0 gr/L konsantrasyonunda salgılanmaktadır; bu değer serumdaki 0.1-4 ng/ml'ye eşittir (Özel 2006). PSA, Serbest (free) olarak, Alfa 2-makroglobuline bağlı olarak (A2M-PSA) ve Alfa anti-kimotripsine bağlı olarak (ACT-PSA) serumda 3 ayrı moleküler formda bulunmaktadır (Yıldızhan 2006).

2.2.7. Serum PSA Düzeyini Etkileyen Faktörler

Serum PSA seviyesinde artış PSA'nın prostat dokusu içine difüzyonunu sağlayan normal prostat yapısının bozularak normal yapısını kaybetmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkabilmekte ve PSA'nın dolaşıma katılmasına neden olabilmektedir. Bu durum prostat hastalıklarında (BPH, prostatit, prostat kanseri) ve prostat manüplasyonları (prostat masajı, prostat biyopsisi) sonucunda meydana gelir. Prostat inflamasyonu (akut ve kronik) ve üriner retansiyon değişik derecelerde PSA yükselmelerine neden olabilir. Prostat biyopsisinden sonra oluşan prostat travmaları PSA'nın dolaşıma fazlasıyla karışmasına neden olur. Normal değerlerine dönmesi için 4 haftadan daha fazla beklenmesi gerekir (Tosun 2007).

2.2.8. PSA Velositesi

PSA velositesi, PSA'daki değişiklik hızının ölçülmesidir. Zamanla yükselmeye devam eden serum PSA'sı sabit kalan PSA'ya göre daha yüksek oranda prostat kanserini belirtmektedir.

2.2.9. PSA Dansitesi

PSA dansitesi (PSAD) serum PSA'sının Transrektal Ultrasonografi (TRUS) ile ölçülen prostat hacmine oranıdır ve prostat kanserli hastalarda BPH'lı hastalara göre daha fazladır. Bir tarama metodu olarak kullanılmamakla birlikte düşük riskli hastalarda aktif izlem kriterleri olan güncellenmiş Epstein Kriterleri arasında bulunmakta ve aktif izlem için PSAD 0,15 altında olması koşulu bulunmaktadır.

2.2.10. Serbest PSA

Normal şartlar altında PSA bir ön enzim olarak prostat bezi epiteli tarafından üretilir, lümene salınır ve burada peptitlerinden ayrılarak aktif PSA'ya dönüşür. Aktif PSA proteolizisla tekrar inaktif PSA'ya dönebilir ve küçük bir kısmı dolaşıma geçip serbest PSA şeklinde dolanabilir. Alternatif olarak aktif PSA dolaşıma geçer ve hızla proteaz inhibitörleri olan alfa-1 antikomotripsine ve alfa-2 makroglobüline bağlanabilir. Bağlı haldeki enzim olan kompleks PSA inaktiftir (Özdemir 2012).

2.2.11. ProPSA

Dolaşımdaki sPSA, proPSA, benign PSA (BPSA) ve intakt PSA (iPSA) olarak üç farklı formda bulunmaktadır. PSA, başlangıçta proPSA olarak üretilmektedir ve inaktif olan bu form, prostat kanserli hastalarda artmış oranlarda bulunmuştur.

2.2.12. Kompleks PSA Eşik Değeri

PSA'nın önemli bir bölümü serumda Etkinleştirilmiş Pıhtılaşma Zamanı (ACT) ile kompleks halde bulunmaktadır. Prostat kanserli olgularda ACT-PSA düzeyleri BPH hastalarından daha fazla yükselmektedir. Kompleks PSA'nın toplam PSA değeri 4-10 ng/ml olan olgularda serbest PSA'ya benzer bir özgünlük gösterdiği ve bağımsız bir test olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Tosun 2007). Alfa-1 antikomotripsine bağlı PSA formu olan kompleks PSA (cPSA) düzeyinden teorik olarak s/tPSA'dan elde edilen spesifiteye benzer doğruluk öngörülmektedir. Stenman

ve arkadaşları, prostat kanserli hastaların sPSA'dan daha fazla cPSA'ya sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Kutlu ve Köksal 2012).

2.2.13. Prostat Kanserinde Patoloji

Prostat kanseri iki büyük grupta incelenebilir. Periferik duktus ve asinilerin adenokarsinomu (sekonder) ve büyük duktusların karsinomu (primer). Bu morfolojik ayrım her iki tümörün de farklı orijinden köken aldığı inancıyla göre yapılmaktadır. Diğer bir alternatif yaklaşım ise, tümörün yapısını belirleyen tümörün orijini değil de büyüme bölgesinin etkili olduğudur (İşler 2012).

2.2.14. Tümör Baskılayıcı Genler

- NKX3.1 Geni
- Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) Geni
- C-Myelocytomatosis Geni (C-myc)
- Prostate Stem Cell Antigen (PSCA)

2.2.15. Onkogenler

- Androjen Reseptörü
- Alpha-methylacyl-CoA Racemase (AMACR)

2.2.16. Epigenetik

Epigenetik değişiklikler, nükleozom konumunu değiştirerek tüm kromatin yapısı üzerinde doğrudan etki eden düzenlemeler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, RNA ile indüklenen sessizleşme (Kodlanmayan RNA'lar) ve kromatin yeniden düzenlenmesi şeklinde 4 ana grupta toplanır (Özcan 2013). Bu mekanizmaların ortak çalışması sonucu genetik değişimler meydana gelmektedir.

2.3. PROSTAT KANSER TEDAVİSİ

Prostat kanserinde tedavi, cerrahi (radikal prostatektomi, RP), radyoterapi (RT) ve hormonal tedavi (HT) risk gruplarına göre tek başına ya da birlikte kullanımı ile düzenlenmektedir (Carroll et al 2014).

Tedavi kararını verirken risk grupları (PSA düzeyleri ve Gleason düzeyleri ne göre) ve evrelerine göre prostat kanserini 5 gruba ayırarak tedavi kriterleri

belirlenmektedir. Bu gruplar; çok düşük riskli prostat kanseri, düşük riskli prostat kanseri, orta riskli prostat kanseri, yüksek riskli prostat kanseri ve çok yüksek riskli metastatik prostat kanseri şeklinde tanımlanmaktadır.

Düşük riskli prostat kanserinde Aktif izlem, RT, Cerrahi (RP) yöntemlerden biri tercih edilmelidir. Aktif izlem için uygun hasta seçiminde; Biyopsi örneklerinde 2-3'ten az odakta tümör olması, herhangi bir biyopsi odağında %50'den fazla tutulum olmaması, PSA<10 ng/ml, Gleason skoru<4 kriterlerinin olmalıdır. Bu kriterlerin tümünü karşılayamayan hastalara düşük risk grubunda olsalar dahi klinik önemli olduğu için tedavi (RT ya da cerrahi) uygulanmalıdır Aktif izleme alınan hastaların takibinde, İlk yıl 3 ayda bir, sonra 6 ayda bir total PSA, yıllık parmakla rektal muayene ve birinci yıl JUSonunda ve sonra iki yılda bir tekrar biyopsi yapılmalıdır.

Orta riskli prostat kanseri tedavi seçenekleri: Radikal RT $\pm$ HT (6-9 ay kısa dönem) veya Cerrahi (Radikal Prostatektomi) olmalıdır.

Yüksek riskli prostat kanseri, metastaz olmayan ve yüksek riskli klinik bulguları olan veya lenf nodu pozitifliği olan hastalardır. Tedavi seçenekleri: arasında Radikal RT $\pm$ HT (2-3 yıl uzun dönem) veya Cerrahi (RP) önerilebilir. Bu risk grubundaki hastalarda tek modalite ile tedavi başarısı düşük olduğundan, tedavi kararının ayrıntılı evreleme ve mutlak multidisipliner yaklaşım ile verilmesi önerilmektedir (Mottet et al 2016). Lokal ileri evre hastalığın tedavisinde temel amaç hastalığın tümüyle yok edilmesi ve lokal kontrolün sağlanmasıdır. Radikal prostatektomi sonrası patolojik bulgularda cerrahi sınır pozitifliği, kapsül dışı yayılım ve seminal vezikül invazyonu varlığında radyoterapi etkin bir tedavi yöntemidir. Radyoterapi ile birlikte neoadjuvan, adjuvan hormonal tedavi tek başına veya birlikte verilebilir. Ayrıca pelvik reziduel hastalık şüphesi bulunan durumlarda adjuvan radyoterapi genel olarak tedavi şansını arttırabilir. Lokal ileri evre prostat kanserinde multimodalite tedavi içinde adjuvan radyoterapinin etkinliğini gösteren en önemli çalışma prospektif randomize EORTC 22911 çalışması olmuştur (Bolla et al 2005). Çalışmanın sonucunda radikal prostatektomi sonrası verilen adjuvan radyoterapinin hem progresyonsuz sağkalımı, hem de biyokimyasal hastalıksız sağkalımı anlamlı derecede iyileştirdiği görülmüştür. İzlem grubunda 5 yıllık hastalıksız sağkalım %52.6 olurken adjuvan tedavi kolunda %74 olarak bildirilmiştir.

İleri evre hastalık; Biyokimyasal nüks (non-metastatik PSA nüksü - tedavi sonrası PSA artışı olan hastalar) veya Metastatik prostat kanserli hastalardır. Biyokimyasal nüks, tedavi edilen (cerrahi veya RT) hastada PSA yüksekliği saptanmasıdır. Bu hastalarda hangi tedavinin uygulanacağı hastalığın özellikleri belirleyicidir. Bu özellikler; daha önce aldığı tedavi, yaşam beklentisi, genel durum (performans durumu), PSA ikilenme hızıdır. Bu durumda tedavi seçenekleri: Kurtarma RT (önceden cerrahi görmüş hastalarda), Kurtarma cerrahisi ya da kriyoterapi gibi fokal tedavi yöntemleridir. Adjuvan Hormonoterapi (ADT) ve İmmünoterapi önceden cerrahi ve/veya RT uygulanmış hastalarda önerilir.

Metastatik prostat kanseri ilk tanıda metastatik olarak belirlenebildiği gibi izlemde de metastatik hale gelebilir. Metastatik hastalık için, sistemik tedaviler uygulanır. Metastatik prostat kanseri temel olarak ADT duyarlı (hiç HT almamış) ve Kastrasyona dirençli (daha önce HT almış) olarak ikiye ayrılır. Hormon duyarlı metastatik prostat kanserinde tedavi seçenekleri, kemoterapi alabilecek performans durumundaki hastalarda ADT ile birlikte kemoterapi uygulanmasıdır. Yaş, komorbidite gibi nedenlerle performans durumu kemoterapi almaya uygun olmayan hastalarda sadece ADT önerilir. Son klinik çalışmalar, metastatik hastalıkta ADT ile eşzamanlı olarak KT uygulanmasının yaşam süresi üzerin olumlu etkileri olduğunu göstermiştir (CHAARTED study) (Sweendey et al 2015).

2015 ESMO kılavuzu, metastatik hormon duyarlı prostat kanseri tedavisinde, ADT ile birlikte dosetaksel uygulanmasını, kemoterapi alabilecek kadar performansı iyi her hastada önermektedir (Parker et al 2015). Kastrasyona dirençli metastatik prostat kanseri (CRPC) tedavi seçenekleri: Abirateron Abirateron, Enzalutamid, İmmünoterapi, Kabazitaksel gibi hedefe yönelik tedavilerdir. Kemik metastazı olan CRPC tedavi seçenekleri: Kemik hedefli ajanlar (zoledronik asit [bifosfonat], denosumab [RANK-ligand inhibitörü), Radyum-223, palyatif RT ve diğer destekleyici tedavi yaklaşımlarıdır.

2.4. miRNA’LAR

miRNA’lar, endojen küçük RNA’ların (small RNA) bir sınıfını oluşturan, protein kodlamayan RNA molekülleridir. Yaklaşık 20-23 nükleotit uzunluğunda tek

iplikçikli miRNA'ların sayısı insanlarda binin üzerinde tespit edilmiştir. Bu moleküllerin çeşitli biyolojik olaylarda ve patolojik durumlarda önemli düzenleyici roller aldığı gösterilmiştir. miRNA'ların hücrel gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede düzenlediği düşünülmektedir. mRNA'lara hedef genin düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için miRNA'lar gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir. miRNA'lar özellikle hücre tipinin belirlenmesi ve hücre farklılaşması olmak üzere pek çok fizyolojik işlemde rol alır. Çeşitli kanserlerde bazı miRNA'ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör ilerlemesi, metastazı ve invazyonunda miRNA'ların düzenleyici olduğunu göstermektedir (Çelik 2013).

2.4.1. miRNA'ların Biyogenezi

İnsanlarda miRNA'lar pri-miRNA adı verilen 1 kb'dan daha büyük diziler halinde transkribe olurlar ve 5'cap ve 3'poli A kuyrukları vardır. Pri-miRNA transkriptleri iki adımlı bir süreçten geçerek olgun ve işlevsel miRNA haline gelirler. (Tunalı ve Tiryakioğlu 2015). miRNA'ların sentezi miRNA genlerinden RNA polimeraz II (RNA pol II) enzimi aracılığıyla öncü miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Saç tokası şeklinde oluşan pri-miRNA nükleusta bulunan bir RNaz olan Drosha ve RNA başlanma noktası bulunan bir protein DGCR8/Pasha'dan (DiGeorge kritik bölgesi 8, *C. elegans* ve *Drosophila* da Pasha olarak tanımlanır) bir araya gelerek mikroişlemci kompleksini oluşturur. Oluşan kompleks pri-miRNA'yı keserek yaklaşık 70 nükleotidli pre-miRNA'yı oluşturur. Nükleusta oluşan pre-miRNA'lar Exportin 5 adı verilen molekül aracılığıyla sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya geçen pre-miRNA RNA-pol III'ün bir türü olan Dicer tarafından kesilerek 20-25 nükleotidlik olgun miRNA ve onun komplementeri miRNA'dan oluşan çift sarmal halini alır. Daha sonra miRNA, miRNA ikilisi helikaz tarafından çözülerek olgun miRNA ve miRNA'ya dönüşür (Çelik 2013).

2.4.2. miRNA ve Kanser

Hücreler anormal olarak çoğaldıklarında ve apoptoz fonksiyonlarını kaybettiklerinde genellikle kanserleşirler. miRNA'ların hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili anahtar moleküller oldukları bilinmektedir.

Kanserleşme sürecine miRNA'ların katkıda bulunduğunun ilk kanıtı, Calin ve arkadaşlarının 2001 yılında Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarda yaptıkları moleküler çalışmayla ortaya konulmuştur (Saydam 2011).

Bir ya da birden fazla hedef geni baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde rol oynarlar. Son gelişmeler miRNA mutasyonları ya da yanlış ifadeleri, çeşitli insan kanserleri ile ilişkili olduğunu ve miRNAlar tümör baskılayıcılar ve onkogenler olarak işlev yaptığını göstermiştir. miRNAlar kanser ile ilişkili genlerin ekspresyonunu bastırmak ve kanserin teşhisi ve tedavisinde faydalı olabileceğini göstermiştir (Haberal ve Oğul 2014).

2.4.3. Onkogen ve Tümör Süpresör Gen Olarak miRNA

miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler düzeydeki özelliklerine göre onkogenik veya tümör süpresör özellik kazanabilirler. Normal dokularda miRNA'lardan bazılarının protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu miRNA'lar "tümör süpresör miRNA'lar" (TSmiR) olarak bilinmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olacaktır. Bunun tersi olarak, "onko-miR" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanser gelişimini arttırdığı görülmektedir (Karagün 2014).

2.4.3.1. Onkogen Olarak miRNA

Tümör süpresör miRNA'ların tersine, onkogenik miRNA'lar çoğunlukla kanser türlerinde kontrolsüz büyümeyi artırıcı ve/veya anti-apoptotik yönde fonksiyon gösterirler. İlk olarak keşfedilen onkogenik miRNA'lardan bir tanesi miR-155'tir. Ayrıca miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 ve miR-92-1 onkogenik özelliklere sahiptirler. Bu miRNA'ların ekspresyon düzeyleri, proliferasyonu teşvik ederek, apoptoz inhibisyonunu sağlayarak ve tümör anjiyogenezi tetikleyerek kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır.

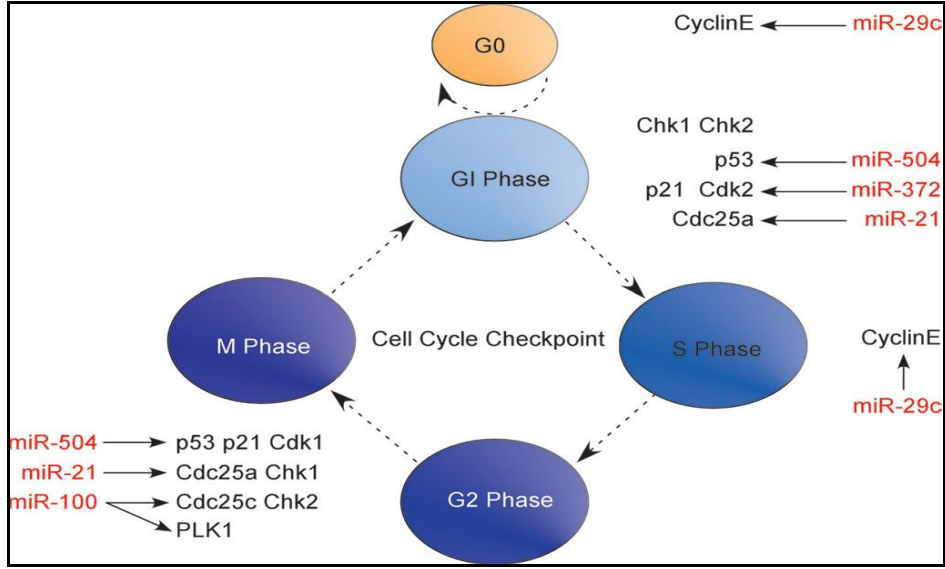
2.4.3.2. Tümör Süpresör Gen Olarak miRNA

miRNA'ların kanserleşme sürecine etkisi ilk olarak 2001 yılında miR-15a ve miR16-1'in keşfedilmesi ile ortaya konmuştur. Tümör süpresör özellik gösteren diğer bir

miRNA, let-7 ailesinin üyeleridir (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g) (Saydam 2011).

2.4.4. miRNA Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisi

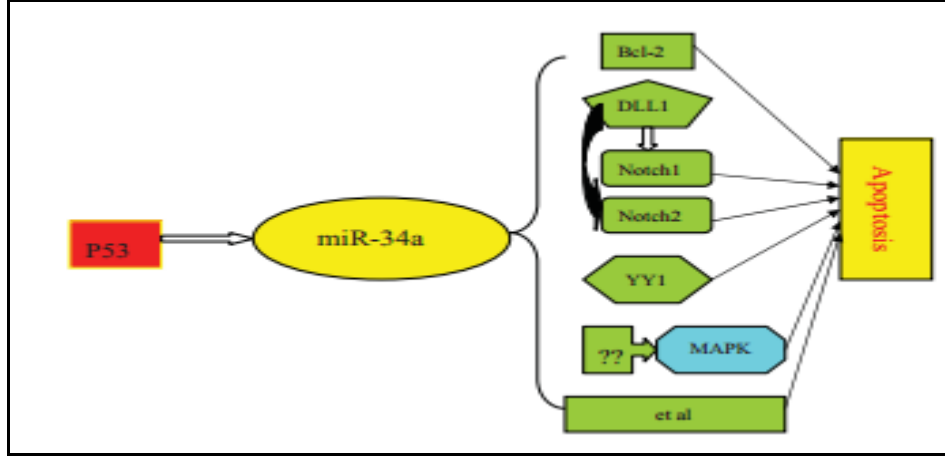
Tümör hücreleri genellikle en az bir hücre döngüsü kontrol noktası kusuru göstermektedir. Özellikle G1/S fazı kontrol noktasındadır. Bu nedenle, geçiş inhibisyonunda kalan diğer kontrol noktaları hücre döngüsünün ilerlemesini önler. Böylece, kontrol noktası inhibitörleri (Ör.) Chk1 ve Chk2, hücre döngüsünün ilerlemesini bloke ederek tümör radyosensitivitesini etkiler. Bu yöntem antitümörün sitotoksitesini arttırmak için klinikte ilaçlar ve radyoterapi etkinliğinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca ATM ve ATR proteinleri, Cdc25A, Chk1, Chk2, Cdk2, P53, p21, PLK1 ve WEE1 tümör radyosensitivitenin artışında ve DNA hasar onarım işlemini engilemede önemlidir. ATM ve ATR tarafından apoptoz ile ilişkili işlevlerin değiştirilmesi P53, FAS, PUMA ve Bax gibi proteinler tarafından apoptoza teşvik edebilir ve radyoterapötik etkileri arttırılabilir. miRNA, hücre döngüsü kontrol noktasında ve apoptozun düzenlenmesinde etkilidir. G1/S evresinde, Chk1, Chk2, p53, MDM2, P21, cyclin E, Cdk2 ve Cdc25A, miRNA'lar tarafından kontrol edilir. S-fazında, miRNA Chk1, Chk2, Siklin E, Cdk2, Cdc25A ve SMCl ekspresyonu düzenler. G2/M evresinde Chk1, Chk2, p53, p21, siklin B, Cdk1, Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C, PLK1 ve WEE1, miRNA'lardan etkilenir. Tümör hücresinde apoptoz esnasında miRNA, p53, Fas, NOXA'nın ekspresyonunu modüle etmektedir. Bu süreçler, proapoptotik (Bax, Bad, Bak, Bim ve PUMA) ve antiapoptotik faktörleri (Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1) de kapsamaktadır. miR-101 ve miR-1'in upregülasyonu, Mcl-1 ifadesini baskılamak, artan miR-15b, miR-16 ve miR-34a, b, c'nin eşlik ettiği miR-21 ekspresyonu azalırken, Bax inhibisyonuna katkıda bulunur. Bax ve Bim aracılığıyla Mcl-1 ve Bcl-2 mitokondrinin membran geçirgenliğini arttırarak sitokrom C'yi indükler ve apoptosise bağlı faktör salınımı artarak apoptoz gerçekleşir.



Şekil 2. miRNA'nın hücre döngüsü kontrol noktaları üzerindeki etkileri

(Kaynak: Zhao L, Bode AM, Cao Y, Dong Z.2012).

miRNA'lar hücre döngüsü kontrol noktasının ve apoptozun düzenlenmesinde yer alır. miRNA, G1/G0 fazı, G1/S fazı, İntra-S fazı ve G2/M fazı hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen DNA hasar onarım süresini azaltarak hücre döngüsü ilerlemesini engeller tümör hücresi oluşumuna neden olur ve radyoterapi ile daha fazla tümör hücresi öldürülür. Bu süreç içinde, hücre döngüsü ilerlemesiyle ilgili Chk1, Chk2, p53, p21, Siklin E, Cdk1, Cdk2, Cdc25a, Cdc25c ve PLK1 gibi birçok önemli molekül, miRNA'lar ile ilişkilidir. Apoptozis sırasında miRNA, Bax, Bad, Bak, Bim ve PUMA dahil olmak üzere pro-apoptotik faktörlerin ekspresyonunu düzenler ve mitokondriyal membran geçirgenliğini artırır, sitokrom C'yi indükler ve apoptoz ile indüklenen faktörü artırmak için Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik faktörler (AIF) salınması ile kaspaz 3'ün aktivasyonu sağlanır ve tümör hücresi apoptosisi ile sonuçlanır. Şekil 2'de miRNA'nın hücre döngüsü kontrol noktaları üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Zhao et al 2012). Welch ve ark. MiR-34a p53 proteinin hedef olarak tanımlanmadan önce, ektopik miR-34a'nın kaspaz aracılı apoptotik aktivasyonu ile sonuçlanan miR-34a ekspresyonunda azalma gösteren nöroblastoma hücre çizgilerine yol açtığında apoptozu indüklediğini bildirmiştir. miR-34a, p53'e bağımlı veya bağımsız şekilde hücrede apoptozu oluşturan ve kanser baskılayıcı olarak görev yapan hedef proteinleri düzenler (Şekil 3).



Şekil 3. miR-34a, p53'e bağımlı hücre apoptozu oluşturan hedef proteinlerini düzenler (**Kaynak:** Chen and Hu 2011).

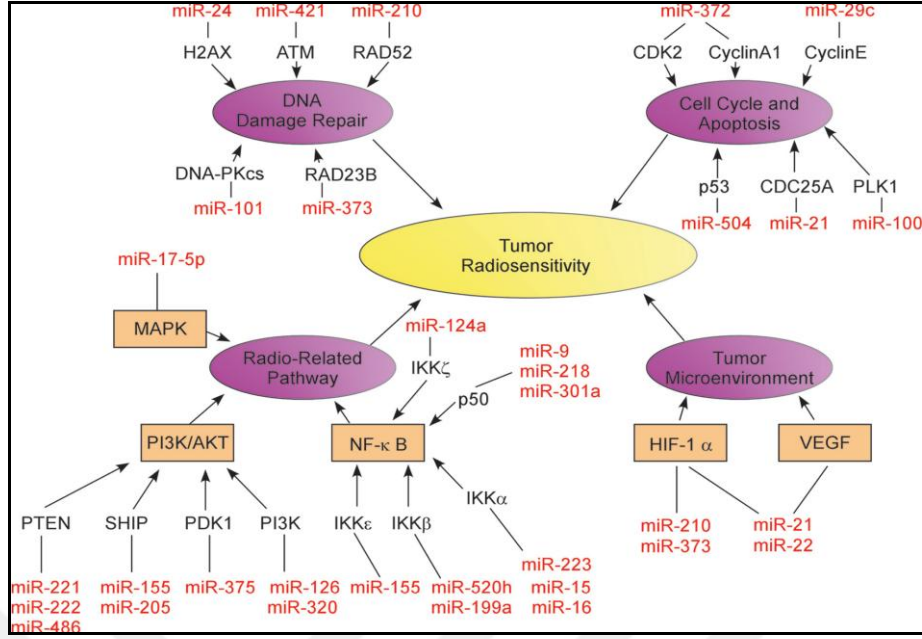
2.4.5. Radyosensitivite ve Radyosensitiste miRNA'ların Rolü

Teorik olarak iyonize radyasyonun miRNA profilleri arasındaki ilişkileri gösterilmiş olmasına rağmen, iyonize radyasyonda miRNA ekspresyon düzeyleri, oldukça kompleks mekanizmalarda rol almaları nedeniyle farklılıklar göstermektedirler. miR-34a ve miR-521'in hücrelerin iyonize radyasyona yanıtı, oksidatif stres, apoptoz ve hücre döngüsünde yer alan kontrol noktaları üzerinden ilişkili mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Klinik uygulamada miRNA'lar teşhis ve prognostik amacın yanı sıra, pratik kullanım için de en önemli sorundur. Radyasyon cevabının belirlenmesinde birçok faktör arasında genetik veya epigenetik faktörler gibi miRNA etkileşimleri de önemli yer tutar (Cellini F, Morganti Alessio G, Genovesi D, Silvestris N, Valentini V. 2014). Birçok çalışmada miRNA'ların radyasyona duyarlılığı hangi süreçlerde daha fazla yer aldığını keşfetmiştir. miRNA'ların, tümör mikro ortamının (TME) arasındaki ilişki şekil 5'te gösterilmiştir. miRNA, TME düzenlenmesinde yer alır. Tümör radyosensitivitesi genetik gibi iç faktörlerden etkilenir. TME gibi dış faktörler ve diğer değişkenler, oksidatif stres, hipoksi ve anjiyogenez kanser hücrelerinin radyo-duyarlı olup olmadığını belirleyen iki temel faktördür. TME'de, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve hipoksi indüklenebilir faktör-1 (HIF-1), tümör dokularının kan akışını ve oksijen konsantrasyonunu değiştirerek tümörün radyosensitivitesinde önemli rol oynayan iki önemli faktördür.

EGFR / PI3-K / Akt ve PI3-K / Akt gibi TME ile ilgili sinyal yolları, Akt / mTOR yolları ayrıca TME'yi etkiler ve tümör radyosensitivitesini artırabilir. Ayrıca, miRNA TME ile ilgili sinyal iletim yollarının fonksiyonu etkileyerek, VEGF ve HIF-1 ekspresyonunu düzenler. Hipokside, bazı hipoksi ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonu tetiklenir ve DDR'taki genleri aktive ederek radyo duyarlılığı etkilerler (Zhao et al 2012). Son yıllarda yapılan bir çalışmada LNCaP ve C4-2 insan prostat kanseri hücre hatlarında radyasyonun yanıtında mir-521 rolü açıklanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada, miR-521'in rolünü belirtmek için mir-521'in taklitçisi kullanılarak (mimic) mir-521'in geçici olarak ekspresyon düzeyi artırılmıştır. miR-521 taklitçi prostat kanseri hücrelerin radyasyon tedavisini önemli ölçüde duyarlı hale getirmektedir. Diğer bir deyişle ektopik mir-521 inhibisyonu prostat kanserli hücrelerinin radyasyona direnç gösterdiği belirtilmektedir. miR-521'in radyasyon duyarlılığını modüle ettiği mekanizmayı belirlemek için Cockayne sendromu protein A'nın (CSA) ön görülen hedeflerinden birinin ekspresyon düzeylerinin ölçümüyle yapılmaktadır. CSA, bir DNA tamir proteini olup mir-521 ekspresyon düzeyleri ile negatif korelasyon göstermektedir. Radyasyon tedavisinde mir-521 ekspresyon düzeyinin azalması ve CSA protein düzeylerinde artışın olduğu gösterilmiştir. mir-521'in ektopik inhibisyonu CSA protein düzeylerinin artmasına neden olur. CSA protein düzeylerindeki değişiklikler mir-521'in prostat kanserli hücrelerin radyasyona duyarlı hale getirir. Dolayısıyla mir-521 radyasyon tedavisinin prostat hücre hatlarında tedavinin etkinliğinin artırılması için potansiyel bir hedeftir. Manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) mitokondriyel antiapoptotik ve antioksidan bir enzimdir. MnSOD aktivite artışı radyasyona bağlı oksidatif hasara karşı hücreyi korumaktadır. Yapılan çalışmada LNCaP ve C4-2 insan prostat kanseri hücre hatlarında mir-521'in inhibisyonu MnSOD aktivitesinde hafif bir artışa neden olmuştur. MnSOD mir-521'in dolaylı bir hedefidir. mir-521'in prostat kanseri hücre hatlarında DNA onarım proteini olan CSA ve antioksidan –antiapoptotik MnSOD aktivite değişiklikleri hücrelerin radyasyona yanıtında önemli rol oynamaktadır (Josson S, Sung SY, Lao K, Chung LW, Johnstone PA. 2008).

2.4.6. Radyoterapinin miRNA'lar Üzerindeki Etkisi

Radyoterapi (RT), iyonlaştırıcı radyasyonla (IR) serbest radikaller meydana getirerek farklı seviyelerde neoplastik hücrelerde hasar meydana getiren tümör hücrelerini tedavi etmeyi amaçlar (özellikle de DNA üzerinden). IR'ya verilen hücresel yanıt aynı anda DNA hasar yanıtına (DDR) aracılık eden bir dizi sinyal yolunu aktive eder; İyonlaştırıcı Radyasyondan doğan hasarların onarılamaması doğrudan ya da dolaylı olarak hücre ölümüne yol açar. Hücre hasarının tam olarak düzelmesi, tümör hücrelerinin radyasyona olan duyarlılığına bağlıdır. miRNA'lar, DDR süreçlerinin düzenlenmesinde derinden yer almaktadır. Tümör radyosensitivitesinin değiştirilmesiyle RT'nin etkinliğinin artırılmasına yönelik onkolojik uygulamalarla yüksek derecede ilişkilidir. IR reaksiyonlarda rol oynayan proteinleri kodlayan birçok gen bilinmesine rağmen, onları manipüle etmek oldukça zordur. miRNA 'lar bu genler üzerinde etki yapmasından dolayı çok önemlidir. miRNA'ların RT tedavisindeki rolünü, tedaviyle ilgili toksisiteyi anlamak ve yönetmek için de önemli yer tutar. miRNA'lar hakkında tıbbi ve spesifik onkolojik bilgi oldukça iyi olsa da radyasyon duyarlılığı ve radyosyan direnişi ile ilgili etkileşimleri incelendiğinde, bu mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (Cellini et al 2014). Tümör radyosensitivitesinde miRNA'ların düzenleyici mekanizması şekil 4'te gösterilmiştir. miRNA'lar tümör radyoterapisinin ve radyosensitivitesinin düzenleyici mekanizması her yönünü, tümör DNA hasar onarımında, hücre döngüsü kontrol noktasında, apoptozda ve oksidatif stresle ilgili sinyal iletim yollarında ve TME'de yer alan birden fazla faktörün işlevini etkilemektedir (Zhao et al 2012). miRNA genlerindeki değişim, prostat, böbrek ve mesane başta olmak üzere ürolojik kanserlerin patofizyolojisinde önemli rol oynar. Yapılan çalışmalarda, malign hücrelerde miRNA ifade edilme spektrumunun sağlıklı eş hücrelere göre anlamlı olarak farklı olduğu gösterilmiştir. Öncelikle, miR'lerde olan bu deregülasyonlar mutasyonlardan, heterozigotluk kaybından (LOH), epigenetik düzenlemelerden, miRNA biyogenez işlemlerindeki kusurlardan ileri gelebilir.



Şekil 4. miRNA'ların tümör radyosensitivitesi ile ilişkisi (**Kaynak:** Zhao L et al 2012).

Ayrıca, miRNA'lar dokuya-özü ifade edilir ve doku tipindeki ifadenin değışiklikleri hastalığın prognozu ile ilişkilidir. Bir diğ er deyiş le, miRNA'ların prognostik biyomarker olması için, miRNA ile tümör evresi ve derecesi arasındaki ilişkiyi ilgili dokuda analiz etmek gereklidir. Prostat kanseri geliş imi ve ilerlemesiyle ilişkili olan miRNA'ların ekspresyonu seviyelerinin belirlenmesi, tümör tanısının özgülüğ ünü belirlemede umut vaat etmektedir. Prostat kanseri tedavisinde yeni moleküler belirteçlerin uygulanması ileri evredeki tümörlerin tedavi karar verme sürecinde büyük önem taşımaktadır. Bireyselleştirilmiş onkoloji için hastanın moleküler profilleri tarafından yönlendirilen terapötik seçenekler miR'lerin klinik kullanımı kişiselleştirilmiş bir terapötik yaklaşıma gelecekte gereksinimi karşılayabilir. Hastaların sınıflandırılması prostat kanseri tedavisinde Adjuvant sistemik tedavi, erken kemoterapi, bisfosfonatlar ve hedefe yönelik tedaviler modern terapiyi etkilemesi bekleniyor. Yeni hedeflenmiş tedaviler örneğin; Denosumab, Abiraterone, Sipuleucel-T, androjen reseptörü, MET reseptörü ve anjiyokinaz inhibitörleri gibi yeni hedefli tedaviler, karar verme sürecini destekleyen moleküler biyolojik belirteçlerden büyük fayda sağlayacaktır. Son yıllarda prostat kanserinin hedefe yönelik tedavisi ile ilişkili yapılan araştırmalarda, miRNA'ların rolü aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

2014-2016 yılları arasında İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Kliniğine radyoterapi uygulaması için başvuruda bulunan prostat adenokarsinom tanısı konan 35 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların yaş ortanca değeri 72 (en düşük-en yüksek: 60-87) ve vücut kitle endeksleri ortalama 26.96 (en düşük-en yüksek: 20-35) olarak bulundu. AJCC 2011 TNM evreleme sistemine göre 7'si (%20) T2a evresinde, 7'si (20) T2b evresinde 21'(%60) T2c evresinde idi. NCCN guidline risk grupları değerlendirmesine göre; Hastaların 7si (% 20) düşük risk grubunda (T1-T2a, GS $\leq$ 6 ve PSA <10 ng/ml) , 28 i (%80) orta risk grubunda (T2b-T2c, GS=7, PSA 10-20 ng/ml) yer almaktaydı. Orta risk grubundaki hastalara Radyoterapiden önce neo adjuvan olarak başlayıp RT sırasında ve sonrası adjuvan olarak toplam 6 ay bicalutamide 50 mg (oral) ve LHRH analogu 1,3 ve 6. aylarda subkutan olarak uygulandı. Çalışmada tedavi öncesi ve tedavinin tüm seansları tamamlandıktan sonra rutin tetkikler için alınan kan örneklemeleri esnasındaki tam kanda, iyonize radyasyon ile ilişkisi bilinen hedef miRNA'lerden (miR-34a ve miR-521) ekspresyon düzeyleri ölçümü yapıldı. Tez çalışmasında miR-34a ve miR-521 in nicel analizi için U6 RNA molekülü referans olarak kullanıldı.

3.1. KİMYASAL MADDELER VE MALZEMELER

- Leysin Buffer
- Merkaptoetanol
- İzopropanol
- Distile su
- Blood Wash Buffer
- Etenol
- Elution Buffer
- miRNA-34a ve miRNA-521
- Dilution buffer
- RNase free su

- RT Master Mix
- dNTP
- mir-RT Primer
- MMLV Enzim
- RNA ürün
- ROX
- PCR enhancer
- Taq DNA polimeraz
- cDNA ürün

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

- Santrifüj (Hettich Mikro 200R)
- Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu cihazı (Bio Rad CFX-96)
- Polimeraz zincir reaksiyonu cihazı (Techne)
- Bidistile su üretim cihazı (İncekaralar)
- Otomatik pipetler (Eppendorfresearch: 100-1000 µl, 20-200 µl; Pipetman:P2, P20,P200;Genex Beta: 20-200 µl, 10-100µl)
- -20 °C derin dondurucu (Arçelik)
- -80 °C derin dondurucu (Nuaire)
- Falkon tüp (Greiner)
- Eppendorf tüp (Greiner)
- Çeker ocak

3.3. RADYOTERAPİ TEDAVİSİ

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalara günlük 200 cGy / fraksiyon dozu ile , haftada beş gün olmak üzere toplam 37-39 fraksiyonda eksternal RT uygulandı. Radyoterapi planlaması görüntü eşliğinde Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi (IGRT; Image guided Radiotherapy, IMRT; Intensive Modulated Radiotherapy-) tekniği ile oluşturuldu. Hastalara planlama BT'leri (Bilgisayarlı Tomografi, Siemens Somatom Spirit

Computed Tomography, Erlangen, Almanya) mesane ve rektum hazırlıkları yapıldıktan sonra çekildi. Tedavi sırasında riskli organların korunması açısından mesanenin dolu, rektumun boş olmasına dikkat edildi.

IG-IMRT ile tedavi edilecek hastalar mesane dolu olarak alpha cradle ile sabitlenerek sırtüstü pozisyonda görüntülemeye alındı. BT taraması ile beşinci lomber vertebradan ischial çıkıntıdan yaklaşık 10 cm aşağıya kadar 3 mm dilim kalınlığı ile alındı. BT taramasından sonra, her hastadan pelvik manyetik rezonans (MR) görüntüleme yapıldı. BT ve MR görüntüleri, hedef hacimlerin ve kritik organların belirlenmesi için görüntü füzyonu yapabilen tedavi planlama sistemine aktarıldı (Eclipse, version 10). Füzyon yapılmış BT ve MR görüntüleri kullanılarak prostat hacmi hedef hacim olarak, rektum, mesane, femur başları, ince bağırsaklar ve penil bulp kritik organlar olarak radyasyon onkoloji uzmanı tarafından belirlendi. Hedef volüm olarak gross tümör volümü (GTV) ve klinik hedef volümü (CTV) belirlendi. Gross Hedef Volümü (GTV) prostata hiç marj verilmeden oluşturulurken, Klinik Hedef Hacmi (CTV) GTV hacmine her yönden 1 cm marj verilirken sadece posterior yönden rektum duvarında doz artışını engellemek için 0.5 cm marj verilerek oluşturuldu. Set-up hatalarını ve radyasyon demetinin penumbrasından gelen azalımı dikkate almak içinde Planlanlama Hedef Hacmi (PTV) ise CTV'ye 0.5 cm marj verilerek oluşturuldu. IMRT planlaması için, çizilen planlama BT görüntüleri tedavi planlama sistemine (TPS) aktarıldı (Eclipse, version 10). Radyoterapi tedavisi ; PTV prostat 200 cGy fraksiyon dozu ile 37-39 fraksiyonda 74-78 Gy , PTV seminal vezikül 200 cGy/ 28 frx da 56 Gy ve PTV LAP 200 cGy/23 frx da 46 Gy olarak IMRT tekniği ile uygulandı. Tedavi 6 MV foton enerjisi ile çok yapraklı kolimatör (MLC) sistemine sahip VARIAN UNİQUE LİNAC (Palo Alto, CA, Amerika Birleşik Devletleri) cihazı ile yapıldı (Şekil 5).



Şekil 5. Eksternal Radyoterapi (Varian Unique Linac) Cihazı

Yapılan planların kabulü için hedef hacimlerin ve kritik organların DVH eğrileri değerlendirilip kabul kriterlerinin sağlanması koşulu arandı.

3.4. TAM KANDAN TOTAL RNA ELDESİ

Hastalardan tedavi öncesi ve tedavi sonrası olmak üzere rutin biyokimyasal tetkikler ve miRNA ekspresyon düzeyleri için antikoagülanlı (Etilendiamin tetraasetik asit-EDTA) ve antikoagülanlı kan örnekleri alındı. Antikoagülanlı kan örnekleri 1000xg devirde 20 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Bu örneklerde rutin biyokimyasal analizler otomatik analizörde çalışıldı. EDTA'lı alınan kanlarda miRNA ekspresyon düzeyleri çalışma yapılıncaya kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

3.4.1. Total RNA İzolasyon Yöntemi

Çalışmaya başlamadan önce tüm kan örnekleri buz içine alındı. Tam kan örneklerinden total RNA izolasyonu için spin kolon yöntemine dayalı hazır ticari kitler kullanılarak yapıldı (Cat. no: PP-210S; Jena Bioscience Building Blocks of Life, Thüringen, Almanya) (Tablo 2).

Tablo 2. RNA İzolasyonu Yönteminin Akışı

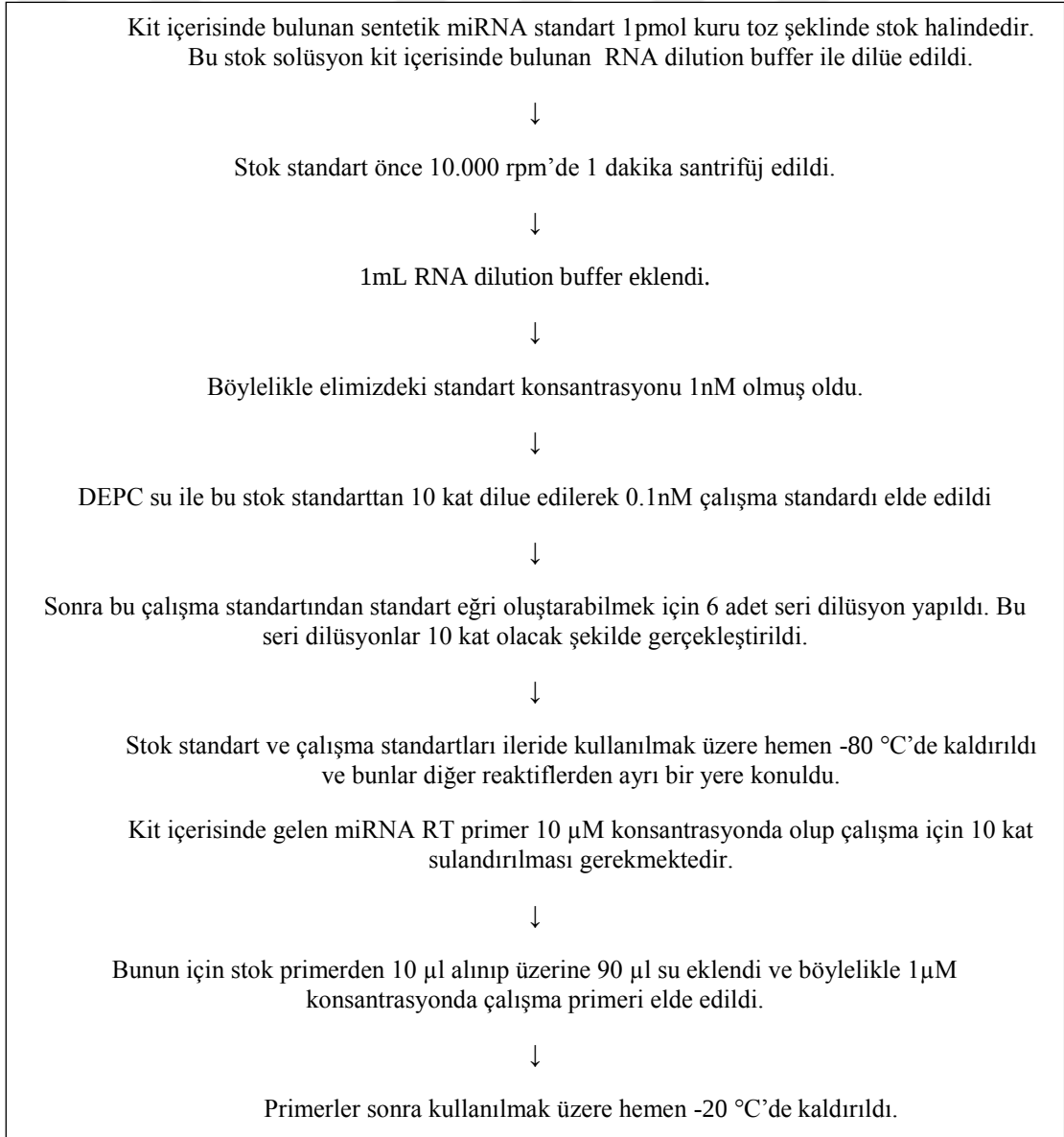


3.5. miRNA RT-PCR REAKSİYONU

3.5.1. miRNA Ekspresyon Düzeyleri Analizi

Total RNA izolasyonu yapılan tüm örneklerin RNA konsantrasyonları ve saflıkları Thermo Scientific Nanodrop 2000 cihazı ile ölçüldü. 1µl RNA örneği alınıp cihaza konularak konsantrasyon miktarı ve 260/280 ve 260/230 oranlarına bakılarak saflıkları belirlendi. Total RNA elde edilen örneklerin cDNA işlemi için ticari miRNA Real Time RT-PCR detection kiti kullanıldı (Cat No: **miRNA-34a CPK1055 ve miRNA-521 CPK2381**; Cohesion Biosciences, Londra, İngiltere). Bütün işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi (Tablo 3-5).

Tablo 3. miRNA RT-PCR Reaksiyonu



Tablo 4. miRNA RT primer hazırlanması

Kit içerisinde gelen miRNA RT primer 10 μ M konsantrasyonda olup çalışma için 10 kat sulandırılması gerekmektedir.
↓
Bunun için stok primerden 10 μ l alınıp üzerine 90 μ l su eklendi ve böylelikle 1 μ M konsantrasyonda çalışma primeri elde edildi.
↓
Primerler sonra kullanılmak üzere hemen -20 °C’de kaldırıldı.

Tablo 5. cDNA Sentezi Reaksiyon Bileşenleri. Toplam hacim 20 μ l olacak şekilde reaksiyon örnek başına aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek
RNAse free su	11.85 μ l
5X RT Master Mix	4 μ l
dNTP (10 μ M)	0.75 μ l
mir-RT Primer (1 μ M)	1.20 μ l
MMLV Enzim (200U/ μ l)	0.2 μ l
RNA ürün	2 μ l

*Bileşenler: Mg²⁺, dNTP’ler ve primerler

Enzim eklemeyen önce tüpe konulan tüm reaktifler birkaç kez pipet ile karıştırıldı

Tüm reaktifler ve örnek tüpe konulduktan sonra tüpler Bio-Rad termal cycles cihazına (CA, USA) konularak cDNA reaksiyonu aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirildi.

25 °C → 30 dakika

42 °C → 30 dakika

85 °C → 5 dakika

Bu süre sonunda elde edilen ürün -20 °C’de saklandı.

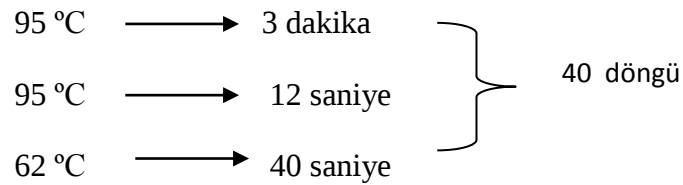
3.5.2. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Kantitatif Real Time PCR Reaksiyonu aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi. CohesionBioscience (Cat No: **miRNA-34a CPK1055** ve **miRNA-521 CPK2381**, Londonra, İngiltere) firmasının microRNA Real Time RT-PCR Detection kiti kullanıldı (Tablo 6). Yine tüm işlemler buz üzerinde yapıldı. Şekil 6 ve 7 sırasıyla mir-34 a ve mir-521 için standart eğri grafiği ve örnek değerleri grafikte belirtilmiştir.

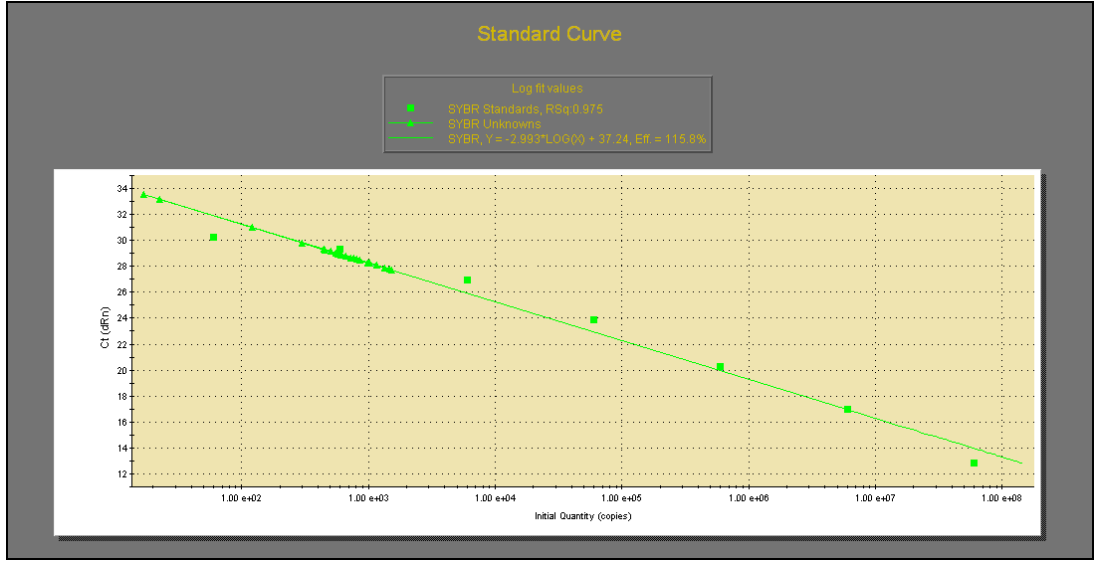
Tablo 6. Real Time PCR Reaksiyonu Bileşenleri. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon örnek başına aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

Real Time PCR Reaksiyonu Bileşenleri	1 Örnek
distile su	5.5 µl
2X Real Time Master Mix	10 µl
Primer	0.4 µl
ROX (50 kat sulanmış)	0.4 µl
PCR enhancer	1.5 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.2 µl
cDNA ürün	2 µl

Daha sonra 96 wellplate içine konulan standart ve örnek karışımları Agilent Stratagene 3005P cihazına konularak reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

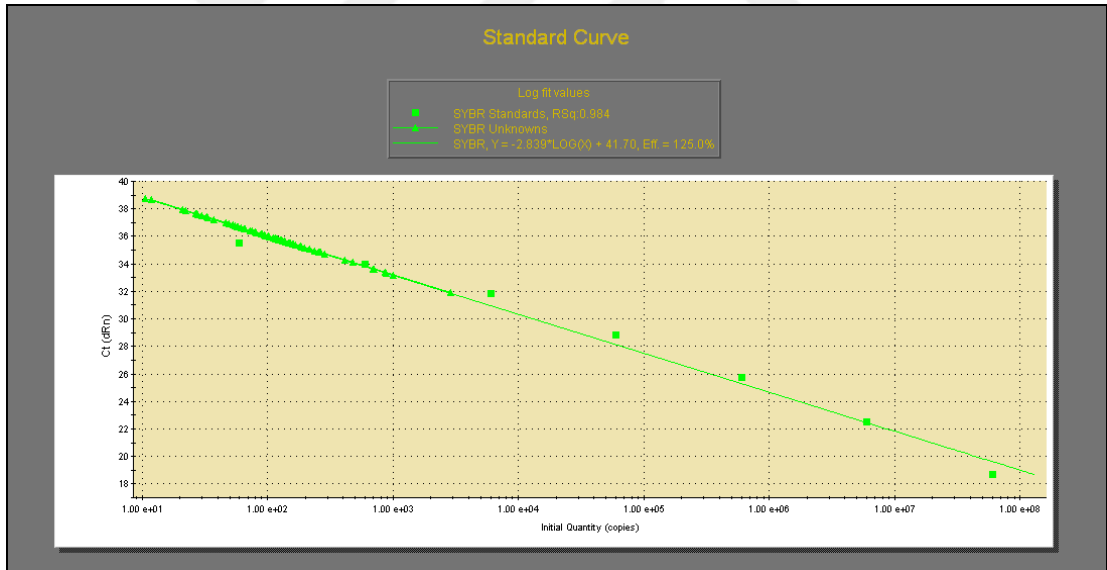


Cihaz üzerinde SYBR gren deteksiyon seçildi ve detection step olarak 62 °C belirlendi. Şekil 8 ve 9 sırasıyla mir-34 a ve mir-521 için amplifikasyon grafiği eğrileri örnek değerleri grafikte belirtilmiştir. Küçük nükleer U6 RNA molekülü kontrol molekül olarak kullanıldı.



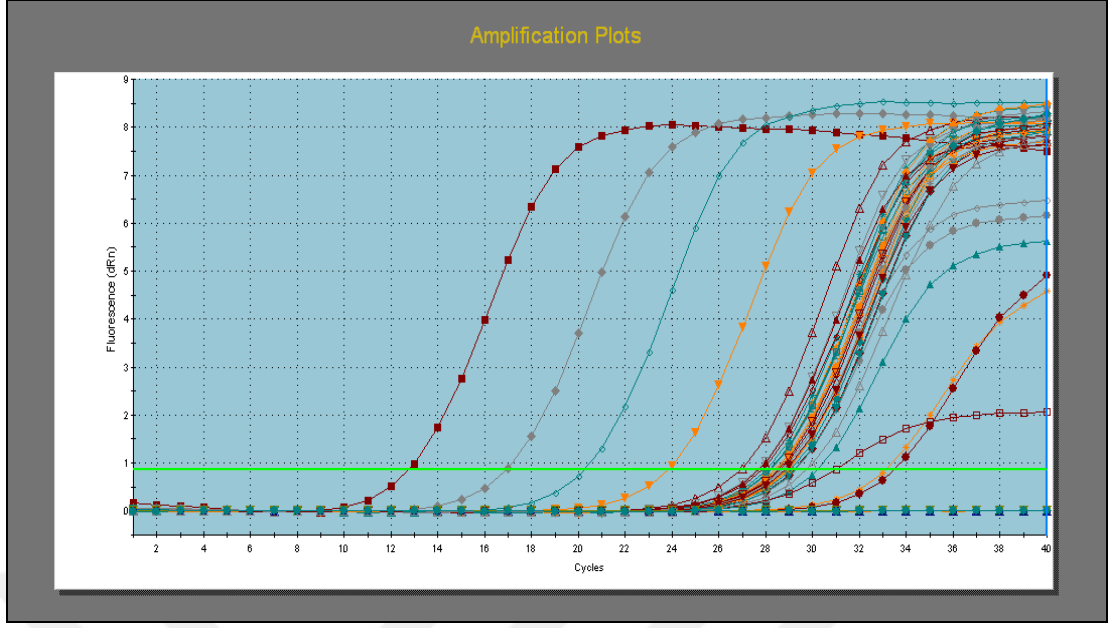
Şekil 6. mir-34 a için standart eğri grafiği ve örnek değerleri grafikte belirtilmiştir.

Kare ile olanlar standart değerler. Üçgen olanlar ise örnek gruplarıdır.

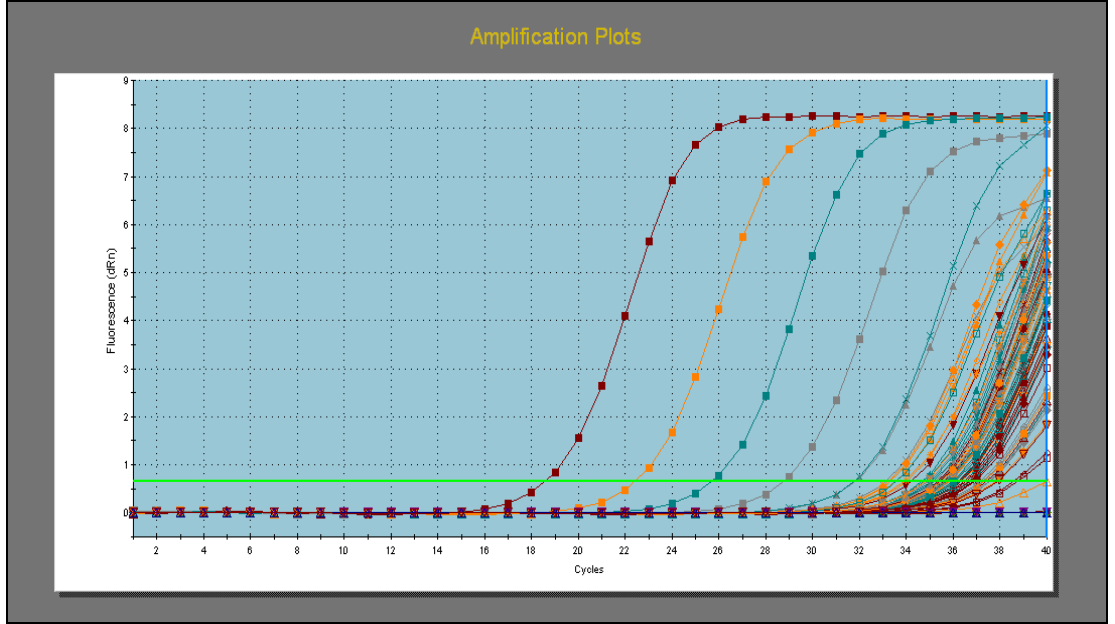


Şekil 7. mir-521 için standart eğri grafiği ve örnek değerleri grafikte belirtilmiştir.

Kare ile olanlar standart değerler. Üçgen olanlar ise örnek gruplarıdır.



Şekil 8. mir-34 a Amplifikasyon grafiği yukarıda gösterilmiştir.



Şekil 9. mir-521 Amplifikasyon grafiği yukarıda gösterilmiştir.

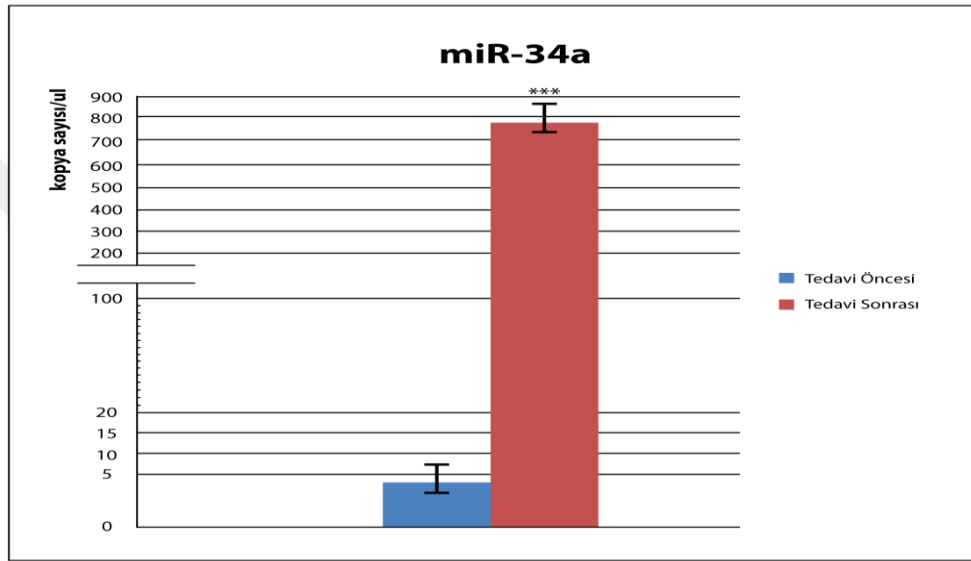
Real time sonrası standart eğriye göre her bir örneğin kopya sayıları belirlendi. Hazırlanan z çalışma standartından 0.1 μ M sentetik RNA' nın kopya sayısı 6×10^7 olup örneklerin kopya sayıları standart eğriye göre sistemin bilgisayarında hesaplandı.

3.6. İSTATİKSEL ANALİZ

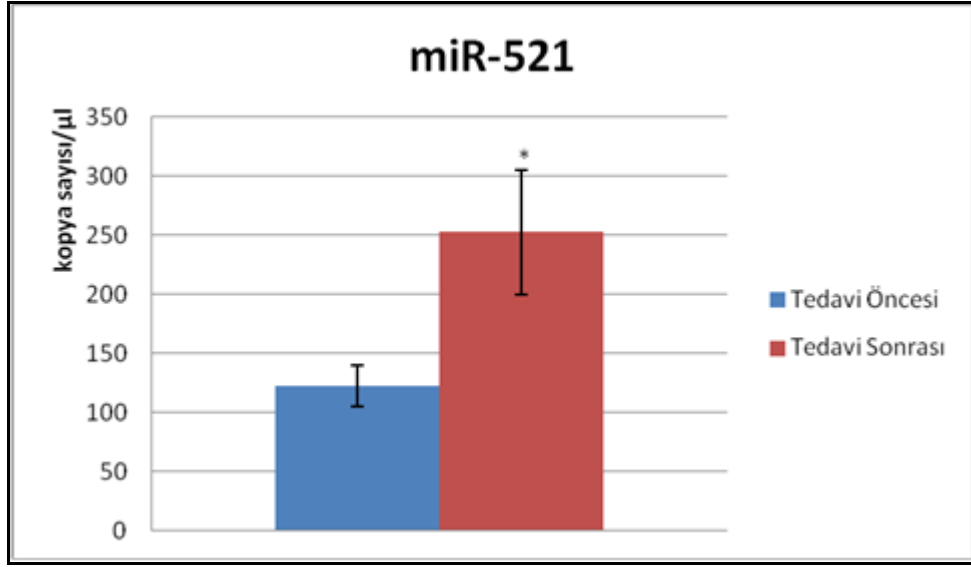
Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 17.0 (Statistics Package of Social Science, Chicago, IL, USA) istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Kategorik ölçümler sayısal olarak ortalama ve standart sapma (en düşük-en yüksek değerler) olarak verildi. Tedavi öncesi ve sonrası iki grup arasında rutin biyokimyasal analiz değerleri ve miRNA ekspresyon düzeyleri açısından fark olup olmadığını belirlemek için eşleştirilmiş örneklem t- testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. miRNA ekspresyon düzeyleri ile biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile yapıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi $p \leq 0.05$ alındı.

4. BULGULAR

Çalışmaya radyoterapi uygulaması uygulanan adenokarsinom prostat kanserli 35 hasta dahil edildi. Hastaların yaş ortancı değeri 72 (en düşük-en yüksek: 60-87), vücut kitle endeksleri ortalama 26.96 (en düşük-en yüksek: 20-35) olarak bulundu. Şekil 10 ve 11 gösterildiği üzere, mir34a ve mir-521 ekspresyon düzeylerinin tedavi sonrası grup da anlamlı olarak yüksek olduğu belirtildi ($p=0.001$ ve $p=0.028$).



Şekil 10. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-34a ekspresyon değerleri (ortalama±standart hata)



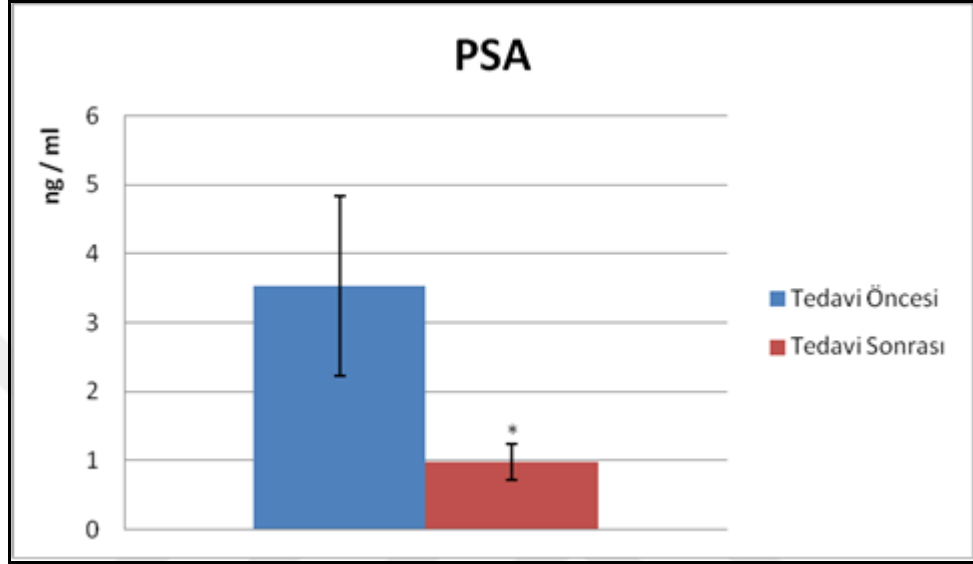
Şekil 11. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-521 ekspresyon değerleri (ortalama±standart hata)

Biyokimyasal parametreler incelendiğinde üre, ürik asit, kreatinin, total kolesterol, triglisirin, sedimantasyon, HDL kolesterol, LDL kolesterol, AST, ALT, γ -GT, LDH, ALP, total protein, albümin, kalsiyum, fosfor, sodyum, magnezyum, potasyum, amilaz, kan şekeri, CRP ve testosteron değerleri tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplarda anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 7).

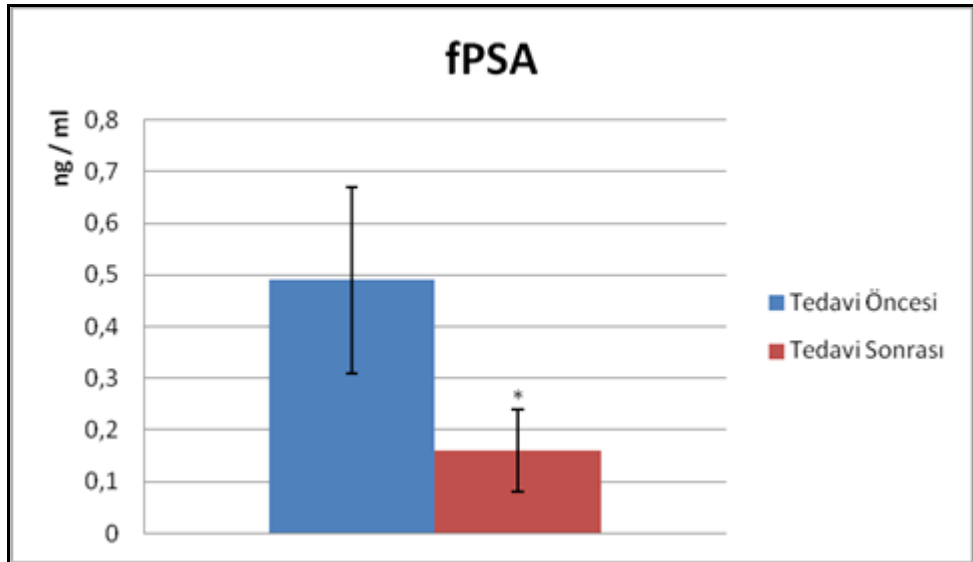
Tablo 7. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların biyokimyasal parametre değerleri (ortalama±standart sapma)

Parametre	Tedavi Öncesi (M±SD)	Tedavi Sonrası (M±SD)	p
Üre (mg/dl)	30.86±7.81	32.14±6.51	0.518
Ürikasit (mg/dl)	4.09±1.43	4.38±1.57	0.423
Kreatinin (mg/dl)	0.86±0.17	0.85±0.10	0.787
Total kolesterol (mg/dl)	226.33±8.02	228.67±17.16	0.711
Trigliserid (mg/dl)	86.67±18.50	90.33±40.00	0.835
HDL Kolesterol (mg/dl)	54.00±6.08	54.67±6.51	0.742
LDL Kolesterol (mg/dl)	155.33±9.87	155.93±16.26	0.928
AST (U/l)	24.77±8.75	22.85±4.65	0.273
ALT (U/l)	27.67±18.09	21.83±7.90	0.141
GGT (U/l)	21.78±7.63	22.11±5.58	0.744
LDH (U/l)	186.78±22.15	196.20±27.55	0.304
ALP (U/l)	77.64±30.99	83.09±26.70	0.112
Total Protein (gr/dl)	7.17±0.27	7.04±0.38	0.217
Albumin (gr/dl)	4.25±0.31	4.13±0.30	0.082
Kalsiyum (mg/dl)	9.37±0.36	9.39±0.43	0.998
Fosfor (mg/dl)	3.08±0.62	3.15±0.72	0.423
Sodyum (mmol/l)	140.46±2.73	141.23±1.54	0.361
Magnezyum(mg/dl)	1.96±0.13	1.92±0.09	0.087
Potasyum (mmol/l)	4.37±0.54	4.54±0.49	0.389
Amilaz (U/l)	80.67±45.52	76.33±39.07	0.423
Sedimentasyon (mm)	28.75±18.24	52.50±41.02	0.298
Kan Şekeri (mg/dL)	111.83±36.09	107.08±24.70	0.483
CRP (mg/l)	1.44±0.92	1.40±0.93	0.377
Testosteron(ng/ml)	137.70±80.46	93.81±72.40	0.355

Diğer yandan tedavi sonrası grup da Total PSA ve Serbest PSA değerlerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0.05$) (Şekil 12 ve 13).



Şekil 12. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların PSA değerleri (ortalama±standart hata)



Şekil 13. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların serbest PSA değerleri (ortalama±standart hata)

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplarda tam kan sayımı değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında eritrosit sayısı, trombosit sayısı, MCH, MCHC, RDW, eozinofil, bazofil, monosit, MPV ve RDW değerlerinin anlamlı olarak değişmediği tespit edildi ($p>0.05$) (tablo 8).

Tablo 8. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların tam kan sayımı değerleri (ortalama±standart sapma)

Paremetreler	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	p
Lökosit ($10^3/\text{mm}^3$)	7.02±2.02	5.51±1.11	0.012
Eritrosit ($10^6/\text{mm}^3$)	4.84±0.36	4.62±0.59	0.065
Hemoglobin (g/dl)	14.45±0.97	13.37±1.53	0.029
Hematokrit (%)	43.07±2.87	39.95±4.47	0.037
Trombosit (mm^3)	256.353±61.977	231.706±70.826	0.069
MCV (fl)	88.41±2.89	90.07±3.01	0.046
MCH (pg)	29.48±1.40	29.97±1.53	0.160
MCHC (g/dl)	33.58±0.98	33.50±0.95	0.609
RDW (%)	15.32±1.71	14.78±1.81	0.251
Nötrofil (%)	60.93±8.09	50.58±5.89	0.006
Lenfosit (%)	23.19±7.84	17.08±3.84	0.007
Eozinofil (%)	0.17±0.10	0.20±0.15	0.696
Monosit (%)	3.43±0.98	4.96±1.56	0.062
Bazofil (%)	0.65±0.30	0.74±0.40	0.448
MPV (fl)	8.90±3.06	8.31±2.68	0.081
PCT (%)	0.23±0.09	0.19±0.08	0.044
PDW (%)	16.76±1.02	16.30±0.91	0.152

Buna rağmen tedavi sonrası tedavi öncesi gruplara göre lökosit sayısı, hemoglobin, hemotokrit, nötrofil, lenfosit ve PCT değerlerinin istatistiksel olarak azaldığı saptandı ($p=0.012$, $p=0.029$, $p=0.037$, $p=0.006$, $p=0.007$, $p=0.044$).

Tedavi sonrası grupta MCV değerlerinin istatistiksel olarak arttığı belirlendi ($p=0.046$).

mir34a ile biyokimyasal parametreler arasında korelasyon varlığı olup olmadığı Pearson Korelasyon analizi ile yapıldı. Tedavi öncesi grupta mir34a ile sedimantasyon arasında pozitif bir korelasyon olduğu görüldü. ($r=0.792$, $p=0.006$) (Tablo 9). mir34a'nın Serbest PSA ile arasında pozitif bir korelasyon saptandı. ($r=0.488$, $p=0.041$). Tedavi sonrası grupta mir34a ve mir521 ekspresyon düzeyleri ile total protein ve magnezyum değerleri arasında negatif bir korelasyon olduğu görüldü ($r=-0.495$, $p=0.016$; $r=-0.681$, $p=0.010$). mir521 ekspresyon düzeyleri ile kolesterol değerleri arasında negatif bir değer olduğu görüldü. ($r=-0.683$, $p=0.037$). Tedavi öncesi grupta mir34a ile PCT arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edildi ($r=-0.449$, $p=0.041$) (tablo 10).

Tablo 9. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-34a ve miR-521 ekspresyon değerleri ile biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon değerleri

Parametre	Tedavi Öncesi miR-34a	Tedavi Öncesi miR-521	Tedavi Sonrası miR-34a	Tedavi Sonrası miR-521
Üre (mg/dl)	0.435	0.124	-0.281	-0.248
Ürikasit (mg/dl)	-0.001	0.671	-0.050	-0.171
Kreatinin (mg/dl)	0.208	0.124	-0.163	0.082
Total Kolesterol (mg/dl)	0.525	-0.243	-0.049	-0.633*
Trigliserid (mg/dl)	-0.250	0.265	-0.127	-0.070
HDL-Kolesterol (mg/dl)	0.522	-0.378	0.328	-0.516
LDL-Kolesterol (mg/dl)	0.579	-0.278	-0.153	-0.572
AST (U/l)	0.221	-0.073	0.236	0.070
ALT (U/l)	0.358	-0.078	0.257	0.064
GGT (U/l)	0.013	0.071	0.011	-0.188
LDH (U/l)	-0.187	0.419	-0.152	0.187
ALP (U/l)	0.207	-0.175	0.200	-0.088
Total Protein (g/dl)	0.301	-0.163	-0.495*	-0.279
Albumin (g/dl)	-0.056	0.139	-0.219	0.107
Kalsiyum (mg/dl)	0.017	0.017	-0.230	-0.160
Fosfor (mg/dl)	-0.190	-0.590	-0.036	-0.158
Sodyum (mmol/l)	-0.314	-0.266	0.333	0.271
Potasyum (mmol/l)	0.128	-0.335	0.112	0.054
Magnezyum (mg/dl)	-0.501	-0.318	-0.681*	-0.123
Total PSA (ng/ml)	0.011	-0.248	-0.413	-0.174
Serbest PSA (ng/ml)	0.488*	-0.074	-0.551	-0.253
Testosteron (ng/ml)	-0.473	-0.425	-0.107	0.134
Sedimentasyon (mm)	0.792**	0.148	0.185	-0.272
Amilaz (U/l)	-0.056	-0.239	-0.094	-0.351
CRP (mg/l)	0.048	-0.255	0.088	-0.267

Tablo 10. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-34a ve miR-521 ekspresyon değerleri ile tam kan sayımı parametreleri arasındaki korelasyon değerleri

Parametre	Tedavi Öncesi miR-34a	Tedavi Öncesi miR-521	Tedavi Sonrası miR-34a	Tedavi Sonrası miR-521
Lökosit (10 ³ /mm ³)	-0.070	-0.003	0.138	0.063
Eritrosit (10 ⁶ /mm ³)	-0.114	0.169	-0.174	0.002
Hemoglobin (g/dl)	0.087	0.175	-0.368	-0.164
Hematokrit (%)	-0.065	0.303	-0.303	-0.221
Trombosit (mm ³)	-0.361	-0.221	0.173	-0.050
MCV (fl)	0.135	0.102	0.138	-0.204
MCH (pg)	0.115	-0.135	-0.104	-0.071
MCHC (g/dl)	0.143	-0.123	-0.253	0.117
RDW (%)	-0.043	-0.264	-0.354	-0.210
Nötrofil (%)	0.338	-0.094	0.393	-0.003
Lenfosit (%)	-0.357	0.178	-0.415	0.128
Eozinofil (%)	-0.383	-0.382	0.198	0.255
Monosit (%)	-0.275	0.093	0.320	-0.101
Bazofil (%)	0.002	-0.094	-0.308	-0.085
MPV (fl)	-0.202	0.511	0.100	-0.022
PCT (%)	-0.449*	-0.071	0.178	-0.057
PDW (%)	0.094	0.044	-0.425	0.022

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Geleneksel radyoterapi doğrudan hücrelerde DNA, lipit ve protein moleküllerine hasar verir. İyonize radyasyonun oluşturduğu hasarın çoğu ve sitotoksitesi reaktif oksijen türlerindeki artıştan kaynaklanır. Kanseri hücreleri antioksidan sistem proteinlerinin yüksek olmasından dolayı iyonize radyasyona dirençlidirler. Prostatik tümör dokularda radyoterapiye yanıtında farklı proteinlerin ekspresyon düzeyleri önemli rol alır. Hücresel radyasyon direnci radyoterapinin etkinliğinin yetersizliği kritik bir rol oynar. İyonize radyasyonaun neden olduğu DNA hasarı ve radyasyona yanıtta çeşitli miRNA'ların önemli bir rol oynadığı üstlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda prostat kanseri tedavisinde miRNA ekspresyon düzeyleri değiştiği gösterilmiştir. Prostat kanseri hücre hatlarında iyonize radyasyon ile miRNA ilişkisi gösterilmiştir. Literatürde prostat kanserinde radyoterapinin miRNA ekspresyon düzeylerine olan ilişkilerini incelendiği çok sınırlı çalışma mevcuttur. Tez çalışmamızda, adenokarsinom prostat kanserli hastalarda radyoterapi uygulamalarında tedavinin etkinliğinin belirlenmesinde aday olan mir-34a ve mir-521 ekspresyon düzeyleri ile birlikte biyokimyasal parametreleri radyoterapi öncesi ve sonrası değişiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada, prostat kanserli hastalarda miR-34a ve miR-521 'in iyonize radyasyona yanıtını miRNA'lar üzerinde gösterildi. Ayrıca prostat kanseri olan hastalarda radyasyon tedavisi öncesi ve sonrası, miR-34 ve miR-521'in ekspresyon düzeyleri, PSA ve fPSA düzeyleri ve bazı biyokimyasal parametrelerin araştırılması yapıldı. İyonize radyasyon, kanser tedavisinde kullanılan 3 temel yöntemden biridir. Radyasyonun indüklediği DNA hasarında, hasar onarılmazsa kanser hücreleri apoptoza ve hücre döngüsü durur. Bazı kanser hücreleri, ErbB, nükleer faktör κB (NF κB), MAPK, PI3K / AKT ve transforman büyüme faktörü- β (TGF- β) sinyal yolları dahil olmak üzere bu hasarlara karşı koyan kompleks sinyal yollarının aktivasyonu nedeniyle radyasyon tedavisine dirençlidir. Radyasyonla ilişkili bazı miRNA'lar, radyasyona tepki sinyal yolunu modüle ederek kanser hücrelerinin radyasyona duyarlılığına katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. miRNA'lar genellikle hedef genleri tarafından biraz bastırılmış olduğundan, tek bir miRNA'nın değişimi biyolojik bir işlevi yerine getirmek için yetersizdir. Hücresel radyasyon direnci radyoterapinin başarısızlığında

kritik bir rol oynamaktadır. Çeşitli miRNA'ların radyasyon yanıtında ve iyonize radyasyonun neden olduğu DNA hasarında rol oynadığı bilinmektedir. Çeşitli çalışmalarda prostat kanserinde radyasyon yanıtının miRNA'ların rollerini araştırılmıştır (Runkle et al 2012, Zhao et al 2012, Zhao et al 2013). MiRNA'ların gen susturucuları olarak işlev gördüğü bilinmektedir ve bunlar, apoptoz, hücre döngüsü ve çeşitli kanser türlerinde metastazı dahil olmak üzere biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Prostat kanserinde bu kapsamlı miRNA profillerinde bazı miRNA'nın prostat kanseri dokusunda ve komşu normal dokularda farklı şekillerde eksprese edilmesi prostat kanserinin ilerlemesinde katkı sağlar. İyonize radyasyona bağlı miRNA'ların ekspresyon seviyeleri, prostat kanserinde genellikle düzensizleşir. miRNA'ların bazı ifadeleri radyasyon direnci veya radyasyona duyarlılık nedeniyle artar veya azalır. Bu durumda miRNA'lar prostat kanserinde radyoterapinin etkinliğinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Dolayısıyla, miRNA'ların fonksiyonunun anlaşılması, birçok kanser türünün klinik tedavisi için pratik yarar sağlamaktadır. Kanser tedavisinin sonucunun tahmininde, miRNA'ların en umut verici uygulamalar olabilir. Literatürde, prostat kanseri hücre hatları miRNA profillerinde meydana gelen değişiklikler hakkında bazı bilgiler olmasına rağmen, insan çalışmaları çok sınırlı sayıdadır. Tümör baskılayıcı p53 geni, birkaç miRNA'nın ekspresyonunda önemli bir rol oynamaktadır. miR-34a, hücresel süreçleri (hücre döngüsünde durma ve apoptoz gibi) kontrol eden p53'ün regüle ettiği genlerin ekspresyonun düzenlenmesinde, p53'ün bağlandığı ve transkripsiyonun aktive edildiği gösterilmiştir (He et al 2007, Hermeking 2007, Hermeking 2010, Morgan 2010). Ancak, Aryankalayil ve ark. yaptığı çalışmada LNCaP hücrelerindeki miR-34a'nın bazal düzeyinin RWPE-1 hücreleriyle karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olduğu gösterildi. Bu iki hücre tipinin tekli veya çoklu fraksiyonları radyasyona yanıtlarında önemli derecede farklılık göstermektedir. RWPE-1'de, fraksiyonlanmış radyasyona maruz kalan hücrelerde miR-34a ekspresyonu azalırken, LNCaP hücrelerinde miR-34a ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Bu veriler doğrultusunda, bazal miR-34a seviyelerinin radyasyona yanıtında miRNA ekspresyonunun tek başına p53 tarafından regüle edilmediğini gösterilmiştir. Radyasyonun, prostat kanserinde miR-17-92a kümeleri ve let-7 ailesinin ekspresyon düzeylerini azalttığı bilinmektedir. Yapılan sinyal yolu

ile ilgili analizlerde, hedef genlerin radyasyona yanıt sinyal yolları açıklanmaya çalışılmıştır. Günlük fraksiyonlarda verilen radyasyon tek doz radyasyona kıyasla daha fazla sayıda miRNA ekspresyon düzeylerini değiştirmekte, özellikle miR-34a ve let-7 miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (John-Aryankalayil M ve ark. 2012). Aryankalayil ve arkadaşları radyasyona duyarlı LNCaP (p53 pozitif) ve PC3 (p53-null) hücrelerinde tümör süpresörü miR-34a ve let-7 miRNA'ların fraksiyonel radyasyonla yukarı doğru düzenlendiğini ve radyasyonla uyarılmış miRNA ekspresyonunun yalnızca p53 tarafından düzenlenemeyeceği bildirmiştir. Çalışmaların bulgularına göre, parçalanmış radyasyonun moleküler hedefleri ve radyasyonla uyarılan miRNA'ları indüklemek için kullanılma potansiyelinin, radyasyona duyarlılığı öngörmede önemli bir rolü olabileceği gösterildi (John-Aryankalayil M ve ark. 2012). MiRNA'lar, radyasyona bağlı biyolojik yollardaki çeşitli faktörleri düzenler ve tümör hücrelerinin radyasyon duyarlılığını etkiler. Radyasyon ile tedavi edilen PC3 hücrelerinde miR-9, miR-22 ve miR-30a'nın ekspresyon düzeylerinin azaldığını bildirmiştir (Li BMD et al 2011). Porkka ve ark. prostat kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarda, prostat kanseri için spesifik miRNA'ların profilini sistematik bir şekilde gösterdiler (Porkka et al 2007).

Birçok çalışmada, prostat kanseri progresyonuna katkıda bulunan let-7 ailesi, miR-1, -20a, -21, -34a, -106b ve -521 dahil olmak üzere prostat kanseri progresyonuna katkıda bulunan yüksek verimli bir yaklaşım kullanarak birçok disfonksiyonel miRNA'yı tespit etti (Li et al 2009, Sylvestre et al 2007, Jasson et al 2008, Fujita et al 2008). Çeşitli çalışmalarda bu disfonksiyonel miRNA'ların prostat kanseri tedavisi geliştirme rolünü araştırmış olsa da, prostat kanserinde radyasyon yanıtında miRNA'ların rollerini belirleyen çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. miR-521'in upregülasyonu, DNA onarım proteini, Cockayne sendromu proteini A'yı spesifik olarak hedefleyerek radyasyon hasarına olan cevabı azalttığı belirtilmiştir (Jasson et al 2008). Bu çalışmada, radyoterapi sonrası PCa'lı hastada miR-34a ve miR-521 ekspresyon düzeylerinin arttığını bulunmuştur. miRNA ekspresyon seviyeleri açısından radyoterapi öncesi ve sonrası iki grup arasında anlamlı bir farklılık tespit edildi, ancak bazı bireylerde bireysel farklılıkların çok önemli bir değişime uğradığı gözlemlendi. Bu durum, radyoterapinin ve bu miRNA'ların bireysel yanıtta rol oynayan

sinyal mekanizmaları arasındaki ilişkiden kaynaklanıyor olabilir. Bu çalışmada, radyoterapiden sonra PSA ve fPSA düzeylerinde azalmanın, radyoterapinin etkinlik ile yakından ilişkili olduğu gerçeği ile açıklanabilir. Kemik iliği sisteminin ve kan hücrelerinin iyonize radyasyon hasarına son derece duyarlı olduğu bilinmektedir. Ayrıca, iyonlaştırıcı radyasyonun proteinler, lipidler gibi biyomoleküllerde fizikokimyasal değişikliklere neden olmaktadır. Protein ve lipid moleküllerinde çapraz bağlanma, konformasyonel ve konsantrasyon değişiklikleri oluşur. Çalışmamızda, tedavi öncesi ve sonrası gruplarda protein düzeylerindeki değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. Bu durumun bireysel farklılıklardan ve sınırlı hasta sayısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamızda, total kolesterol seviyeleri ile miR-521, magnezyum ve total protein seviyeleri ile miR-34a ekspresyon düzeyleri arasında radyoterapi uygulamalarından sonra anlamlı korelasyon olduğu görüldü. Bu parametrelerin iyonize radyasyona maruziyetinde metabolizmadaki bazı biyokimyasal süreçlerin etkilenmesinden kaynaklanıyor olabilir. Birçok çalışmada, iyonize radyasyonun kemik iliği ve çeşitli dokuları etkilediği bilinmektedir. Kemik iliğinde görülen radyasyona maruziyette hematopoetik aktivitede azalma, kan hücrelerinin sayısının azalması ve pıhtılaşma mekanizmasının bozulması ile açıklanabilir bir durumdur. Elde edilen veriler doğrultusunda, bu çalışmada lökosit, nötrofil, lenfosit sayıları, hemoglobin, hematokrit ve PCT'nin azalmış olduğu görüldü.

miRNA'larındaki ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler, iyonize radyasyonun tümör hücreleri üzerindeki etkileri ile ilgili birçok mekanizmanın hücresel süreçlerde yer alan çeşitli faktöre bağlı olduğu tespit edilmiştir. Radyoterapinin etkinliğini ve hastanın sağ kalımının belirlenmesinde, bu miRNA seviyelerinin bu mekanizmalardaki rolleri daha ayrıntılı moleküler mekanizmaları içeren çalışmalar yapılarak desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

Bolla M1, van Poppel H, Collette L, van Cangh P, Vekemans K, Da Pozzo L, de Reijke TM, Verbaeys A, Bosset JF, van Velthoven R, Maréchal JM, Scalliet P, Haustermans K, Piérart M. (2005) Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy: a randomized controlled trial.(EORTC trial 22911). Lancet, 366: 572-578.

Cannistraci A, Di Pace AL, De Maria R, Bonci D. (2014) MicroRNA as new tools for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention: results from clinical data set and patients' samples. BioMed REsearch Int. 2014: 4 -7

Carroll PR, Parsons JK, Andriole G, Bahnson RR, Barocas DA, Catalona WJ, Dahl DM, Davis JW, Epstein JI, Etzioni RB, Giri VN, Hemstreet GP 3rd, Kawachi MH, Lange PH, Loughlin KR, Lowrance W, Maroni P, Mohler J, Morgan TM, Nadler RB, Poch M, Scales C, Shanefelt TM, Vickers AJ, Wake R, Shead DA, Ho M. (2014). Prostate cancer early detection. Featured updates to the NCCN Guidelines. J Natl Compr Canc Netw. Sep;12(9):1211-9

Cellini F, Morganti Alessio G, Genovesi D, Silvestris N, Valentini V. (2014). Role of microRNA in response to ionizing radiations: evidences and potential impact on clinical practice for radiotherapy received. Molecules, 19:5379-5401.

Chen F, Hu SJ. (2011) Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: a review. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology: 26(2), 79-86.

Çal Ç, Şimşir A. (2005) Prostate Kanseri Hücrelerinde Androjen Baskılama Tedavisinde Direnç Gelişiminin Mekanizmaları, Türk Üroloji Dergisi:31(1). 21-30.

Çelik Aşçı D, Koşar Aslan P, Özçelik N. (2013) MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. S.D.A. Tıp Fakültesi Dergisi 2013: 20 (13), 121-127.

Ersoy Tunalı N, Tiryakioğlu O. (2010). Kanserde mikroRNA'ların rolü, Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30(5):1690-1700.

Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. (2008): Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. Biochem Biophys Res Commun 377: 114-119.

Güzel E. (2013). Prostat Kanseri Hastalarının Prostat Sekeresyon Sıvılarından Mirna Eldesi ve Mikroarray Yönetimi İle Mirna Ekspresyon Profillerinin Karşılaştırılması. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. M Özen).

Haberal İ, Oğul H. (2014). Prostat kanseri ilintili mikrorna kümelerinin tespiti. 22nd Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU 2014): Trabzon; 23/04/2014 - 25/04/2014.

He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. Nature, 447(7148):1130–1134.

Hermeking H. (2007). p53 enters the microRNA world. Cancer Cell; 12(5):414–418.

İşler O. (2012). Primer Prostat Kanseriine Bağlı Kaspaz-2 Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi, S. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya (Danışman: Yrd. Doç. Dr. H Cingilli Vural).

John-Aryankalayil M, Palayoor ST, Makinde AY, Cerna D, Simone CB, Falduto MT, Magnuson SR, Coleman CN. (2012). Fractionated radiation alters oncomir and tumor suppressor miRNAs in human prostate cancer cells. Radiat Res 178: 105-117, 2012.

Josson S, Sung SY, Lao K, Chung LW, Johnstone PA. (2008). Radiation modulation of microRNA in prostate cancer cell lines. Prostate 68: 1599-1606.

Karagün ŞB, Antmen B, Şaşmaz İ, Kılınç Y. (2014). Mikro RNA ve kanser. Türk Klinik Biyokimya Dergisi:12(1):45-56.

Kordan Y. (2010). Metastatik prostat kanserinde hormonal tedavi, Türk Üroloji Semineri 2010; 1:195-200.

Kutlu Ö, Köksal İT. (2012) PSA etkinliğini artırıcı çabalar: PSA dansitesi, PSA hızı, yaşa özgü PSA, serbest ve kompleks PSA, Türk Üroloji Semineri 2012;3:55-60.

Li BMD, Shi XB, Nori D, Clifford KSC, Chen MA, Valicenti R, de Vere WR. (2011). Down-regulation of microRNA 106b is involved in p21-mediated cell cycle arrest in response to radiation in prostate cancer cells. Prostate 71: 567-574.

Li T, Li D, Sha J, Sun P, Huang Y. (2009). MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apo ptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 383: 280-285.

Morgan WF. (2010). Communicating non-targeted effects of ionizing radiation to achieve adaptive homeostasis in tissues. *Curr Mol Pharmacol*; 4, 135-140.

Mottet N, Bellmunt J, Briers E, Bolla M, Cornford P, De Santis M, Henry A, Joniau S, Lam T, Mason MD, Matveev V, van der Poel H, van der Kwast TH, Rouvière O, Wiegel T. (2016). EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. *Eur Urol* 2016.

NCCN Guidelines Version 2.2017 for Prostate Cancer.

Özcan E. (2013). Prostat Kanseriyle İlişkilendirilmiş Tümör Baskılayıcı Genlerin Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi İle Metilasyon Paternlerinin Belirlenmesi. P.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Denizli, (Danışman: Prof. Dr. G Bağcı, 2. Danışman: Doç. Dr. E Tepeli).

Özdemir Y. (2012). Prostat Kanseri Hastalarında Tedavi Sonuçlarımızın Değerlendirilmesi, H.ü. Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara (Danışman: Prof. Dr. F Akyol).

Özel R. (2006). Prostat Kanseri Hastalarında Glutasyon S-Transferaz P1 Geninin İle 105 Val Polimorfizminin ve Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Araştırılması, E.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir (Danışman: Yrd. Doç. Dr. Buket Kosova).

Parker, C, Gillessen, S, Heidenreich, A, Horwich. (2015) Cancer of the prostate: esmo clinical practice guidelines. *Ann Oncol*, 26 (suppl 5): 69-77.

Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. (2007). MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67:6130–6135.

Runkle EA, Zhang H, Cai Z, Zhu Z, Karger BL, Wu SL, O'Rourke DM, Zhou Z, Wang Q, Greene MI. (2012). Reversion of the ErbB malignant phenotype and the DNA damage response. *Exp Mol Pathol* 93: 324-333.

Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. (2011). MikroRNA'lar ve kanser, Dicle Tıp Dergisi; 38 (1): 113-120.

Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, Ferbeyre G, Chartrand P. (2007). An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. J Biol Chem 282: 2135-2143.

Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, Wong YN, Hahn N, Kohli M, Cooney MM, Dreicer R, Vogelzang NJ, Picus J, Shevrin D, Hussain M, Garcia JA, DiPaola RS. (2005). Chemohormonal therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer. N Engl J Med. 2015 Aug 20;373(8):737-46.

Tosun Ç. (2007). Antibiyoterapi Sonrası Serum PSA Değerlerindeki Değişim Düzeyinin Prostat Kanseri Tespit Etme Oranı ile İlişkisi. Kartal Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hast. Üroloji Kliniği Uzmanlık Tezi İstanbul (Danışman: Doç Dr. U Kuyumcuoğlu).

Yıldırım Tosun H. (2011). Prostata Ait Benign Glandüler Yapılar, Yüksek Dereceli Prostatik İntraepiteliyal Neoplazi ve Adenokarsinomlarda IMP-3 Ekspresyonunun Belirlenmesi, P.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Denizli (Yrd. Doç. Dr. N. Şentürk).

Yıldızhan E. (2006). Prostat Kanseri Tanısında Rektal Muayene, PSA ve Trus Sonuçları ile Karşılaştırılması. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hast. Radyoloji Kliniği Uzmanlık Tezi, İstanbul (Danışman: Dr. Ç Babuna).

Zhao L, Bode AM, Cao Y, Dong Z. (2012). Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miRNA in tumor radiosensitivity. Carcinogenesis 33: 2220-2227.

Zhao L, Lu X, Cao Y. (2013) MicroRNA and signal transduction pathways in tumor radiation response. Cell Signal 25 (7):1625-1634.

EKLER

1. ETİK KURULU ONAYI



T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi

Sayı : 16214662 / 050.01.04/113

01.10.2014

Konu : Etik kurul Başvuru Dosyası Hk.

Doç. Dr. Birsen AYDEMİR
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik ABD

İlgi: 24.09.2014 tarihli ve 111 sayılı başvurunuz

Destekleyicisi olduğunuz 'Prostat kanserli hastalarda radyoterapi uygulamalarında miRNA-34a ve miRNA-521 ekspresyon düzeylerinin incelenmesi' isimli klinik araştırma başvuru dosyanız ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup; etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına etik kurul üyelerince karar verilmiştir ve uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Pelin TANYERİ
Etik Kurul Başkanı

EK: 01.10.2014 tarih ve 2 sayılı Etik Kurul Kararı (3 sayfa)

Korucuk Kampüsü Korucuk 54280 SAKARYA
Telefon : (0 264) 295 66 30 Faks : (0 264) 295 66 29
e-posta : tip@sakarya.edu.tr Elektronik Ağı : www.sakarya.edu.tr



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Selim ÖĞÜT

Doğum yeri ve tarihi: Kahta / 08.02.1986

Uyruğu: T.C

Medeni durumu: Bekar

Askerlik durumu: Yaptı

İletişim adresi ve telefonu: Cihangir Mahallesi Şehit Jandarma Komando Er Hakan Öner Sk. No:1 Avcılar / İSTANBUL

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi

İnönü Üniversitesi Fizik Bölümü 2013

Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilimdalı Yüksek Lisans 2013-

III- Ünvanları

Öğretim Görevlisi 2014-

IV- Mesleki Deneyimi

İstanbul Gelişim Üniversitesi Öğretim Görevlisi 2014-

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Fizik Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

A. SCI Expanded, SCI kapsamındaki yayınlanmış özgün araştırma, makale, derleme

A1. Aydemir B, Akdemir R, Vatan MB, Cinemre FB, Cinemre H, Kiziler AR, Bahtiyar N, Buyukokuroglu ME, Gurol G, **Ogut S.** “The Circulating Levels of Selenium, Zinc, Midkine, Some Inflammatory Cytokines, and Angiogenic Factors in

Mitral Chordae Tendineae Rupture”. Biol Trace Elem Res. 167:179-186 (2015). DOI:10.1007/s12011-015-0307-6.

C. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

C1. Aydemir B., Akdemir R., Vatan M.B., Cinemre F.B., Cinemre H., Kiziler A.R., Kılıc M.A., Buyukokuroglu M.E., Gurol G., **Ogut S.** “Associations among plasma lipid peroxidation, selenium, zinc and tumor necrosis factor-alpha concentrations in patients with chordae tendineae” 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Süleyman Demirel University, Isparta Turkey, Cell Membranes and Free Radical Research 6(1), P 76, s 365-366, Sep 9-12, 2014. 3.6

C2. Aydemir B., Gurol G., Kiziler A.R., Bahtiyar N., Tamer Arabacı S., **Ogut S.**, Utkan T., Ates N. “Effects of YC-1 on oxidant antioxidant system parameters and trace element levels in epileptic seizures in pentylenetetrazole-induced epileptic rats” 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Süleyman Demirel University, Isparta Turkey, Cell Membranes and Free Radical Research 6(1), P 75, s 364-365, Sep 9-12, 2014.

C3. Aydemir B, Akdemir R, Vatan MB, Cinemre FB, Cinemre H, Kiziler AR, Bahtiyar N, Kilic MA, Buyukokuroglu ME, Gürol G, **Ogut S** ”Relations between selenium blood levels and proinflammatory cytokine production in patients with mitral chordae tendineae rupture”p66 - Istanbul University, World Conference on Technology, Innovation and Entrepreneurship, İstanbul-Turkey, 28-30 May 2015. 3.2

C4. Ögüt S, Aydemir B, Cinemre FB, Cinemre H, Karaçetin D, Erkal HŞ. “Circulating activities superoxide dismutase in patients with prostate cancer before and after radiotherapy” PP2-1, s 61, 11th International Conference on Protein Stabilisation, Istanbul Military Museum, Istanbul, Turkey, 9-11 May, 2016.

C5. Ögüt S, Aydemir B, Cinemre FB, Cinemre H, Karaçetin D, Erkal HŞ. “Circulating levels of apoptotic markers and p53 in patients with prostate cancer before and after radiotherapy” PP2-2, s 62, 11th International Conference on Protein Stabilisation, Istanbul Military Museum, Istanbul, Turkey, 9-11 May, 2016.

C6. Ögüt S, Aydemir B, Cinemere FB, Cinemre H, Topçu NE, Karaçetin D, Erkal HŞ.” Manganese superoxide dismutase activities and circulating levels of zinc, magnesium, calcium, iron in patients with prostate cancer before and after radiation therapy” P 27, Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress 8 (1): 516-517, 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, Suleyman Demirel University, Isparta, Turkey, 24-27 May 2016.

C7. Ögüt S, Aydemir B, Cinemere FB, Cinemre H, Topçu NE, Karaçetin D, Erkal HŞ, Karakoc Y. ”miRNA-521 expression levels and manganese superoxide dismutase activities to response ionizing radiation in patients with prostate cancer” P 26, Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress 8 (1): 515-516, 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, Suleyman Demirel University, Isparta, Turkey, 24-27 May 2016.

D. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan özgün araştırma makalesi

D1. Özden Net, Cinemre FB, Cinemre H, **Ögüt S,** Bahtiyar N, Karaçetin D, Erkal HŞ, Aydemir B.” The influence of radiotherapy on circulating miRNA expression levels and hemoreological properties in prostate cancer” J.Human Rhythm, 3(1), (42-49) 2017.

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

E1. Topcu NE, **Ögüt S,** Yücel A, Erkal HŞ, Gündüz Y, Aydemir B,”İyonize olmayan radyasyon ve kanser ilişkisi”, P-36, s 55, Geleceğin Tıbbı 1. Ulusal Tıp Kongresi, Sakarya Üniversitesi Esentepe Kampüsü Kültür ve Kongre Merkezi, Sakarya 25-27 Nisan 2014.

E40. Aydemir B., Gürol G., Ekici F., Cinemre FB., Kızıler AR, Bahtiyar N., **Ögüt S.** Genetik absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarda eser element konsantrasyonları değişimlerinin incelenmesi. P-18, S:28, 8. Hücrel Sinirbilim Günleri, Sakarya Üniversitesi Kültür ve Kongre Merkezi, Esentepe Kampüsü, Sakarya, 29-30 Kasım, 2014.

E2. Aydemir B, Cinemre FB, **Öğüt S**, Topçu NE, Erkal HŞ "Kanserde mikroRNA’larda neredeyiz? " , P-62, s 83, 2. Ulusal Tıp Kongresi, Geleceğin Tıbbı, SAU Kültür ve Kongre Merkezi, Sakarya, 18-20 Nisan 2015.

E3. Aydemir B, Cinemre FB, Erkal HS, **Öğüt S**, Topçu NE, Cinemre H, Adsan Ö. "Prostat kanserinde radyoterapinin bazı biyokimyasal parametre düzeylerine etkisi", P-63, s 84, 2. Ulusal Tıp Kongresi, Geleceğin Tıbbı, SAU Kültür ve Kongre Merkezi, Sakarya, 18-20 Nisan 2015.

E4. Aydemir B, Gürol G, Ekici F, Cinemre FB, Kiziler AR, **Öğüt S** "Yaşa bağlı genetik absans epilepsili sıçanlarda bazı oksidan-antioksidan parametrelerin böbrek hasarının patogeneğinde rolü" P-36, - 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 30Nisan-3 Mayıs 2015.

E5. Aydemir B, Gürol G, Ekici F, Cinemre FB, Kiziler AR, **Öğüt S** "Yaşa bağlı genetik absans epilepsili sıçanlarda karaciğer dokusunda oksidatif stresin durumu" P-37- 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 30Nisan-3 Mayıs 2015.

E6. **Öğüt S**, Aydemir B, Cinemre FB, Cinemre H, Karaçetin D, Erkal HŞ. Radyoterapi alan prostat kanserli hastalarda apoptotik belirteçler ile bazı biyokimyasal parametrelerin ilişkisi. Yeditepe Üniversitesi Biyoteknoloji Topluluğu Öğrenci Kongresi, 5. Genetik ve Biyomühendislik Günleri, Yeditepe Üniversitesi, İstanbul, 11-12 Şubat 2017.

E7. **Öğüt S**, Topçu NE, Aydemir B, Cinemre FB, Cinemre H, Karaçetin D, Erkal HŞ. Prostat kanserli hastalarda bazı miRNA ekspresyon düzeyleri üzerinde radyoterapinin etkisi. Yeditepe Üniversitesi Biyoteknoloji Topluluğu Öğrenci Kongresi, 5. Genetik ve Biyomühendislik Günleri, Yeditepe Üniversitesi, İstanbul, 11-12 Şubat 2017

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Ödüller

İnönü Üniversitesi Fizik Bölümü Birinciliği

Projeleri

Verdiği konferans ya da seminerler

Katıldığı paneller (panelist olarak)

VIII- Diğer Bilgiler

- 1- 08 Aralık 2016 "**Sigara ve Akciğer Kanseri**" Sempozyumu.
- 2- 21 Aralık 2016 "**1. Radyoterapi Sempozyumu**"
- 3- 01 Mart 2017 "**Topluluk Önünde Etkin Konuşma ve İletişim Kazaları**"
Semineri.
- 4- 09 Mart 2017 "**Sağlık Alanında İşe Alım Politikası ve Özel Hastanelerde
Hasta Memnuniyeti** " Semineri.
- 5- 15 Mart 2017 "**Sağlıklı Beslenme ve Medikal Estetik**" Semineri.

