

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PROSTAT KANSERLİ HASTALARIN PROSTAT
SEKRESYON SIVILARINDAN MİRNA ELDESİ VE
MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE MİRNA EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

ESRA GÜZEL

**DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA ÖZEN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**


İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Genetik Yüksek Lisans Programında Esra GÜZEL tarafından hazırlanan Prostat Kanserli Hastaların Sekresyon Sıvılarından MiRNA Eldesi ve Mikrodizin Yöntemi ile MiRNA Ekspresyon Profillerinin Karşılaştırılması başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

13 / 05 / 2013

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1. Prof. Dr. Mustafa ÖZEN Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D.	
2. Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK İstanbul Tıp Fakültesi İç Hast. Tıbbi Genetik A.D.	
3. Prof. Dr. Atilla SEMERCİÖZ Bağcılar Eğt. Arşt. Hast. Üroloji Kliniği	
4. Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk BAYRAK Yeditepe Üniversitesi Tıbbi Genetik A.D.	
5. Yrd. Doç. Dr. Gülgün GÜVEN Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D.	

BEYAN

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

Esra GÜZEL



İTHAF

Sevgili anne ve babama,
Sevinç ve hüzünlerimi paylaştığım ablama,
Ve yalnızlığı bana hiç yaşatmayan tüm değerli dostlarıma...

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenen ve akademik çalışmalarımda desteğini esirgemeyip her konuda gösterdiği anlayış ve paylaştığı bilgi birikimiyle yanımda olan kıymetli hocam Sn Prof. Dr. Mustafa Özen'e,

Yüksek Lisans eğitimime katkıları olan Sn. Doç. Dr. Hakan ULUCAN, Sn. Yrd. Doç. Dr. Gülgün S. GÜVEN, Sn. Doç. Dr. Mehmet Seven, Sn. Uz. Dr. Elif YOSUNKAYA'ya,

Tez projemin gerçekleşmesi için gereken örneklerin sağlanmasında yardımcı olan Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği Başkanı Prof. Dr. Atilla SEMERCİÖZ ve ekibine,

Bilimsel ve deneysel anlamda bilgilerini paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen meslektaşım Ömer Faruk KARATAŞ'a, kıymetli anılar paylaştığımız değerli meslektaşlarım Betül YÜCETÜRK, Kemal KESEROĞLU, İlknur SUER, Abdullah ÇELEBİ, Ali GÖKGÖZ, Derya AKYÜZ, Dilek BAYRAKTAR ve Seda SALMAN'a,

Tıbbi Genetik Polikliniği asistanlarımız Dr. Alper GEZDİRİCİ, Dr. Asuman-Erkan KOPARIR, Dr. Bahtiyar MAMMADOV, Dr. Emre KIRAT ve Dr. Buğrahan Düz'e

Çalışma arkadaşlarım Murat POLAT, Müge ÇATAL ve Nazlı BİLGE'ye, bölümümüz çalışanları Sibel KOÇ, Sinem ATEŞÇİ, Azize TURAN, Fatma ÖNER, Salih İSENÇ, Şaban ÇÖRKUŞ ve Şenay SAYIN'a,

Ve hep yanımda olan sevgili anneme, babama, ablama ve dünyaya teşrifıyla hayatıma renk katan yeğenim Zehra'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esra GÜZEL

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21092

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat	3
2.1.1. Prostat Bezinin Gelişimi	4
2.2. Prostat Kanseri	4
2.2.1. Prostat Kanserinin Oluşumu	5
2.3. Benign Prostat Hiperplazi (BPH).....	6
2.4. Prostat Kanseri'nin Tanı ve Tedavisi.....	8
2.5. Prostat Bezi'nin Salgısı, İçeriği ve Fonksiyonları	10
2.6. MikroRNA	11
2.6.1. MiRNA'nın Oluşumu ve İşlenmesi	13
2.7. Prostat Kanseri'nde MiRNA Ekspresyonu'nun Profillenmesi	15
2.8. Kanserli Hastaların Vücut Sıvılarında Bulunan MiRNA'lar	17
2.9. Prostat Kanserli Hastaların Vücut Sıvısında Bulunan MiRNA'lar.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Gereç	20
3.1.1. Örneklerin Eldesi	20
3.1.2. Gereç ve Cihazlar.....	20
3.1.2.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	20
3.1.2.2. Solüsyonlar.....	22

3.1.2.3. Bilgisayar Programları	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Total RNA İzolasyonu	23
3.2.2. RNA Derişimlerinin Belirlenmesi	23
3.2.3. MiRNA Mikrodizin İşaretleme Ve Hibridizasyon.....	24
3.2.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Ve Slaytların Taranması	27
3.2.5. Mikrodizin Veri Analizi Ve İstatistiksel Analiz	27
3.3. qRT-PZR ile miRNA Ekspresyon Seviyesi Analizi	28
3.3.1. cDNA Sentezi	28
3.4. qRT-PZR.....	29
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	31
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	64
ETİK KURUL KARARI	74
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: PKa'da belirlenen miRNA'lar ve bunların biyolojik olarak doğrulanmış hedef genlerinin listesi.	17
Tablo 3-1: Defosforilasyon karışımı bileşenleri ve miktarları.....	24
Tablo 3-2: Ligasyon karışımı bileşenleri ve miktarları	25
Tablo 3-3: Hibridizasyon karışımı bileşenleri ve miktarları.....	26
Tablo 3-4: miRNA cDNA sentezi karışımı bileşenleri ve miktarları	28
Tablo 3-5: Gerçek zamanlı PZR reaksiyon karışım bileşen ve miktarları.....	29
Tablo 3-6: Real Time PZR kondüsyonları.....	30
Tablo 4-1: BPH ve PKa'lı hastaların Yaş, PSA, PKa'lı hastalara ait Gleason Skor değerleri	33
Tablo 4-2: PKa ve BPH'lı hastalarının yaş, PSA ve Gleason skor ortalamaları	34
Tablo 4-3: BPH ve PKa'lı hastaların RNA derişimleri ve saflık oranları	35
Tablo 4-4: Mikrodizinde kullanılan RNA'lar ve içerdiği Cy3 miktarları	36
Tablo 4-5: BPH ve PKa'lı hastalardan alınan RNA'ların mir 361-3p, -133b, -221, -203 seviyelerindeki ortalama, sterr, t-test değerleri.....	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Prostat bezinin anatomik görüntüsü	3
Şekil 2-2: Prostat bezinin peri-üretal ve fibromusküler dokularının artışıyla oluşan BPH görüntüsü	6
Şekil 2-3: miRNA'ların biyogenezi ve miRNA'nın transkripsiyon sonrası regülasyon mekanizması	14
Şekil 2-4: PKa patogeneziyle ilişkilendirilmiş miRNA'lar ve doğrulanmış hedeflerinin şematik gösterimi.....	16
Şekil 4-1: Prostat sekresyon sıvı örneğinde miRNA mikrodizin görüntüsü.....	38
Şekil 4-2: Array'in 4 köşesinde bulunan grid problemlerinin görüntüsü	40
Şekil 4-3: Tek spottan bulunan problemlerin sinyal yoğunluk dağılımı	41
Şekil 4-4: PKa'lı hastaların PSS'lerinde BPH'ya göre değişim gösteren miRNA'ların Heat map gösterimi.....	43
Şekil 4-5: hsa-miR-361-3p molekülünün BPH ve PKa örneklerinde rölatif ekspresyon miktarı.....	45
Şekil 4-6: hsa-miR-361-3p molekülünün BPH ve PKa örneklerinde ortalama rölatif ekspresyon miktarı (p=0.04).....	46
Şekil 4-7: hsa-miR-133b molekülünün BPH ve PKa örneklerinde rölatif ekspresyon miktarı.....	48
Şekil 4-8: hsa-miR-133b molekülünün BPH ve PKa örneklerinde rölatif ekspresyon miktarı (p<0.01).....	49
Şekil 4-9: hsa-miR-221 molekülünün BPH ve PKa örneklerinde rölatif ekspresyon miktarı.....	51
Şekil 4-10: hsa-miR-221 molekülünün BPH ve PKa örneklerinde ortalama rölatif ekspresyon miktarı (p=0.03).....	52
Şekil 4-11: hsa-miR-203 molekülünün BPH ve PKa örneklerinde rölatif ekspresyon miktarı.....	54
Şekil 4-12: hsa-miR-203 molekülünün BPH ve PKa örneklerinde ortalama rölatif ekspresyon miktarı (p=0.0002).....	55
Şekil 4-13: mir 203, -361-3p, -203, -221, PSA, ve 4 miRNA'nın ROC eğrileri.....	57

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

RNA	: Ribonükleik Asit
miRNA	: Mikro Rübönükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
PKa	: Prostat Kanseri
BPH	: Benign Prostat Hiperplazi
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PSS	: Prostat Sekresyon Sıvısı
RNAi	: RNA İnterferans
RISC	: RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi
dsRBD	: Çift Zincirli RNA Bağlama Alanı
AR	: Androjen Reseptörü
5 α R	: 5 Alfa Redüktaz
AÜSS	: Alt Üriner Sistem Semptomları
DHT	: Dihidrotestesteron
qRT-PZR	: Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROC	: Receiver Operating Curve
AUC	: Area Under Curve
Cy-3	: Cyanine-3
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
dH₂O	: Distile Su
μl	: Mikrolitre

ÖZET

Güzel E. Prostat kanserli hastaların prostat sekresyon sıvılarından miRNA eldesi ve mikrodizin yöntemi ile miRNA ekspresyon profillerinin karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2013.

Prostat kanseri (PKa), erkek üreme sistemine bağlı salgı bezi olan prostatta oluşan ve erkeklerde ölümlü sonuçlanan en ciddi kanser türlerindedir. PKa, prostat hücreleri değişime uğradığında ve kontrol dışı çoğaldığında gelişir. İlerlemiş ve metazatik tümörler için tedavi seçenekleri kısıtlı olduğundan yeni tanı araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Orta yaş ve üzeri erkeklerde sık görülen prostat bezi hastalıklarından Benign Prostat Hiperplazi (BPH) ise, yaşa bağlı artan histolojik değişikliklerle ve prostat bezinin büyümesiyle karakterizedir.

MikroRNA'lar (miRNA) kısa, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, kodlamayan, yeni keşfedilmiş bir RNA çeşididir. Gen ifadesi düzenlenmesinde görevli olan miRNA'ların PKa dahil birçok kanserin patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada PKa ve BPH vakalarının birbirinden ayırılabilmesinde kullanılabilecek spesifik miRNA ifade değişimlerinin tespiti amaçlanmıştır. 23 PKa ve 25 BPH'lı hastadan prostat sekresyon sıvıları (PSS) toplanarak, miRNA profillemesi için 4 PKa ve 4 BPH örneğiyle mikrodizin çalışması yapıldı. Sonrasında, ifade değişimleri anlamlı olan miRNA'lardan dördü seçilerek kantitatif ters-transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yöntemiyle doğrulama çalışması gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler Student's t-test kullanılarak yapıldı ve ROC (Receiver Operating Curve) eğrileri SPSS-15.0 ile çizildi.

Mikrodizin sonuçlarına göre PKa hastalarında BPH'lılara oranla miR-361-3p, -133b, ve -221'in ifade düzeylerinde anlamlı azalma, mir-203'te ise artış saptanmıştır. Bu miRNA'ların ifadelerindeki değişimler, 23 PKa ve 25 BPH hastasının PSS örnekleri kullanılarak qRT-PZR yöntemiyle doğrulanmıştır. Yapılan ROC analizi, BPH ve PKa'nın ayırılabilmesinde bu miRNA'ların prostat spesifik antijen'e (PSA) göre çok daha güçlü olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, PSS'de miRNA'ların varlığı literatürde ilk kez tarafımızdan gösterilmiştir. Prostat masajının rutin muayenede kolay uygulanabilir olması, bu noninvaziv yöntemi PKa tanısında güçlü bir aday yapmaktadır. Sonuçlarımız, PSS'de farklı eksprese olan miRNA'ların tanı belirteci olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Prostat Kanseri, BPH, mikroRNA, mikrodizin, prostat sekresyon SIVISI

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21092

ABSTRACT

Güzel E. Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with Prostate Cancer. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master of Science Thesis. Istanbul. 2013

Prostate cancer (PCa) is one of the leading causes of cancer deaths in men and develops as a result of genetic/epigenetic alterations and uncontrolled cell proliferation. Since there are limited treatment options available for advanced/metastasized tumors, there is an urgent need for novel diagnostic tools for PCa. Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) is a common prostate gland disease in middle-aged/old men and characterized by age-related histological changes and increased prostate gland growth.

MicroRNAs (miRNAs), a newly discovered RNA type, are small, non-coding, and approximately 18-24 nucleotides in length. They are responsible for regulation of gene expression and are implicated in pathogenesis of many cancers, including PCa. In this study, we aimed to identify an miRNA expression signature that could be used to distinguish PCa from BPH. miRNA profiling of prostate secretion samples (PSS) of four BPH and four PCa patients, were performed using microarray. Then four of significantly deregulated miRNAs were further confirmed with quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) in PSS samples. Statistical analysis was performed using Student's t-test. ROC curves were plotted with SPSS-15.0.

Microarray profiling revealed that miR-361-3p, -133b, and -221 were downregulated and miR-203 was upregulated significantly in PSS of PCa patients. Further qRT-PCR analysis confirmed the altered expressions of these miRNAs in PSS of 23 PCa and 25 BPH patients. These miRNAs, together and individually have much power (AUC:0.950) than prostate specific antigen (PSA) has (AUC:0.463) to discriminate PCa from BPH patients.

Consequently, we showed for the first time in the literature the presence of miRNAs in PSS. We suggest PSS as a powerful non-invasive source for prognosis evaluation in PCa, since prostate message can be easily applied during routine examination. Our results showed that certain differentially expressed miRNAs in PSS could be used as diagnostics markers.

Key Words : Prostate Cancer, BPH, microRNA, microarray, prostate secretion fluids

This study is supported by Istanbul University Scientific Research Projects Division
Project Number: 21092

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri (PKa) günümüzde en sık görülen ve ölüme yol açan kanser türleri arasında yer almaktadır. Prostat, erkek üreme sisteminin bir bölümü olup, androjen hormonuyla büyümesi gerçekleşir. Yaş, ırk, kalıtım, diyet ve coğrafik yerleşim gibi faktörler PKa oluşum riskini arttırmaktadır.

Orta yaş ve üzeri erkeklerde sık görülen, stromal ve glandular hiperplazi ile tanımlanan Benign Prostat Hiperplazi (BPH) ise prostat bezinde oluşan hastalıklardan biridir. Prostat bezinin büyümesiyle tanımlanan BPH; üriner obstrüksiyona, mesane fonksiyonlarının bozulmasına ve böbrek yetmezliğine neden olabilmektedir. Rutin tanıda PKa ve BPH gibi prostata bağlı hastalıkların tanısında kullanılan Prostat Spesifik Antijen (PSA), meninin sıvılaşmasında görev alan ve az miktarlarda kana geçen protein yapıdaki bir enzimdir¹. Prostatın büyümesiyle kandaki PSA miktarında artış görülebildiği gösterilmiştir fakat PSA'nın PKa'lı ve BPH'lı hastaların birbirlerinden ayırılmasında yeterli hassasiyete sahip olmaması, rutinde yeni yöntemlerin arayışına sebep olmuştur.

RNA çeşitlerinden; tek sarmallı, kodlama yapmayan, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda olan miRNA'ların, farklı kanser türlerine göre değişim gösterdikleri tespit edilmiştir. Yeni bir gen regülatörü sınıfı olarak görülen miRNA'ların ekspresyonunun çeşitli kanser tiplerini sınıflandırmada kullanılabileceği ileri sürülmüştür². Ayrıca, miRNA'ların normal ile kanserli dokular arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, miRNA'ların kanser tanısında markör olarak kullanılmalarında oldukça güçlü bir aday yapmaktadır.

miRNA'ların yarısına yakınının genomun kırılgan yerlerinde olmaları, kanser patogenezinde önemli olduklarına dair güçlü kanıtlar sunmaktadır³. miRNA'ların meme, akciğer, kolon ve prostat dahil pek çok kanser türünde kanserojenik farklılaşmanın değişik seviyelerini ayırt edebileceği gösterilmiştir⁴. miRNA ekspresyon profilleri hastalıkların karakterizasyonunda çok önemli gelecek vadetmektedir.

İnsan vücut sıvılarında dolaşan ve tanısal değeri olan miRNA'ların varlığının tespiti kanser tanısında kullanılabilme olasılıklarını güçlendirmektedir. Ne zaman ve nerede eksprese edildiklerini anlamak, protein kodlayan genlerin ekspresyon bilgileri kadar önem arz etmektedir. Farklı miRNA'larının tanımlanması sayesinde prostat kanserinin biyolojisi daha iyi anlaşılacak ve yeni bulgular ile tedavi için yeni yöntemler geliştirmek mümkün olacaktır.

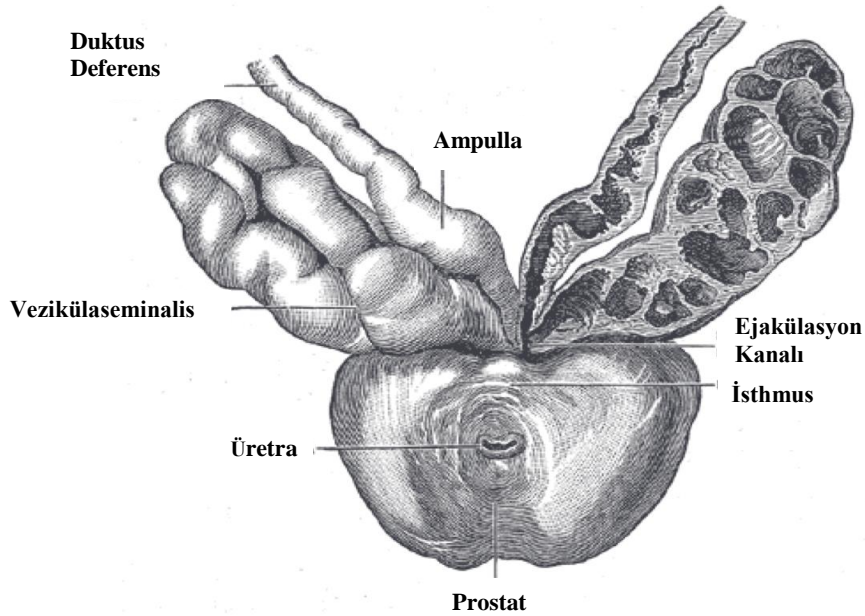
Yapılan çalışmada öncelikle PKa'lı ve BPH'lı hastalardan non-invaziv yöntem olan prostat masajıyla (PM) elde edilen prostat sekresyon sıvılarında (PSS) miRNA'ların varlığının tespit edilmesi, sonrasında ise mikrodizin analizi yapılarak bu iki grup arasında anlamlı ekspresyon farklılığı gösteren miRNA'ların tanımlanması amaçlanmıştır. Tespit edilen miRNA'lar 25 BPH'lı ve 23 PKa'lı hastadan elde edilen PSS'lerde kantitatif ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yöntemi ile doğrulanarak bu miRNA'ların BPH ve PKa ayrımı için rutin tanıda kullanılabileceklerinin gösterilmesi hedeflenmiştir.

Elde edilen sonuçlarla miRNA'ların PKa gelişimindeki etkileri gösterilecektir ve bu bulgular ışığında PKa mekanizması daha iyi anlaşılabilir ve tedaviye yönelik yeni projelere öncülük edilebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat

Prostat, idrar kesesi ile dış idrar yolu arasında olan üretranın başlangıç kısmını oluşturan erkek üreme sistemine ait ekzokrin bezdir. Yapısı, fibromusküler doku içine gömülü alveoller ve kanallardan oluşur. Yaklaşık 3 cm uzunluğunda, 4 cm genişliğinde ve 2 cm kalınlığındadır. Ceviz büyüklüğünde olan prostatın yaklaşık ağırlığı 18 – 20 gramdır^{5,6}. Prostat bezinin anatomik yapısı Şekil 2-1’de verilmiştir.



Şekil 2-1: Prostat bezinin anatomik görüntüsü

Duktus deferens’in genişlemiş olan son bölümü ampulla, idrar kesesinin arkasında rektumun önünde kıvrımlı tek bir kanal olan vezikülaseminalis, seminal sıvı ve idrarın atıldığı üretra, duktus deferens ile seminal kese kanalının birleşmesinden oluşan ejakülasyon kanalı, üretra arkasındaki sağ ve sol lobu birbirine bağlayan isthmus. Köpf-Maier, P.⁵ ve ark. ‘dan değiştirilerek alınmıştır.

2.1.1. Prostat Bezinin Gelişimi

Prostat bezi, intrauterin 3. ayında üretranın proksimal kısmının endodermi ve sinus mezenşimi tarafından oluşturulur. Bezin dış glandular bölgesini üretral endoderm oluştururken iç bölgesindeki glandular dokuyu, üregenital ve mezonefrik epitellerin birleşimi oluşturur. Dış zon ilk başta sert yapıdadır ve bezin tübüler kısmını oluşturur. İç zon ise bezin düz kaslarını, bağ dokusunu, kan ve lenf damarlarını oluşturacak şekilde farklılaşır. Prostat bezi doğumda küçük olup, puberteyle hızlıca gelişir ve 40 yaşından sonra sürekli büyümeye devam eder^{7,8}.

2.2. Prostat Kanseri

Çağımızın en önemli hastalığı olan kanserin tüm dünyada görülme oranı hızla artarken 2012 yılında Avrupa'da yapılan araştırmada kanser ölümlerinin sayısının 737.747'si erkek 576.489'ü kadın olmak üzere toplamda 1.314.296 olacağı öngörülmüştür⁹. Kanser türleri içinde prostat kanserinin de yaygınlaştığı, ülkemizde¹⁰ ve ABD'de erkeklerde ölüm oranı en sık görülen ikinci kanser türü olduğu saptanmıştır¹¹. Prostat kanserinin görülme sıklığı ülkeler ve etnik gruplar arasında değişkenlik göstermektedir. Amerikadan sonra prostat kanserinin en sık görüldüğü yer Avrupa ülkeleridir ve en az ise Güneydoğu Asya ülkelerinde görüldüğü tesbit edilmiştir¹². Bu farklılıklardan kişilerin yaşadığı coğrafyaların, diyet alışkanlıklarının, yaşam tarzlarının yanısıra çevresel faktörlerin ve hereditenin de sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Günümüzde insan ömrü ortalamasının uzaması ve prostat kanserinin görülme sıklığının da yaşa bağlı olarak artış göstermesi bu kanseri önemli sağlık problemleri arasına taşımaktadır.

2.2.1. Prostat Kanserinin Oluşumu

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 olur¹³.

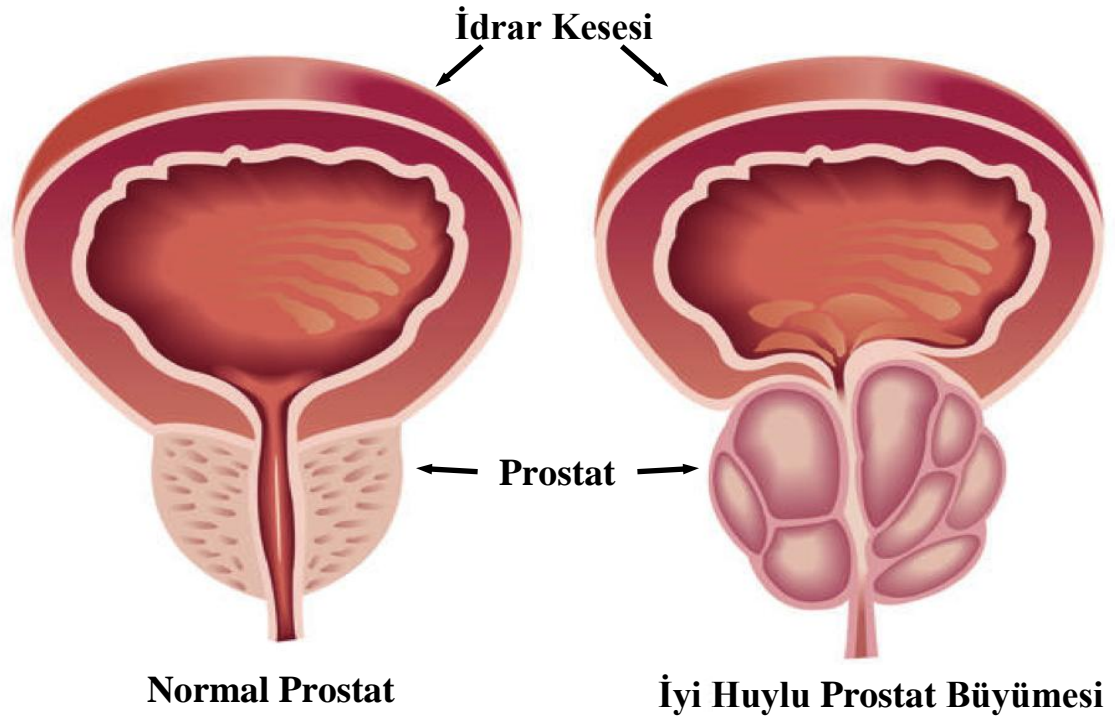
PKa'nın görülme sıklığı yaşa bağımlı olarak değişmektedir. 50 yaş altında nadir görülürken bu yaştan sonra görülme sıklığı hızla artar¹⁴. Ülkemizde PKa'nın görülme oranının 50'li yaşlardaki bireylerde %8.3 olduğu, 80 yaş ve üzerinde ise %33.3'e kadar yükseldiği kaydedilmiştir¹⁵.

Prostat kanserinin görülme sebeplerinden biri de aile hikayesinde PKa'nın bulunmasıdır. Bu durum bireyde PKa'nın görülme riskini ve ölüm oranını arttırmaktadır. Babasında veya erkek kardeşinde PKa olan bir bireyin bu kansere yakalanma riski normal erkeklere göre iki kat daha yüksektir. Birden çok etkilenen akrabası olan erkeklerde kanser riskinin artması genetik faktörlerin etkisini kanıtlamaktadır. Bazı genlerin ve ortak gen varyasyonlarının PKa riskini arttırdığı görülmüştür. Bunlardan biri kalıtsal prostat kanseri geni 1 (HPCG)'dir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyon kadınlarda meme ve overyan kanser riskini arttırırken bazı erkeklerde ise PKa'ya sebep olmaktadır¹⁶.

Diğer kanserlerdeki gibi PKa'da en çok deregüle olan tümör süprösör geni, apoptoz ve hücre döngüsünde düzenleyici rolü olduğu bilinen P53 transkripsiyon faktörüdür. P53, DNA hasarı durumunda hücrenin kontrolsüz çoğalmasını önleyerek hücreyi apoptoza götürür¹⁷. P53 ile aynı işlevi gören P63 ve P73 genlerinin de PKa gelişiminde etkili olduğu tespit edilmiştir¹⁸. Prostat kanserinin patogenezinde proto-onkogenlerden Ras, Myc, Her-2/neu, ve PTI-1 genlerinde de rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir¹⁹. Genetik etkilerin yanısıra gen ekspresyonunda önemli olan epigenetik faktörlerden DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının anormal değişimleri de tümörögenез ve metastaza neden olabilir²⁰.

2.3. Benign Prostat Hiperplazi (BPH)

Benign prostat hiperplazisi, Alt üriner sistem semptomları (AÜSS)'nin yaygın sebeplerinden olan, prostat büyümesinin ve üretra üzerine etkilerinin olduğu, periüretral ve geçiş bölgesinde öncelikli bulunan hiperplastik nodül görüntüsü ile tanımlanmıştır²¹. (Şekil 2-2)



Şekil 2-2: Prostat bezinin peri-üretral ve fibromusküler dokularının artışıyla oluşan BPH görüntüsü

https://www.healthtap.com/#user_questions/108934-what-does-bph-mean-on-a-chart²² adresinden değiştirilerek alınmıştır.

Yaşlı erkek nüfusunun ortak bir sorunu olan BPH, orta yaş ve üzeri erkeklerde en sık görülen dördüncü hastalıktır ve prostat bezindeki stromal ve epitelyal dokuların büyümesi ile tanımlanır. BPH'nın doğal seyri; yaşa bağlı artan histolojik değişiklikler ve prostat bezinin büyümesiyle karakterize edilmiştir. 30 yaş altı beyaz erkeklerin sadece % 10'unda, 60 yaşındakilerin % 42'sinde, 80 ve üzeri yaşındaki erkeklerin ise % 80'ine yakın kısmında görülmektedir²³. 46 yaşında semptomsuz bir erkeğin sonraki 30 yıllık yaşamında AÜSS/BPH olma riskinin %45 olduğu bulunmuştur^{24,25}.

BPH'nın genel semptomları arasında; sık idrara gitme, idrar akımında zayıflama, duraklama, idrar yapmada güçlük çekme ve idrar sırasında ağrı ve yanmalar görülür. BPH üriner obstruksiyona, mesane fonksiyon bozukluklarına, hatta böbrek yetmezliğine sebep olabilmektedir²⁶. Hastalık ölümcül olmasa da ilerleyen ve hayat kalitesini bozan bir durum olduğu için bu kişilerin mutlaka uygun şekilde değerlendirilmeleri gerekmektedir.

Prostatın normal ağırlığı 20 ± 6 gramdır ve 21-30 yaş arası erkeklerde BPH gelişimine kadar bu ağırlık sabit kalır. Otopsi çalışmaları sonucunda tanımlanan BPH'lı erkeklerde bu ağırlık yaklaşık 33 ± 16 gram olarak tespit edilmiştir. 70 yaş ve üzeri erkeklerin % 4'ünde 100 gramdan daha büyük boyutlara ulaşmaktadır. BPH'nın erken evrelerinde (31 ve 50 yaş arası erkeklerde) tümör ağırlığının ikiye katlanma süresinin 4.5 yıl olduğu, BPH'nın ara fazında ise bu sürenin 10 yılda gerçekleştiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir²⁷.

BPH patogenezinde yaş, hormonlar ve epitelyal-mezenkimal etkileşimleri etkili faktörlerdir²⁸. İnsan BPH'sı stromanın primer hastalıklarından biri olarak kabul edilir. Östrojen reseptörleri stroma da epitelyuma göre daha fazla yer aldığından östrojen bu hastalığın gelişiminde etkilidir. BPH'nın artış insidansı androjen-östrojen dengesindeki değişimle uyumludur²⁹⁻³¹. Epitelyum-stroma etkileşimleri de büyüme faktörlerinin (epidermal büyüme faktörü, temel fibroblast büyüme faktörü ve transforme edici büyüme faktörü beta TGF- β) anormal seviyeleri de hiperplaziye yol açabilir³². BPH oluşumunda androjenler diğer önemli faktörlerdir. Androjenlerin prostat bezi üzerinde mitojenik etkileri klinikte büyük öneme sahiptir. Androjenler prostat bezi ve poliaminlerin sentezinin hızlanmasına ve bu bileşikler üzerinden RNA sentezine sebep olurlar. Bu yolla prostat bezinde stroma ve kan damarlarında hipertrofi ve hiperplazi ortaya çıkar³³.

BPH oluşumunda etkili olan hormonlardan bir diğeri de testosterondur. Testosteron, 5 alfa redüktaz ($5\alpha R$) enzimiyle dihidrotestosteron (DHT) hormonuna dönüşür. DHT hormonu testesteronu aktif hale getirerek testesteronun dokularda androjenik etki oluşturmasını sağlar. Prostat bezinin normal büyüme ve gelişme gösterdiği bireylere göre $5\alpha R$ enziminin eksikliği olanlarda anormal prostat gelişimi görüldüğü saptanmıştır. $5\alpha R$ enzimi testesteronun birçok organda etkili olabilmesi için önemli bir kısmını DHT'ye geri dönüşümü olmayacak şekilde çevirir. Prostatın embriyolojik evredeki gelişiminde ve dış genital organların oluşumunda DHT etkilidir.

5 α R tip II yokluğu olan veya ergenlik öncesi kısırlaştırılan erkeklerde prostatın tam gelişmediği ve BPH oluşumunun görülmediği saptanmıştır³⁴.

Androjenlerin etkisinde prostat bezinde steroid bağlayıcı protein ve PSA üretimi artar. DHT prostatın farklılaşması, gelişmesi ve salgı fonksiyonları kazanması için gereklidir. 5 α R enziminin etkisi ile testesterondan üretilen DHT, prostat mezenseyal hücrelerinde keratinosit ve fibroblast büyüme faktörlerinin salgılanmasına neden olmaktadır. Bu büyüme faktörleri de hipertrofi ve hiperplaziye katkıda bulunurlar³⁵.

5 α R inhibitörü ile yapılan tedavisi sonucunda BPH'lı hastaların DHT derişiminin azaldığı ve prostat bezlerinde küçülme gerçekleştiği kanıtlanmıştır²⁶.

İnsan prostatındaki stromanın miktarı yaş faktörü ile artsa da³⁶ yaş tek başına BPH için etkili mekanizma değildir. Bunun yanısıra sosyoekonomik statü, sigara, hipertansiyon, diyet, diyabet, karaciğer sirozu gibi faktörlerin BPH'nın gelişiminden tek başlarına sorumlu oldukları kanıtlanmasa da etkili oldukları tesbit edilmiştir²³. Takip eden çalışmalarda BPH'ya yol açan sebeplerden biri olarak da düz kas hücrelerinin sayısındaki artış gösterilmiş, hatta tamamen stromal nodüllerden oluştuğu doğrulanmıştır²⁸.

2.4. Prostat Kanseri'nin Tanı ve Tedavisi

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 gösterir³⁷. Bu sistem hastalığın prognozu hakkında bilgi sahibi olunmasını ve uygulanabilirliği olan tedavi seçenekleri konusunda yol göstermektedir.

Diğer bir tanı yönteminde kullanılan PSA, PKa'nın erken teşhisinde belirleyici, evreleyici özelliğinin yanısıra kanserin erken tanısı sayesinde ölüm oranını azaltan etkisi bilinmektedir³⁸. Sağlıklı bireylerde serumdaki PSA seviyeleri prostat hacmine, yaşa ve ırka bağlı olarak değişkenlik gösterebilirken, PKa, BPH, sistoskopi uygulaması ve prostatit gibi hastalıklarda artış göstermesinin yanısıra ejakülasyon, transüretal kateterizasyon, transrektal ultrasonografi, travma gibi sebeplerle de artış göstermektedir³⁹.

Serum PSA seviyeleri benign süreçlere göre PKa'lı hastalarda belirgin olarak artış göstermektedir. Bu durum, prostat dokusundaki PSA difüzyonunu sağlayan normal prostat yapısının bozulması ve bazal hücre ve membran tabakasının tahribiyle açıklanır⁴⁰.

Klinik uygulamada, dijital rektal muayene, ameliyat öncesi PSA seviyesi, tümör evresi, Gleason greyd ve cerrahi sınırlar, prognostik faktörler olarak kullanılan ve en iyi tedavi stratejisini seçmek için gerekli olan kriterlerdir. PKa tedavisinde hastanın yaşı, genel sağlık durumu ve tedavi seçeneklerinin yan etkileri de göz önüne alınarak, cerrahi girişim, hormonal veya radyasyon tedavisi işlemleri uygulanmaktadır.

PKa takibinde insanlardan salgılanan kallikrein 2 (hK2), ürokinaz plazminojen etkinleştiricisi (uPA) ve reseptörü (uPAR), interlökin-6 (IL-6) ve reseptörü (IL-6R), büyüme reseptörüne dönüştürücü faktor beta-1 (TGF-Beta 1)'ler tanıda PSA ile birlikte kullanılabilirdiği gibi tek başlarına da biyolojik belirteç olma özelliği gösterdikleri belirtilmiştir⁴¹.

Günümüzde prostat kanserli hastaların erken tanısı için daha hassas ve duyarlı belirteçlerin olmayışı yeni arayışlara neden olmuştur. Bunlardan biri tümörün karakterizasyonunu ve kanser hastaların evrelendirilmesini kolaylaştıran mikrodizin tabanlı göstergelerden olan miRNA analizleridir. Umut veren bu tekniklerin daha az invaziv girişimlerin geliştirilmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir.

Tanımlanan insan miRNA'larının yarısına yakınının genomun kırılğan yerlerinde bulunması, bu küçük moleküllerin kanser progresyonunda rol alabileceğini düşündürmektedir³. miRNA'lar kanser patogenezinde önemli rol oynarlar. miRNA'ların normal ve kanserli dokular arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, buna bağlı olarak insan vücut sıvılarında dolaşan ve prognostik değeri olan miRNA'ların varlığının tesbiti, kanser tanısının konmasında önem arz etmektedir. Dolaşımda bulunan miRNA'ların farklı kanser türlerine göre farklılık göstermesi tanıda belirleyici markör olarak kullanılabilirliğinin göstergesi olmaktadır. Ayrıca serum ve plazmada bulunan miRNA'ların yanı sıra prostat masajı yöntemiyle elde edilen prostat sekresyon sıvısındaki miRNA'ların tespitinin PKa tedavisinde aydınlatıcı yöntem olacağı öngörülmektedir.

2.5. Prostat Bezi'nin Salgısı, İçeriği ve Fonksiyonları

Prostat sıvısı, prostat salgı bezinden ejakülasyon ile dışarı atılan ve seminal plazmayı oluşturan etmenlerden biridir. Semen sıvısına karışan prostat sıvısı ince ve alkalın PH'ya sahip süt görünümünde bir sıvıdır. Semen sıvısının %60'ı vesikulo'dan, %20'si prostat bezinden, %10'u küçük müköz bezlerle bulbouretralis'ten ve kalan %10'u ise duktus deferens'ten gelen salgılarla oluşmaktadır. Salgının bir kısmı idrarla esas kısmı ise ejakülasyonda semenle birlikte atılır⁴².

Prostatik sıvı; su, asit fosfataz, sitrik asit, kolesterol, kalsiyum, fosfolipitler, çinko, tamponlayıcı tuzlar, prostaglandinler, fibrinojen, antibiyotik olan seminalplasmin, β -mikroseminoprotein, PSA ve amilazdan oluşur. Bu salgılar ortamın asiditesini nötralize eder ve spermlerin hareketliliğini sağlar⁴³.

Prostat salgısındaki maddeler meninin 20-30 dakika içerisinde akışkan hale gelmesini sağlar. Prostat sıvısı baziktir. Kadınlarda vajina pH'sı asidik olup 3.5-4.0 civarındadır. Fertilizasyon için spermlerin hareketlilik göstermesi ve ortamın pH'sının 6.0-6.5 olması gerekmektedir. Prostat bezinin salgısının bazikliği ortamın pH'sını nötralize ederek spermlerin hareketliliğini sağlar. Seminalplazmin denilen antibiyotik, tetrasiklin, streptomisin ve penisilin'in antimikrobik etkisi gibi benzer aktivite gösterir. Vajinada bulunan bakteriler prostat sıvısında olan seminalplazmin sayesinde yok edilir ve vajinal ortamın enfeksiyona karşı maruziyeti engellenerek fertilizasyona kolaylık sağlanır.

Prostat bezinin epitel hücreleri tarafından salgılanan ürünlerden biri de protozomdur. Seminal plasma da çapları 50-800 nm olan küçük veziküller veya granüller olarak görünürler. Ejakülasyonla gelen prostat salgısında protozom seminal plazmanın bir bileşeni olur. Buna ek olarak protozom bütün sperm hücrelerini kapsar⁴⁴.

Prostat salgısındaki kolesterol içeren birçok vezikül daimi olarak sperm akrozomunu çevreleyen membrana geçerek yerleşir. Bu şekilde akrozom membranının sağlamlaşması sağlanarak enzimlerin serbestleşmesi de engellenir.

Ejakülasyon sonrası vajinada depolanan sperm ve kolesterol vezikülleri uterus sıvısına katılır. Sonraki birkaç saat içinde kolesterolün büyük oranda kaybolduğu görülür. Bunun sonucunda sperm baş tarafında bulunan membran zayıflar. Ejakülasyonla birlikte sperm baş bölgesindeki membranın kalsiyum iyonlarına karşı geçirgenliği artarak prostat sıvısında bulunan kalsiyumun sperme büyük oranda girmesi sağlanır. Bu durum sperm flegellatının aktivitesini değiştirir. Böylece sperm güçsüz, eski ve dalgalı hareketinin yerini güçlü hareketi alır. Sperm akrozom enzimlerinin hızlı ve kolayca serbest hale gelmesi kalsiyum iyonlarının akrozomun baş bölümündeki membranın intrasellüler yapısındaki değişikliklere bağlıdır. Bununla birlikte sperm, ovumu saran granülozaya doğru yol almasını sağlar ve ovumun zona pellucida kısmına girmeye gayret eder. Sperm fertilizasyonda ovuma gideceği yolu bulması bu değişikliklerle sağlanır⁴⁵.

2.6. MikroRNA

MiRNAlar, kodlama yapmayan, tek sarmallı yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda olan RNA'lardır. Öncü miRNA'lar birkaç yüz ila bin nükleotit arasında değişen uzun RNA'lardır. RNA polimeraz II enzimi tarafından üretilen öncü miRNA'lar önce kısa miRNA-miRNA duplekslerine, sonunda da tek sarmallı olgun miRNA'ya dönüştürülürler. Olgun miRNA'lar tam ya da tama yakın olan mRNA sıralarına bağlanıp hedefindeki genlerin ekspresyonunu transkripsiyon sonrasında ya translasyonu inhibe ederek ya da RNA degradasyonunu tetikleyerek inhibe eder⁴. miRNA'ların hedef mRNA'lara bağlanarak insan genlerinin %30-%90'ının ifadelerini düzenlediği tahmin edilmektedir⁴⁶. Son yıllarda bitki, virüs ve hayvan hücrelerinde miRNA'lar keşfedilerek toplam 25141 olgun miRNA'dan 2154'ünün insanlara ait olduğu belirlenmiştir⁴⁷⁻⁴⁹.

MiRNA'ların deregülasyonunun hücrel mekanizmalar üzerinde önemli etkisi vardır ve multifaktöryel bozukluklar ile bazı insan kanser türlerinin genetik patogenezinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir⁵⁰. Tümörlerde miRNA ekspresyonunun deregülasyonu hakkında yaygın veriler bulunmaktadır⁵¹. Bu değişiklikler; miRNA genlerinde, RISC grubu proteinleri ve miRNA yolağındaki proteinlerden sorumlu genlerde oluşan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır⁵². İnsan miRNA'larının kanser ile ilişkisi, genomdaki pozisyonları haritalanarak gösterilmiştir⁵³.

Tespit edilen miRNA'ların kromozom yerleşimleri, bazı kanser türlerinin gelişiminden sorumlu genetik değişikliklerle örtüşmektedir. MiRNA'ların çoğunlukla, heterozigotluğun kaybolduğu bölgeler olan kırılma bölgelerine yerleşik olduğu gösterilmiştir. Bu kırılma bölgeler amplifikasyonun çok az görüldüğü yerlerde veya kromozomal kırılma noktasının olduğu yerlerde gözlenmiştir⁵⁴. MiRNA'ların anormal ekspresyonu multifaktöryel bozukluklarda ve bazı insan kanser türlerinin genetik patogenezinde kritik bir rol oynadığı yapılan çalışmalarla tesbit edilmiştir⁵⁰.

Gen ekspresyonunun miRNA'lar aracılığıyla transkripsiyon sonrasında düzenlenmesinin keşfi hücre farklılaşması, organogenez gelişimini içeren biyolojik süreçler ve hastalıkların patogenezindeki genetik düzenlemelerin anlaşılmasında yeni bir olanak sağlamıştır⁵⁵⁻⁵⁷. Kanser patogenezinde rol alan miRNA'ların ifadeleri mikrodizin, qRT-PZR ve northern blot analizi yöntemleri ile profilenebilmektedir. Nitekim, birçok araştırma deregüle miRNA'ların tümör hücrelerinde hücre büyümesi, hücre invazyonu veya metastazı üzerinde etkili olduğunu göstererek bu deneysel yöntemlerin kullanışlı olduğunu kanıtlamıştır⁵⁸. Ayrıca, bu moleküllerin sıklığı ve benzersiz yapıları, biyolojik belirteç olmalarını ve tedavi amaçlı olarak kullanımlarına işaret etmektedir.

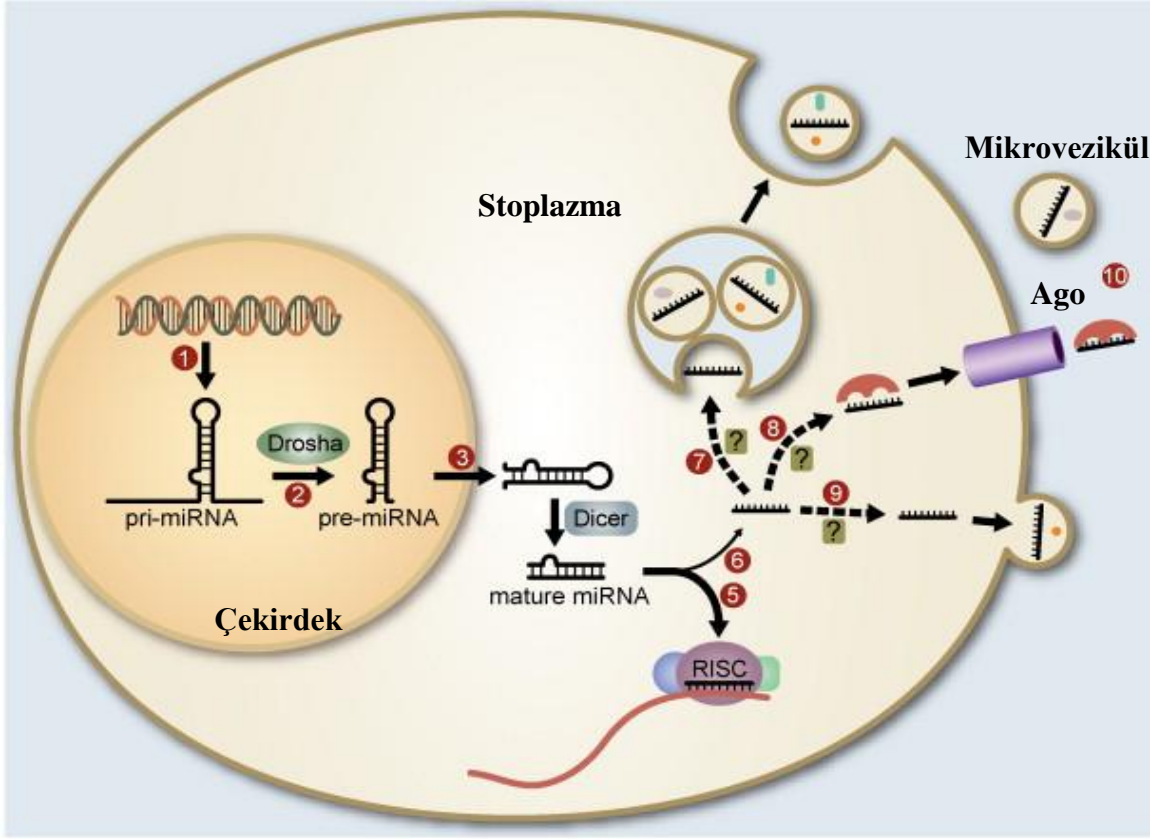
Son zamanlarda yapılan çalışmalar miRNA'ların klinik agresiflik gösteren ve nüks eden durumlarda prognostik belirteç olarak öne çıktığını göstermektedir. MiRNA'ların yeni kanser belirteci olarak birçok avantajlı özelliği vardır⁵⁹.

2.6.1. MiRNA'nın Oluşumu ve İşlenmesi

MiRNA'lar gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrasında düzenleyerek gen ifadesini etkiler, proteine çevrilmeyen genler tarafından kodlanırlar. MiRNA'lar pri-miRNA (primer) olarak transkript olurlar. Birer başlıktan ve poli-A kuyruğundan oluşan bu transkriptler, hücre çekirdeğinde yaklaşık 70 nükleotitten oluşan pre-miRNA (prekürsör) denen öncül yapılara dönüşür⁶⁰. Drosha ve çift iplikli RNA bağlayan Pasha (DGCR8) protein grublarından oluşan mikroişlemci kompleks miRNA'ların yazılımını sağlar⁶¹.

Bölünmüş, küçük hairpin pre-miRNA GAN-GTP mekanizmasıyla Exportin 5 tarafından stoplazmaya taşınır. Pre-miRNA'lar aktif halde bulunmazlar ve stoplazmada Dicer endonükleazıyla birleşerek olgun miRNA'lara dönüşürler. Bu bölünme çift zincirli RNA bağlama alanı (dsRBD) ve TRBP/PACT ile aynı zamanda RNAz III enzim kompleksini oluşturan Dicer tarafından katalizlenir⁶².

miRNA'ların ekspresyonundan ve RNA interferanstan (RNAi) köken alan RNA indüklenmiş susturma kompleksinin (RISC) oluşumu Dicer ile başlar⁶³. Dicer pre-miRNA ipliğini kestikten sonra tamamlayıcı iki kısa komplementer RNA molekülü oluşur. Bu iki RNA molekülünden 5'ucu kararlı olan zincir, RISC kompleksinde bulunan RNAz işlevi olan Argonat aracılığıyla bu komplekse dahil edilir. Bu iplik klavuz olan ipliktir⁶⁴. RISC kompleksinin substratı olan diğer ipliğe anti klavuz denir. miRNA'lar RISC kompleksine bağlandıktan sonra komplementer mRNA'larla baz eşleşmesi yaparak Argonat proteinleri mRNA'ların yıkımını sağlar⁶⁵. (Şekil 2-3)



Şekil 2-3: miRNA'ların biyogenezi ve miRNA'nın transkripsiyon sonrası regülasyon mekanizması

1) RNA polimeraz II tarafından pri-miRNA transkriptinin transkripsiyonu ile başlar. 2) Çekirdekte pri-miRNA'lar, pre-miRNA hairpini oluşturmak için Drosha tarafından işlenir, 3) Exportin 5 ile sitoplazmaya taşınırlar. 4) pre-miRNA hairpinleri Dicer tarafından 18-24 nükleotid olgun miRNA dublekslerine dönüştürülür. 5) RISC kompleksinde yer alan Argonat protein, olgun miRNA'da ki daha kararlı olan dubleks ipliğinden birini, hedef mRNA'ların ekspresyonunu düzenlemek için RISC kompleksine dahil eder. 6) Diğer iplik degrade edilir veya hücrenin dışına atılması için hazırlanır. 7) Bazı miRNA'lar multiveziküler cisimlerden elde edilen eksozomlarda paketlenmiş olarak bulunur. 8) Diğer miRNA'lar RNA'ya bağlayan proteinlerin varlığında ihraç edilebilir. 9) Yine bazı miRNA'lar, hücre zarının kabarcık oluşturduğu sırada (membrane blebbing) mikroveziküller yoluyla hücre dışına verilebilirler. 10) Ekstraselüler alanda bu miRNA'lar diğer hücreler tarafından alınabilir, RNaz tarafından parçalanır veya vücuttan atılabilirler. Etheridge⁶⁶ den değiştirilerek alınmıştır.

2.7. Prostat Kanseri'nde MiRNA Ekspresyonu'nun Profillenmesi

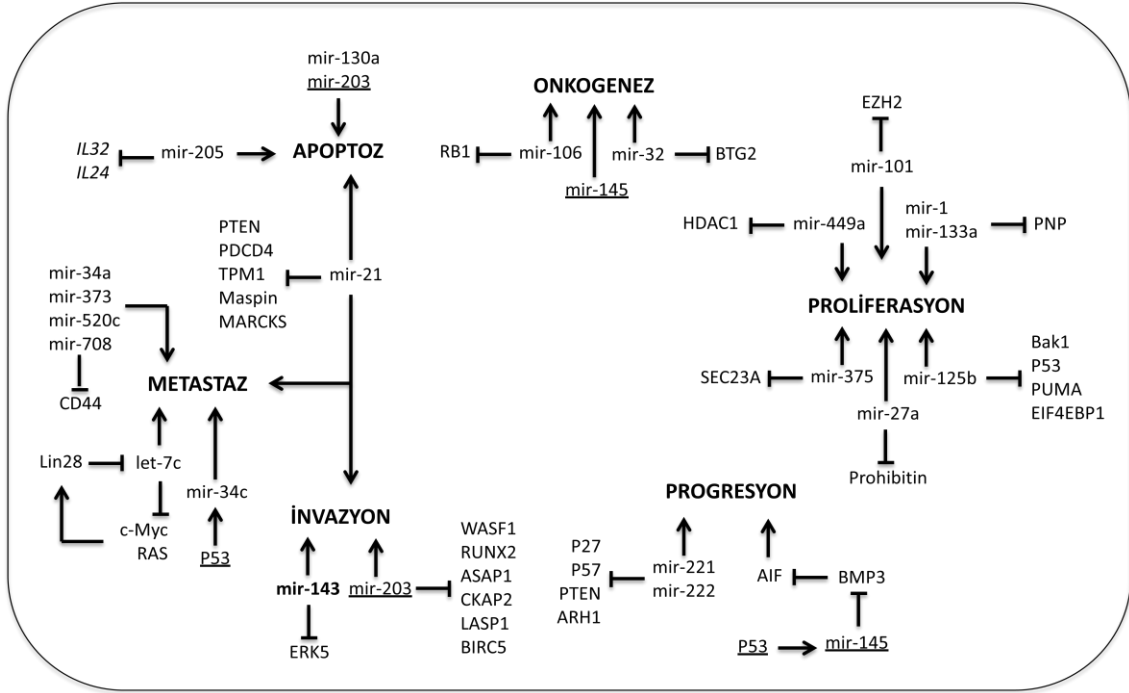
Bazı moleküler değişiklikler PKa'nın tümörögenezine ve progresyonuna neden olmaktadır. Tümörlerdeki genetik değişikliklerde belirli miRNA'ların etkisi vardır. Yapılan ekspresyon profillemeye çalışmaları sonucunda bir kısım miRNA'ların belirgin oranlarda artış yada azalış gösterdiği bildirilmiştir⁴⁵. Bu sonuç PKa'nın miRNA'ların tümör patogenezi ve sürecindeki önemli rolünü göstermektedir. PKa'da genomda yaygın olarak tanımlanan lokuslardaki epigenetik susturulmayı % 30 oranında miRNA'ların etkilediği öne sürülmüştür. Örneğin, anormal metilasyonun gerçekleşmesi miR-145'in baskılanmasına yol açar⁶⁷.

MiRNA'lar; temel olarak hedef mRNA'nın türüne veya tümör süpresör ve onkogenlerin ekspresyonlarında oluşan değişikliklere göre sınıflandırılırlar. Tümör süpresör miRNA'lar (TSMiR) hedef onkogenlerin protein ürünlerini koruyarak onları normal seviyede tutmayı sağlarlar ve yaygın olarak tümörlerde azalış gösterirler. Onkomirler hedef tümör süpresörlerin transkriptini ve tümör süpresör genlerde tümör oluşumunu yaygın olarak arttırırlar⁶⁸.

Belirli miRNA'lar farklı kanser türlerinde özellikle deregüle olurlar. Bunların arasında miR-21, miR-291 ve miR-17-5p solid tümörlerde belirgin şekilde artış gösterir ve bu yüzden onkomirler olarak isimlendirilirler⁶⁹. Bireysel çalışmalarda onkomirlerin fazla ekspresyonlarının tümörögenezine neden olduğu ve apoptoz mekanizmasının kısıtlanmasına veya poliferasyon oranındaki düşüşe sebebiyet verdiği görülmüştür⁷⁰.

TSMiR'ler, onkomirlerin tam tersi rol oynar. TSMiR'lerin kanserde ekspresyonu azalmıştır ve bu miRNA'ların fazla ekspresyonu poliferasyon, invazyon ve poliferasyon kapasitesini kısıtladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir⁶⁸. En iyi bilinen tümör süpresörler arasında mir-205, mir-145, mir-34c ve let-7c bulunmaktadır⁷¹. Örneğin let-7 ailesine ait miRNA'ların RAS genini negatif olarak regüle ettiği gösterilmiştir⁷². PKa'lı dokularda mir-130a, mir-205 ve mir-203'ün ekspresyon seviyesinde azalış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur^{73,74}.

PKa patogeneziyle ilişkilendirilen önemli miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedefi olarak belirlenen genlerin şematik gösterimi Şekil 2-4'te verilmiştir.



Şekil 2-4: PKa patogeneziyle ilişkilendirilmiş miRNA'lar ve doğrulanmış hedeflerinin şematik gösterimi

Şekilde bir kereden fazla bahsi geçen miRNA ve genler altı çizili olarak gösterilmiştir.

Özen ve ark.⁷⁵ dan değiştirilerek alınmıştır.

İyi huylu hiperplazik veya iyi huylu tümürlü dokularla prostat kanserli hastalar karşılaştırıldığında mir-16 seviyesinde azalma gözlenmiştir⁷⁶. Tam tersi olarak PKa'da mir-125b'nin hedef genlerinde gözle görülür oranda artış gösterdiği tesbit edilmiştir⁷⁷.

Normal dokular ile kanserli dokular karşılaştırıldığında, kanserli dokuda miRNA'ların değişen düzeylerde ekspresyon eğilimi göstermeleri miRNA'ların insan kanserlerini sınıflandırmada gelecek vadede bir araç olduğunu düşündürmektedir⁷⁸. Ayrıca miRNA'ların amplifikasyon, delesyon ve epigenetik susturmaya dayalı ifadelerindeki değişimleri klinik tanı veya prognostik biyolojik göstergelerin gelişimine neden olabilir⁶⁸. PKA'da farklı olarak eksprese olan miRNA'ların etkili oldukları genlerin listesi Tablo 2-1'de verilmiştir.

Tablo 2-1: PKa'da belirlenen miRNA'lar ve bunların biyolojik olarak doğrulanmış hedef genlerinin listesi Özen ve ark.⁷⁵dan değiştirilerek alınmıştır.

miRNA	Hedef Gen
let7	HMGA2, RAS, Myc
mir-1; mir-133a	PNP
mir-21	PTEN, PDCD4, TPM1, Maspin, MARCKS, RECK
miR-27a	Prohibitin
mir-32	BTG2, Bim
miR-34; miR-373; miR-520c;	CD44
miR-708	
miR-101	EZH2
miR-106a	RB1
miR-106b	E2F1
miR-125b	Bak1, p53, PUMA, EIF4EBP1
miR-143	ERK5
miR-145	BNIP3, CCNA2
miR-203	CKAP2, LASP1, BIRC5, WASF1, ASAP1, RUNX2, XEB2, Bmi
miR-205	IL24, IL32
miR-221/222	p27, p57, PTEN, ARH1
miR-375	Sec23A
miR-449a	HDAC1
miR-708	AKT2

2.8. Kanserli Hastaların Vücut Sıvılarında Bulunan MiRNA'lar

MiRNA'lar çoğunluğu hücre içinde yer alırken, birçok miRNA vücut sıvıları da dahil olmak üzere hücre dışında gözlenmiştir.

MiRNA'lar; insan ve fare mast hücreleri⁷⁹ dahil olmak üzere, plazma⁸⁰, tükürük⁸¹, idrar⁸², glioblastom tümörleri⁸² gibi çeşitli kaynaklardan köken alan eksozom ve mikroveziküllerde tanımlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada sağlıklı kontrollerin yanısıra, akciğer kanserli hastalarda, kolorektal kanserli hastalarda ve diyabet hastalarında Solexa dizileme yöntemiyle serum miRNA'ların varlığı bulunmuştur. Sağlıklı kontrol gruplarının serumlarında hastalığa özgü miRNA'ların olmayışı, insanlarda ilişkili hasta serumlarında bu hastalıklara özgü miRNA'ların var olabileceğinin önerilmesiyle sonuçlanmıştır. Bu çalışma ile ekstrasellüler miRNA'ların analizi sağlanarak kanserlerin tanısına yönelik kullanılabilirliği gösterilmiştir⁸³.

MiRNA'lar farklı sıvı tipleri arasındaki RNA'ların aksine stabil ve belirgin şekilde ekspresyon profilleri gösterirler⁸⁴⁻⁸⁶. Dolaşımdaki miRNA'lar hücre içermeyen serum benzeri vücut sıvılarında RNAz'a, pH'ya ve sıcaklığın yüksek değişkenliğine karşı dayanıklıdır⁸³. İnsan vücut sıvılarında dolaşan miRNA'ların öncelikle serum ve plazmadaki varlığı kanser tanısının konması için önem arz eder⁸⁷. Plazma, idrar veya anne sütü gibi insan vücut sıvılarında 200-500 arasında miRNA qPCR ile tespit edilmiştir. Vücut sıvılarında miRNA'ların tespiti kanser hastalarının tanısı için umut verici noninvaziv bir tanı yöntemidir⁸⁴.

MiRNA'ların dolaşıma katılma mekanizması henüz tartışmalara açık olsa da dokuların hasarı sonucu pasif olarak dolaşıma sızmaları öngörülmektedir. Aktif olarak vücut sıvısındaki miRNA'ların iki tip hücre kökenli lipid vezikülleri olan mikrovezikül ve eksozomdan köken aldığı tanımlanmıştır. Mikroveziküller nispeten büyüktür (~ 100 nm 1 mikron) ve bu veziküller kabarcık oluşturarak hücreden salınırlar. Eksozomlar ise yaklaşık 30-100 nm büyüklüğünde küçük veziküller olup endozomlardan oluşan multiveziküler yapıların plazma membranıyla birleşmesi sonucunda oluşur. Eksozomlar, epitel hücreleri, T ve B hücreleri, dentrik hücreler ve kanser hücreleri gibi çeşitli hücrelerden salgılanmalarının yanısıra plazma, serum, tükürük, anne sütü ve ürün gibi vücut sıvılarında da bulunurlar⁸⁸.

Örneğin, anne sütünde varlığı gösterilen mir-181 ve mir-155'in ekspresyon seviyesinin insan serumunda da benzer miktarlarda bulunduğu tesbit edilmiştir⁸⁹. Bunun tam tersi olarak miR-223'ün insan serumunda güçlü ekspresyonu gösterdiği anne sütündeki varlıklarının ise çok daha az olduğu yapılan çalışmalarda tesbit edilmiştir⁸⁰.

MiRNA'ların modülasyonu ile ilgili ilk çalışma olan B hücre lenfoma hastalarının serumlarında mir-21 seviyesinin yüksek olması hastalığın tekrarlamadığı bireylerin hayatta kalma oranlarıyla ilişkilendirilmiştir⁹⁰. Serum ya da plazmada yüksek mir-21 seviyesinin, lenf nodu metastazı, ileri klinik evre ve NSCLC'de zayıf yaşam şansı olan hastalarla da güçlü derecede ilişkilendirilmiştir⁹¹.

Kanser hastalarında mikroveziküllerdeki belirgin miRNA'lar invazyon, metastaz ve anjiyogenez gelişimde belirleyici olabilmektedir⁹². Kanserli hastalarda hücre içermeyen periferik kan serumunda miRNA'ların analizi yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada akciğer kanserli hastaların serumları, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en belirgin deregülasyona uğrayan mir-16'nın aynı zamanda internal kontrol olarak en çok kullanılan mir'lerden olduğu tesbit edilmiştir⁹³.

Başka bir çalışmada meme kanseri hastalarının serumlarında mir 10b ve -34a'nın ekspresyon seviyelerinde azalış, mir-195 ve let7a'nın serum seviyelerinde ise artış saptanmıştır^{94,95}. Vücut sıvılarından olan idrar örneklerinde mir-126 ve mir-182'nin seviyeleri mesane kanserlerinin varlığını belirlemek için kullanılabilceği gösterilmiştir⁹⁶. Tükürükte ise mir-125a ve mir-200a düzeylerinin azalması ağız içi skuamöz hücre karsinomları ile ilişkilendirilmiştir⁹⁷.

2.9. Prostat Kanserli Hastaların Vücut Sıvısında Bulunan MiRNA'lar

Birçok araştırmacı, vücut sıvılarındaki (serum, plazma, idrar gibi) miRNA'ların eldesinin kolay olması ve belli bir fizyolojik veya patolojik bir durumu yansıtmasından dolayı yeni biyolojik markır arayışı için dünya çapında sayısız çalışmalar yapmıştır.

Örneğin yapılan bir çalışma sonucunda serum mir-16 düzeyinin, prostat kanserli hastalarda cerrahi sınır için gereken seviyeye ilişkisinin olduğu bulunmuştur⁹⁸. Özellikle umut vadeden mir-141 ve mir-375'in bağımsız çalışmalar arasında tanısıl ve prognostik belirteçler olarak kullanılması önerilmiştir⁷⁴. mir-141, kısmen serum PSA düzeyi ile de ilişkilendirilmiş⁸⁷ ve ileri evredeki PKa'lı hastaların serum seviyelerinde de artış gösterdiği saptanmıştır⁹⁹.

Dolaşımda bulunan mir-21 ve mir-221'in pPKa'lı hastaların serumunda ve tümör dokularındaki deregülasyonları tespit edilmiştir¹⁰⁰. Yüksek riskli prostat kanseri hastaların serumlarında mir-93 seviyesi de yüksek olarak bulunmuştur⁹¹. Prostat tümörü dokularındaki gibi artış gösteren mir-20a, mir-25, mir-93 and mir-106b'ler vücut sıvılarındaki artış sebebiyle tanıya yönelik çalışmalar için aday gösterilmektedir¹⁰¹. Bunların yanı sıra sağlıklı bireylerle 2. ve 3. aşamadaki PKa'lı hastalar karşılaştırıldığında mir-16, -92a, -103, -107, -197, -34b, -328, -485-3p, -486-5p, -92b, -574-3p, -636, -640, -766, -885-5p'lerin serum seviyelerinde artış gözlenmiştir¹⁰².

PSS'lerde miRNA'ların varlığı literatürde bulunmamaktadır. Yapılan çalışmada PKa'lı ve BPH'lı hastalardan alınan PSS'lerde miRNA'ların varlığının literatürde ilk defa tesbiti ve bu sıvıların miRNA profillerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde prostat masajı yöntemiyle elde edilen PSS örneklerinde anlamlı olarak eksprese olan miRNA'ların, PKa tanısı için rutin muayenede güçlü bir non-invaziv yöntem olarak kullanılabilceği gösterilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örneklerin Eldesi

Çalışmaya dahil edilen 23 PKa'lı ve 25 BPH'lı hastadan gönüllü onam formu doldurması istendi ve İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurul Raporu alınarak çalışmalar yapıldı. Tanısı konan bireylerden temin edilen prostat sekresyon sıvı (PSS) örnekleri İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniğinden temin edildi. PKa ve BPH'lı hastalardan alınan PSS'ler, prostat masajı (PM) yöntemiyle prostata sistematik olarak tabanından apekse ve yandan orta hatta kadar basınç uygulanarak elde edildi. PM yardımıyla alınan PSS'ler 1.5 ml eppendorf tüplere konulup sıvı nitrojende hızlıca donduruldu. Soğuk zincirde bölümümüze getirilen bu sıvılar kullanılacakları zamana kadar -80 °C'de saklandı.

3.1.2. Gereç ve Cihazlar

3.1.2.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

- Buzdolabı (4 °C) (Vestel, Türkiye)
- Derin Dondurucu (-20°C) (Vestel, Türkiye)
- Derin Dondurucu (-80°C) (Wisd, DAIHAN Scientific, Kore)
- Nanodrop spektrofometre (Thermo Scientific-ND 2000c, Almanya)
- Laminar air-flow (Class II Safety Cabinet) (Metisafe, Türkiye)
- Mikropipet (Thermo Scientific, Almanya)
- Mini Santrifüj (Thermo Scientific, Almanya)
- Santrifüj (Hettich Retina 420R, Almanya)
- Hibridizasyon Etüvü (Shel Lab, Oregon, ABD)

- Termal döngü cihazı (PZR) (Techne-TC 5000, ABD)
- Vorteks (Wise Mix-VM10, Kore)
- 0.2-1.5 ml Eppendorf (Nest Biotechnology, Çin)
- Roche LightCycler 2.0 (Basel, İsviçre)
- RNA İzolasyon Kiti ("mirVana PARIS kit" (Ambion, Darmstadt, Almanya))
- Agilent miRNA Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Agilent Human miRNA Microarray (V4) Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Slayt koruyucu (Ozon bariyer) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Gasket slayt (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Pens
- Chamber (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Agilent Microarray Scanner with Surescan High Resolution Technology (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- LightCycler® Capillaries (20 µl) - Roche Applied Science(Basel, İsviçre)
- Moleküler Genetik uygulamaları için gerekli diğer sarf malzemeler

3.1.2.2. Solüsyonlar

- RNA İzolasyon Kiti ("mirVana PARIS kit" (Ambion, Darmstadt, Almanya))
- Agilent miRNA Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD)
- TaqMan miRNA Assay (hsa-miR-361-3p, -203, -133b ve -221) (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD)
- TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD)
- GE Wash Buffer I (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- GE Wash Buffer II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Cyanine 3 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)

3.1.2.3. Bilgisayar Programları

- Feature Extraction v10.7.3.1 (Agilent Technologies, CA, ABD)
- Bioconductor Software
- SPSS 15.0

3.2. Yöntem

3.2.1. Total RNA İzolasyonu

MiRNA'ları da içeren total RNA izolasyonu için BPH ve PKa hastalarından eşit miktarlarda PSS'leri alınarak "mirVana PARIS kit" protokolüne göre RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Prostat sekresyon sıvılarından her bir örneğe 300 µl "Lysis Binding Solution" eklenerek karışımlar vortekslendi. 30 µl miRNA "Homogenate Additive" eklenerek vorteks işlemi tekrarlandı. Karışımlar 10 dakika buzda bekletildikten sonra 300 µl asit fenol kloroform eklenerek 30-60 saniye vortekslendi. Örnekler daha sonra oda sıcaklığında maximum hızda (10.000xg) 5 dakika santrifüjlendi. Üstteki renksiz faz RNA'yı, ara faz yüksek moleküler ağırlıklı DNA'yı, alttaki faz ise ekstrasellüler membranı ve polisakkaritleri içerir. Üstteki faz (RNA) yeni bir tüpe aktarıldı. Alınan üst sıvının miktarı not edildi. Yeni tüpe aktarılan üst fazın 1.25 katı kadar %100 etanol (oda sıcaklığında bulunan) eklenerek karışımlar kolonlu tüplere taşındı. 15 saniye 10.000xg de santrifüjlendikten sonra 700 µl "mirVana Wash Solution 1" eklenerek 5-10 saniye santrifüjlendi. Alt tüpteki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolonlara 500 µl "mirVana Wash Solution 2-3" ilave edilerek 5-10 saniye santrifüjlendi. Alt sıvı dökülerek "500 µl Wash Solution 2-3" ile aynı işlem tekrarlandı. Kolonların yıkanması işlemi sonrasında alt sıvı uzaklaştırılarak tüpler boş döndürüldü.

Filtreli kolonlar temiz ependorf tüpe aktarılarak üzerlerine önceden 95°C sıcaklığa ısıtılan 30 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Ardından ürünler oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildikten sonra 20-30 saniye maksimum hızda santrifüjlenerek total RNA eldesi gerçekleştirildi. RNA'lar kullanılacakları zamana kadar -80°C'de saklandı.

3.2.2. RNA Derişimlerinin Belirlenmesi

Spektrofotometre ile ölçülen 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri kullanılarak, RNA örneklerinin derişimlerinin ve saflık derecelerinin hesaplanması, karşılaştırılması ve sonuçların deneysel uygulama aşamaları açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. İzole edilen RNA örneklerinin NanoDrop ND-2000c spektrofotometre cihazında 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlendi. RNA derişimi aşağıdaki formülde gösterildiği gibi absorbans değerinin, DNA katsayısı ve sulandırma katsayısıyla çarpılmasıyla hesaplandı.

$$\text{RNA derişimi } (\mu\text{g/ml}) = (\text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme katsayısı} \times 40 \mu\text{g/ml}) / 1000$$

Absorbans değerinin “1” oluğu 1 cm³’lük küvette 50 µg/ml miktarında çift zincirli DNA’yı, 33 µg/ml tek zincirli oligonükleotidleri ve 40 µg/ml ise tek zincirli RNA’yı temsil etmektedir.

Bunu yanı sıra örneklerin saflığı, spektrometrede 260 nm ve 280 nm ile yapılan ölçümlerin karđılađtırılmasıyla elde edildi. 260/280 oranı, örneklerin saflığının bir ölçüsü olup RNA için en ideal değer 2’dir.

3.2.3. MiRNA Mikrodizin İğaretleme Ve Hibridizasyon

4 PKa’lı ve 4 BPH’lı PSS rneklerinin miRNA profillerinin belirlenmesi iğlemi “Agilent Human miRNA Microarray (V4)” kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun olarak ağağıdaki gibi yapıldı.

Örneklerin RNA deriğimleri 50 ng/µL olacak Şekilde ayarlandı ve RNA’lar “Agilent miRNA Labeling and Hyb Kit” protokolüne göre Cyanine 3 (Cy3) boyası ile iğaretlendi.

RNA’ların iğaretlenmesi iğlemine defosforilasyon ağaması ile bağlandı. RNA dizilerinin 5’ P uçlarının defosforilasyonu T4 RNA ligazın RNA’lara Cy3 boyalarını ekleyebilmesi için gereklidir. Defosforilasyon karığımı Tablo 3-1’de belirtildiği Şekilde hazırlandı.

Tablo 3-1: Defosforilasyon karığımı bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µL) her bir reaksiyon için
10x calf intestinal phosphatase buffer	0.65
Spike-in Labelling	1.1
Calf intestinal phosphatase	0.25

Bu karışıma total RNA'dan 2,2 μL eklenerek defosforilasyon karışımının toplam hacmi 4 μL olacak şekilde ayarlandı. 37°C'de 30 dakika inkübe edilen karışımın bir sonraki aşamada denatürasyonu için her bir tüpe 2,0 μL DMSO ve 0,8 μL dH₂O eklenmesinin ardından 100°C'de 10 dakika inkübe edilerek soğuk su banyosuna transfer edildi. DMSO, 3' ucu defosforile edilen RNA'ların kendi üzerlerine nonspesifik katlanmaların önlenmesine yardımcı olur.

Örneklerin işaretlenmesi işlemi "T4 RNA Ligaz" enzimi tarafından Cy3 boyası kullanılarak gerçekleştirildi. Ligasyon karışımı için Tablo 3-2'te verilen değerler kullanılarak toplam reaksiyon hacmi 11,3 μL olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 3-2: Ligasyon karışımı bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar (μL) her bir reaksiyon için
10x T4 RNA Ligase buffer	3.25
Cyanine3-pCp	1.0
T4 RNA Ligase	0.25

Ligasyon karışımı 16°C'de 4 saat inkübe edildi. Ardından örnekler 45°C'de 1,5 saat boyunca vakumlu santrifüjde kurutuldu. Örnekler 18 μL nükleaz içermeyen suda çözülerek hibridizasyon işlemine hazır hale getirildi.

Hibridizasyon karışımı için aşağıdaki Tablo 3-3'de verilen değerler kullanıldı.

Tablo 3-3: Hibridizasyon karışımı bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µL) her bir rxn için
İşaretli miRNA örneği	17.0
10x GE Blocking agent	2.25
Hibridizasyon Spike-in	1
dH ₂ O	2.25
2x Hi-RPM Hybridization Buffer	22.5
Toplam Miktar	10.0

Toplam hacmi 45 µL olacak şekilde hazırlanan hibridizasyon karışım 100°C’de 5 dakika inkübe edildikten hemen sonra soğuk su banyosunda 5 dakika bekletildi. Boya ile işaretlenen örnekler, Sanger miRBase (release 16)’da bulunan 144 virüs miRNA’sı, 1205 insan miRNA’sı ve kontrol miRNA’ları hedefleyen toplam 1349 probdan oluşan Agilent 8x60K miRNA microarray V4 çipi ile 20 saat 55°C’de hibridize edildi. Bu sırada yıkama işlemi için gereken “GE Wash Buffer II” solüsyonu 37°C’de 24 saat bekletilmek üzere etüve konuldu.

3.2.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Ve Slaytların Taranması

Hibridize edilen microarray çipi “GE Wash Buffer I” solüsyonunda pens yardımıyla slayttan ayrılarak “GE Wash Buffer I” içerisinde 5 dakika çalkalandı ve kurutuldu. Sonrasında, örnekler “GE Wash Buffer II” solüsyonunda 37°C’de 5 dakika bekletildi. Kuruyan slayt, tarayıcıyla okutulmadan önce üzerine slayt koruyucu yerleştirildi.

Slaytın taranması işlemi “Agilent Microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology” cihazında gerçekleştirildi. Slayt, mikrodizin V4 için uyarlanan grid dosyaları kullanılarak tarandı. Elde edilen tarama görüntüsü “Feature Extraction v10.7.3.1” programı kullanılarak işlenmemiş ham data ve tarama kalitesini gösteren QC raporu elde edildi.

3.2.5. Mikrodizin Veri Analizi Ve İstatistiksel Analiz

Sonuçların analizi Baylor College of Medicine Dan Duncan Kanser Merkezi biyoinformatik grubundan Dr. Chad J. Creighton tarafından gerçekleştirildi. MiRNA mikrodizin veri analizinde ilk olarak kantitatif bir karşılaştırma yapılabilmesi ve deneyde çıkabilecek ikilemlerin giderilebilmesi için işlenmemiş ham datanın R tabanlı istatistiksel hesaplama ve veri analizi için grafiksel çizimlerin yapılmasına olanak sağlayan bilgisayar programı olan “bioconductor” yazılımı aracılığıyla kuantil normalizasyonu gerçekleştirildi¹⁰³.

Normalizasyon işleminde kontrol problemlerinden elde edilen değerler kullanıldı. Normalizasyon sonrasında her bir miRNA probu için örnekler arasındaki ifade değişimini gösteren kat değişimi ve bu değişimin anlamlı olup olmadığını gösteren P değerleri her miRNA için log₂ ekspresyon değeri kullanılarak hesaplandı. Bu sonuca göre her bir PKa örneği BPH örnekleri ile karşılaştırıldığında kat değişimi 1.4’ten fazla veya 0.7’den küçük olan olan miRNA’lar seçildi. İstatistiksel analiz sonucunda P değeri 0.01’in altındaki değerler anlamlı olarak kabul edildi.

3.3. qRT-PZR ile miRNA Ekspresyon Seviyesi Analizi

3.3.1. cDNA Sentezi

25 BPH'lı ve 23 PKa'lı hastaların PSS'lerinden elde edilen total RNA örneklerinin derişimleri 15 ng/ml olacak şekilde ayarlandı. Analiz sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterdiği belirlenen aynı zamanda PKa ile ilişkilendirilen ve daha önceki çalışmalarda vücut sıvılarındaki varlıkları tesbit edilen mir-361-3p, -203, -133b, -221 ve iç kontrol olarak kullanılan RNU6B'nin, miRNA TaqMan Assay primerleri ve TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit'i kullanılarak Tablo 3-4'de verilen bileşen ve miktarlar doğrultusunda miRNA cDNA sentez karışımları hazırlandı.

Tablo 3-4: miRNA cDNA sentezi karışımı bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µL) her bir rxn için
Kalıp RNA (15 ng/µL)	2.0
10X RT buffer	0.75
miR-spesifik primer	1.5
dNTP karışımı	0.075
RNase inhibitor	0.094
Reverse Transkriptaz	0.8
Toplam Miktar	10.0

3.4. qRT-PZR

25 BPH ve 23 PKa'lı hastanın PSS'lerinden elde edilen RNA'ların "Taqman Reverse Transcriptase Kit"leri ile cDNA'larının oluşturulmasının ardından, miR-361-3p, -203, -133b ve -221 ifade değişimleri kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi ile konfirme edildi. RNU6B, miRNA ifade analizinde iç kontrol olarak kullanıldı. Elde edilen sinyaller kontrol sinyallerine oranlanarak normalize edildi ve rölatif kantitasyon değerleri hesaplandı.

"TaqMan Universal Master Mix, Applied Biosystems" ile hazırlanan real time reaksiyon karışımları Tablo 3-5'de verilen değerlere göre hazırlandı.

Tablo 3-5: Gerçek zamanlı PZR reaksiyon karışım bileşen ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µL) her bir rxn için
2x Taqman Universal Master Mix	5
Taqman prob	0.5
cDNA	2
dH ₂ O	2.5
Toplam Miktar	10.0

Hazırlanan karışımlar Roche LightCycler 2.0 cihazı kullanılarak aşağıda 3-6'da verilen kondisyonlara göre gerçek zamanlı PZR işlemine tabi tutuldu.

Tablo 3-6: Real Time PZR kondüsyonları

Program	Sıcaklık	Süre	Siklüs
Preinkübasyon	95 °C	10 dakika	1
	95 °C	15 saniye	
Amplifikasyon	60 °C	40 saniye	40
	72 °C	1 saniye (okuma)	
Soğutma	95 °C	30 saniye	1

Her bir örnek için gerçek zamanlı PZR işlemi en az iki tekrarlı olacak şekilde yapılarak ortalama Ct değerleri hesaplandı. Rölatif kantitasyon analizi delta-delta-Ct metodu kullanılarak tanımlandı.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler log-dönüştürülmüş veriler üzerinde “two-sided Student’s t-test” kullanılarak gerçekleştirildi. P-değeri<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hata çubukları \pm standart hata değerleri kullanılarak çizilmiştir. Standart hata değerleri standart sapma değerlerinin örnek sayısının kareköküne bölünmesiyle elde edilmiştir. SPSS 15.0 kullanılarak “Receiver Operating Characteristic (ROC)” eğrileri çizildi ve PSA ve tespit edilen miRNA’ların PKa’lı ve BPH’lı hastaları ayırt edebilme kuvvetleri belirlendi.

ROC eğrisi; birden çok test etkinliğinin karşılaştırılmasında, bu testlerin ayırt etme gücünün tespitinde, tanı etkinliklerinin karşılaştırılmasında ve pozitif eşik değerlerinin saptanmasında kullanılan istatistiksel bir yöntemdir¹⁰⁴.

ROC Analizi, istatistik değerlendirmelerde duyarlılık ve özgüllük değeri kullanarak tanı koymada oluşabilen sakıncaları yok etmek için kullanılır^{105,106}. ROC eğrisinin dikey ekseninde değişik eşik değerleri tanımlayan doğru pozitiflik (duyarlılık), yatay ekseninde ise yanlış pozitiflik (1-özgüllük) oranları bulunur. ROC eğrisinde bulunan tüm noktalar değişik eşik değerlerine rastlayan duyarlılığı ve 1-özgüllük değerlerini tanımlar^{107,108}. Tanı testinin yeterliliği, ROC eğrisinin altındaki alan olan AUC (Area Under Curve) değeri ile belirlenir. AUC değerinin yüksek oluşu testin mükemmel yakın sonucuyla tanımlanabilir¹⁰⁹. ROC eğrisi, X=Y fonksiyonuna yakın olduğunda testin başarı oranı azalır. Referans çizgi olarak (0, 0) ile (1, 1) noktalarının birleştiği köşegen çizgi baz alınır. Bu çizgiye yakın ROC eğrileri için yararsız tanı olduğu sonucuna varılır^{108,110}. Birden çok yöntemin tanıdaki yeterliliğinin kıyaslanması eğri altındaki alanların karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilir¹¹¹.

4. BULGULAR

İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniği tarafından 23 PKa'lı ve 25 BPH'lı hasta klinik ve patolojik incelemeye tabi tutulmuştur. Hasta bilgilerinin etik açıdan gizli tutulması gerektiğinden PSS'leri alınan hastalar tarafımızdan numaralandırılmıştır. Bu hastaların tanılarının konulmasının ardından PSS'leri temin edilmiş ve patoloji sonuçları incelenerek; hastaların yaşı, PSA değerleri ve PKa'lı hastaların Gleason skorları Tablo 4-1'de verildiği gibi kayıt altına alınmıştır.

Tablo 4-1: BPH ve PKa'lı hastaların Yaş, PSA, PKa'lı hastalara ait Gleason Skor değerleri

BPH			PKa			
Hasta No	Yaş	PSA	Hasta No	Yaş	PSA	Gleason Skor
BPH 1	73	5.4	PKa 1	62	7	6
BPH 2	73	10.4	PKa 2	75	10.8	6
BPH 3	71	5.1	PKa 3	69	8.5	6
BPH 4	67	6.37	PKa 4	71	6.78	6
BPH 5	68	10.3	PKa 5	51	7.7	5
BPH 6	66	3.84	PKa 6	72	7.3	6
BPH 7	50	11.97	PKa 7	61	4.68	6
BPH 8	65	60.16	PKa 8	71	100	7
BPH 9	51	0.68	PKa 9	69	25.57	6
BPH 10	49	8.24	PKa 10	67	9.05	7
BPH 11	55	131	PKa 11	61	7.35	6
BPH 12	62	5.02	PKa 12	62	9	7
BPH 13	45	6.66	PKa 13	65	10.38	6
BPH 14	68	5.22	PKa 14	72	10.37	8
BPH 15	65	11.28	PKa 15	65	27	7
BPH 16	68	6.79	PKa 16	66	39.63	7
BPH 17	70	13.95	PKa 17	68	13.65	6
BPH 18	72	N.A	PKa 18	72	5.72	6
BPH 19	74	9.14	PKa 19	60	5.86	6
BPH 20	70	N.A	PKa 20	68	N.A	6
BPH 21	64	8.08	PKa 21	75	12.77	6
BPH 22	71	4.83	PKa 22	77	7.8	7
BPH 23	50	5.16	PKa 23	59	4.3	6
BPH 24	61	N.A	PKa 24	67	3.31	6
BPH 25	70	4.19	PKa 25	66	3.56	8

Çalışmaya dahil edilen PKa'lı hastaların yaş ortalaması 66.5 ± 1.16 iken BPH'lı hastaların 63.6 ± 1.80 olarak hesaplandı. İki grubun yaş ortalamaları karşılaştırıldığında P değerinin 0.18 olduğu bulundu. BPH'lı grubun PSA değerleri 0.68 ile 131 arasında değişirken PKa'lı grupta bu değerlerin 3.31 ile 100 arasında olduğu saptandı. BPH ve PKa'lı hastaların PSA ortalamaları karşılaştırıldığında P değeri 0.83 olarak bulundu. PKa'lı hastaların Gleason Skorlar değerlerinin 5-8 arasında değiştiği, Gleason skoru için medyan değerinin ise 6 olduğu görüldü (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: PKa ve BPH'lı hastalarının yaş, PSA ve Gleason skor ortalamaları

	BPH (N=25)	PKa (N=23)	p değeri
Yaş	63.62 ± 1.80	66.50 ± 1.18	0.18
PSA	17.35 ± 7.40	15.51 ± 4.86	0.83
Gleason Skor	-	5-8 (medyan 6)	-

Bu hastaların PSS örneklerinden RNA ayrıştırılması yapılarak RNA'lar -80°C 'de stoklandı. BPH ve PKa'lı hastaların PSS'lerinden elde edilen RNA derişimleri ve saflık oranları Tablo 4-3'te belirtildi.

Tablo 4-3: BPH ve PKa'lı hastaların RNA derişimleri ve saflık oranları

Hasta No	RNA ng/µl	A260/280	Hasta no	RNA ng/µl	A260/280
BPH 1	24.9	1.92	PKa 1	269.6	1.87
BPH 2	97.7	1.95	PKa 2	99.2	1.77
BPH 3	43.9	1.9	PKa 3	75.1	1.71
BPH 4	115.3	1.91	PKa 4	352.3	1.83
BPH 5	60.9	2.04	PKa 5	16.8	1.6
BPH 6	61.2	1.94	PKa 6	55.4	1.72
BPH 7	20.6	2	PKa 7	24	1.8
BPH 8	17.9	2	PKa 8	33.1	1.91
BPH 9	473.7	1.83	PKa 9	15.9	1.76
BPH 10	35.2	1.72	PKa 10	51.6	1.88
BPH 11	40	1.35	PKa 11*	11.7	1.9
BPH 12	26.3	1.80	PKa 12	16.5	1.91
BPH 13	323	1.78	PKa 13*	11.6	1.89
BPH 14	20.2	1.82	PKa 14	12.4	1.93
BPH 15	21.9	1.9	PKa 15	49.5	1.93
BPH 16	106.1	2.0	PKa 16	131.5	1.92
BPH 17	137.1	2.02	PKa 17	50.9	1.98
BPH 18	199.1	1.97	PKa 18	131.8	1.97
BPH 19	58.2	1.95	PKa 19	270.5	1.96
BPH 20	27.6	1.67	PKa 20	83.4	1.96
BPH 21	31.8	1.90	PKa 21	759.4	2.19
BPH 22	35.5	1.94	PKa 22	452.2	1.95
BPH 23	16.0	1.94	PKa 23	58.8	1.94
BPH 24	18.7	1.88	PKa 24	100.7	1.93
BPH 25	72.7	1.97	PKa 25	472.8	1.93

* Bu örneklerde RNA derişim miktarlarının yeterli olmaması ve yapılan ön çalışmada kontrol problemleriyle ilgili vermemelerinden dolayı bu hastalar qRT-PZR çalışmasına dahil edilmemişlerdir.

PM yöntemiyle alınan PSS'lerinin miRNA profillerinin belirlenmesi çalışması mikrodizin analiziyle yapıldı. Mikrodizin analizinde kullanılan örnekler ve bu örneklerden elde edilen ve Cy3 ile işaretlenen RNA'ların NanoDrop ND-2000c spektrofotometre cihazıyla elde edilen okuma sonuçları Tablo 4-4'te verilmiştir. Mikrodizin analizi için BPH'lı ve PKa'lı hastaların PSS'lerinden elde edilen RNA'ların, derişimleri ve saflıkları yüksek olanları seçildi.

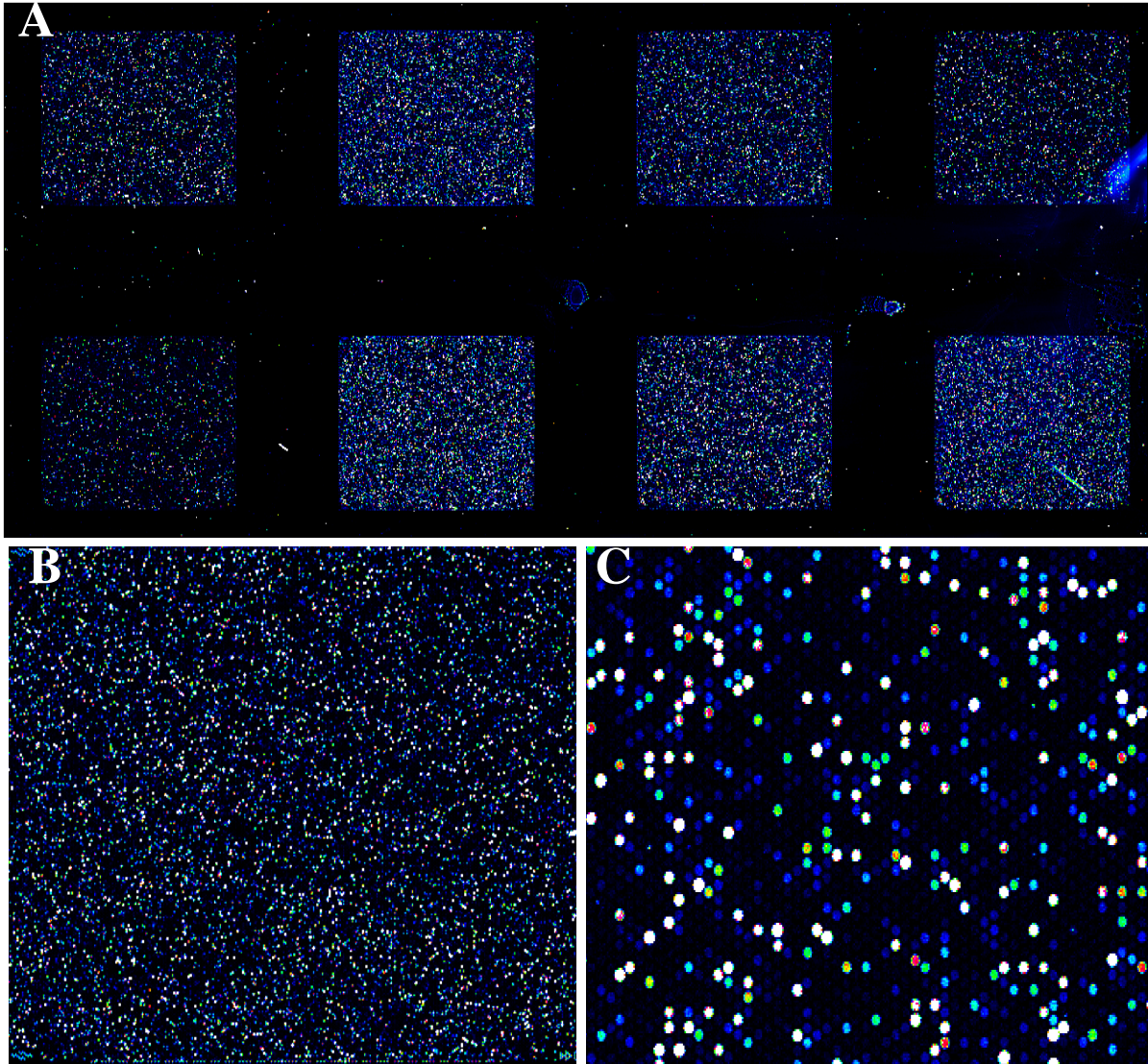
Tablo 4-4: Mikrodizinde kullanılan RNA'lar ve içerdđi Cy3 miktarları

Hasta No	Cy3
PKa 1	58 pmol/ μ l
PKa 2	61.6 pmol/ μ l
PKa 3	58.7 pmol/ μ l
PKa 6	62.7 pmol/ μ l
BPH 2	35.1 pmol/ μ l
BPH 5	63.1 pmol/ μ l
BPH 6	62 pmol/ μ l
BPH 9	66.3 pmol/ μ l

İlk gruptaki örneklerle yapılan mikrodizinler miRBase release 16.0'da belirtilen miRNA'ları kapsamaktadır ve 1349 adet bilinen tüm insan ve 144 adet insan viral miRNA'ları içermektedir.

Agilent firması tarafından oldukça hassas bir teknoloji kullanılarak hazırlanan çipler kullanılmıştır. Bu çiplerde 40-60-mer oligonükleotid problemler SurePrint teknolojisi ile özel olarak kodlanmış cam lamalar üzerine hassas bir şekilde basılmıştır. Ayrıca problemlerin 5' ucuna G ve hibridizasyon sırasının 3' ucuna da C rezidüsü işaretleme sırasında ilave edilerek doğru miRNA'ya bağlanma spesifisitesi artırılmıştır. Bu durum 1 nükleotidden fazla değişiklik gösteren miRNA'larda kros hibridizasyon ihtimalini anlamlı olarak azaltmıştır (<1%). Üstelik her probdan birden fazla basılı olması ve kontrol problemlerinin varlığı tek nükleotid değişiklik gösteren miRNA'ların bile ayrımını analiz sırasında yapabilme yeteneği vermiştir.

Kontrol problemleri sayesinde data normalizasyonu ve deneyler arasındaki sonuçları karşılaştırmada kolaylık sağlandı. Şekil 4-1'te bir örnekten alınan, taranmış bir mikrodizin görüntüsü verilmiştir.

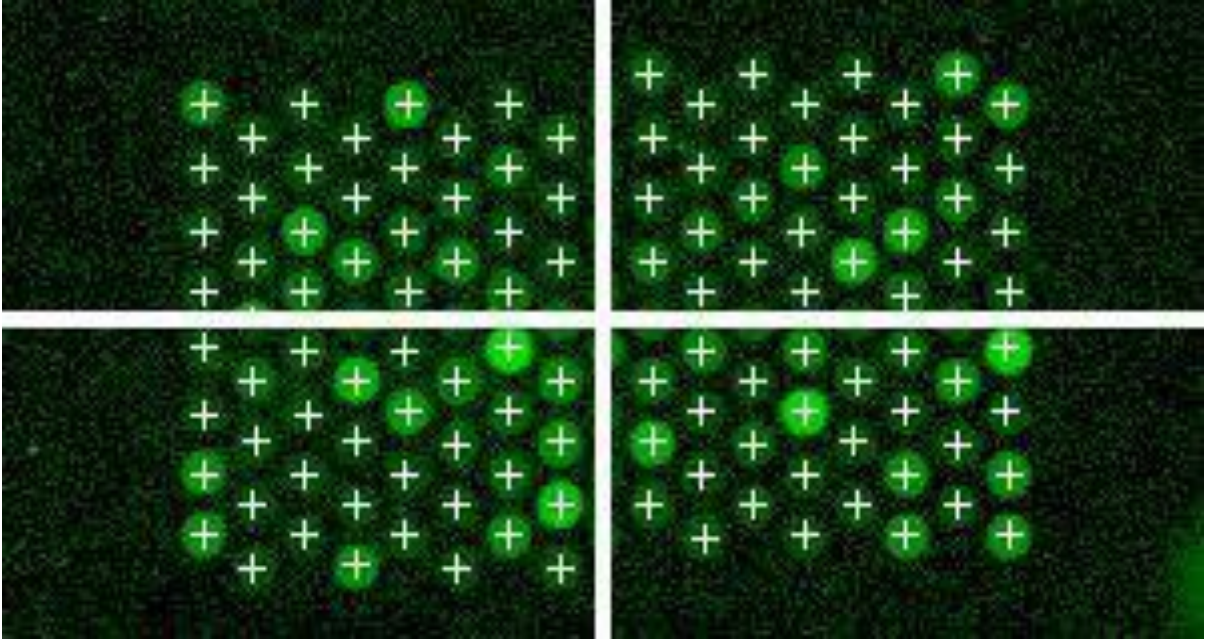


Şekil 4-1: Prostat sekresyon sıvı örneğinde miRNA mikrodizin görüntüsü

Mikrodizin üzerindeki sekiz örneğe ait spot görüntüsü (A) tek spottan elde edilen görüntü (B) ve seçilmiş bir bölgedeki miRNA problemleri (C) görüntülenmiştir. miRNA'lar yeşil renkli floresan veren Cy3 boyası ile işaretlenmiştir.

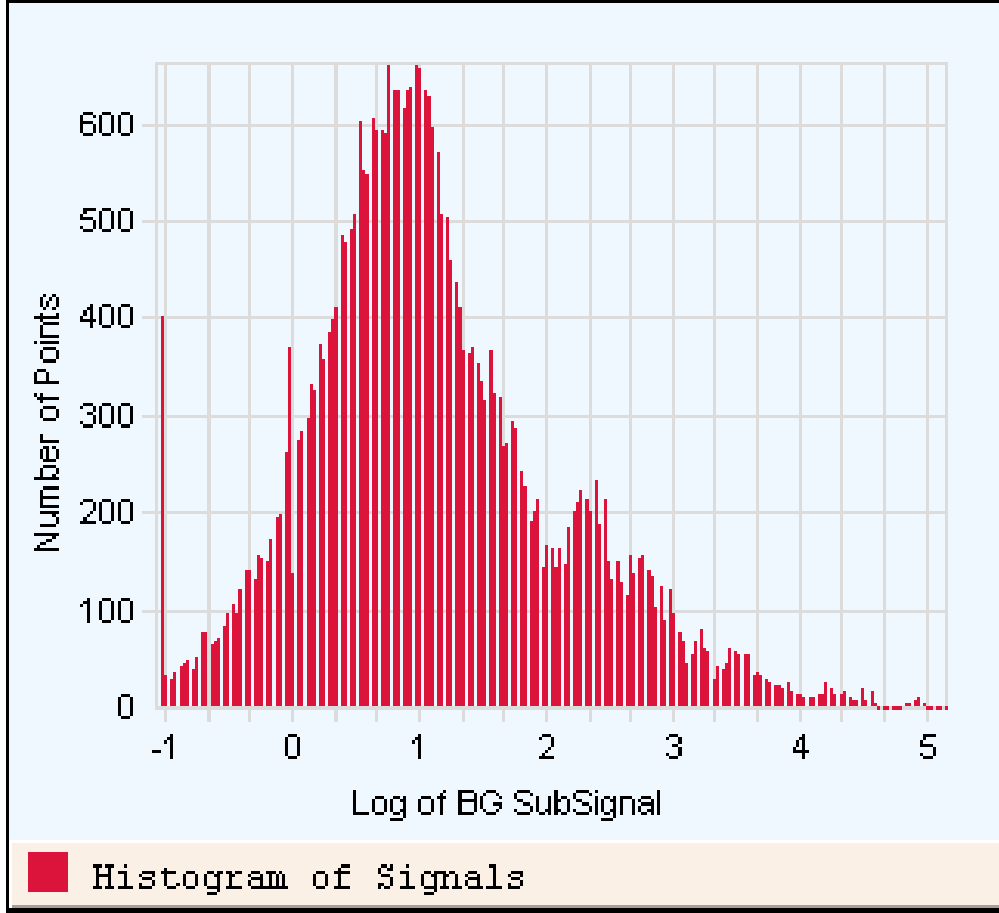
Çipler üzerinde bulunan spotların bir miRNA probu için birden fazla nokta ile belirtilmiş olabilir. Bu durumlarda daha sonraki analizlerde Log-dönüştürülmüş değerlerin ortalaması alındı. Aynı miRNA'dan birden fazla elde edildiği durumlar gözlenmiştir.

Mikrodizin tarama işlemi gerçekleştirildikten sonra Feature Extraction v10.7.3.1 programı kullanılarak işlenmemiş ham data ve tarama kalitesini gösteren QC raporu elde edildi. Öncelikle array üzerinde her bir örnek spotunun 4 köşesinde bulunan grid problemlerinin görüntüleri incelenerek tarama işleminin başarıyla gerçekleştiği doğrulandı. (Şekil 4-2)



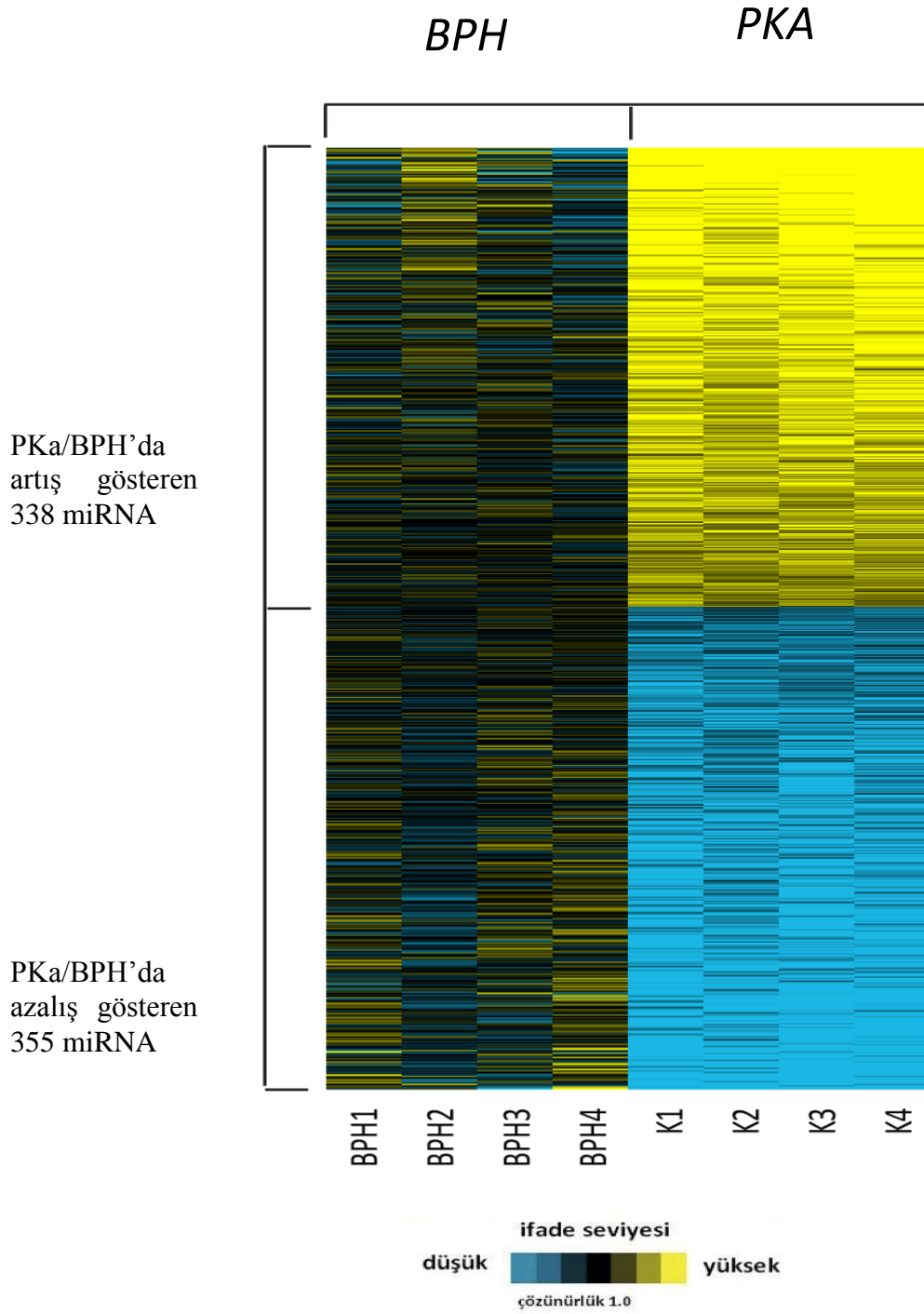
Şekil 4-2: Array'in 4 köşesinde bulunan grid problemlerinin görüntüsü

Her bir örneğin hibridize edildiği spotlardaki problemlardan elde edilen sinyal yoğunluk dağılımı grafikleri incelendi ve bu grafiklere örnek olarak bir tanesi Şekil 4-3'te verilmiştir.



Şekil 4-3: Tek spottan bulunan problemlerin sinyal yoğunluk dağılımı

İlk aşamada PKa ve BPH'lı grubun birbirine oranlanması sonucunda P değeri 0.01'in altında olan 735 miRNA bulundu. Bunlardan BPH'lı ve PKa'lı hastaların PSS'lerindeki kat değişimi 1.4'ten fazla veya 0.7'den küçük olan olan miRNA'lar seçildiğinde 693 tane miRNA'da anlamlı farklılık tespit edildi. İstatiksel olarak anlamlı değeri olan ($p < 0,01$) heat-map görüntüsü Şekil 4-4'te verilmiştir.

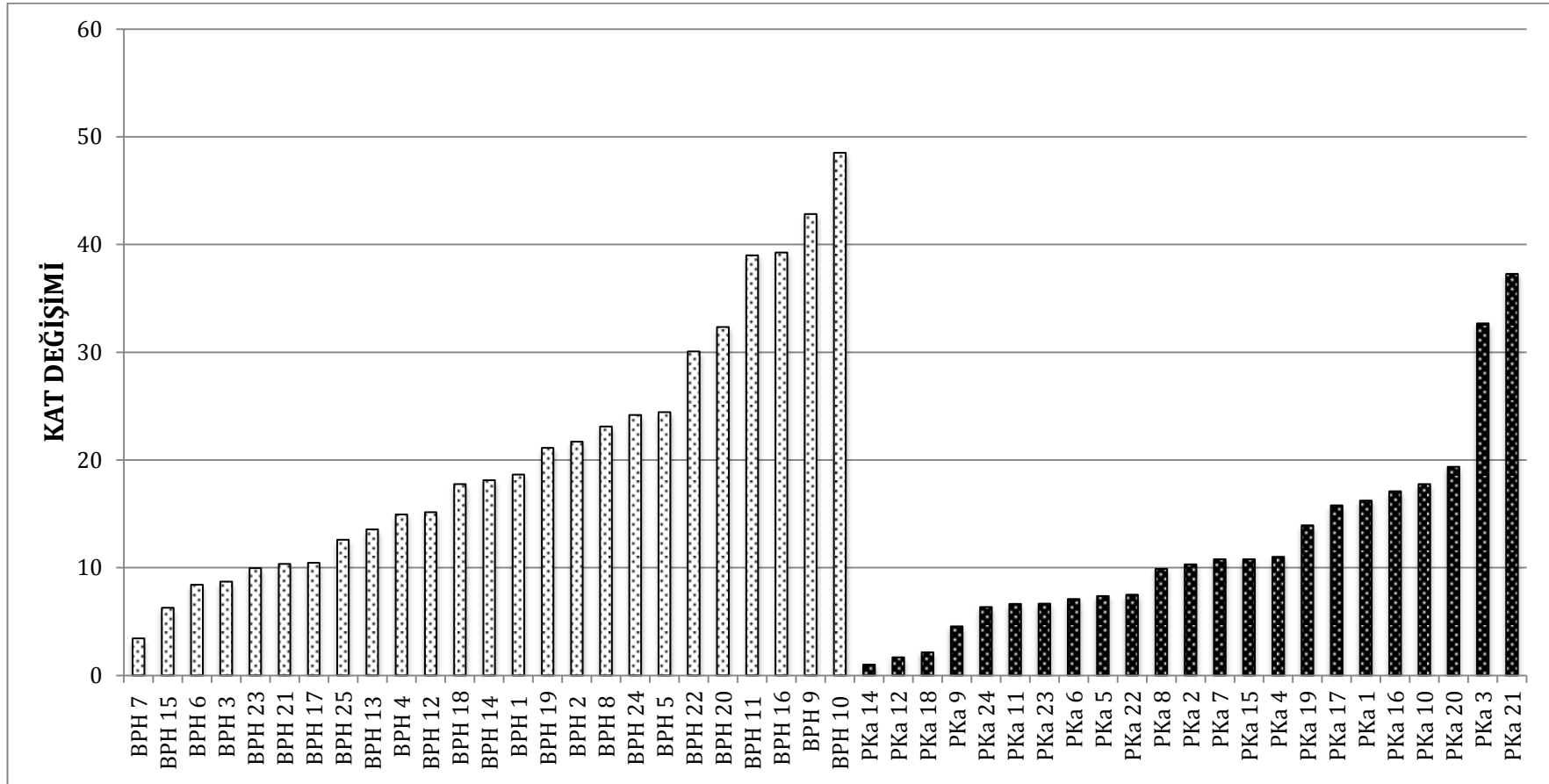


Şekil 4-4: PKa'lı hastaların PSS'lerinde BPH'ya göre değişim gösteren miRNA'ların Heat map gösterimi

Belirgin olarak farklılık gösteren miRNA'lar arasında prostat kanseriyle ilişkilendirildikleri bilinen veya dolaşımda varlığı gösterilen miRNA'lardan ifade seviyelerinde azalış olduğu görülen mir-221, mir-133b, mir-361-3p ve artışı olan mir-203 seçilerek 23 PKa'lı ve 25 BPH'lı örnekte qRT-PZR yöntemiyle doğrulama çalışması yapıldı.

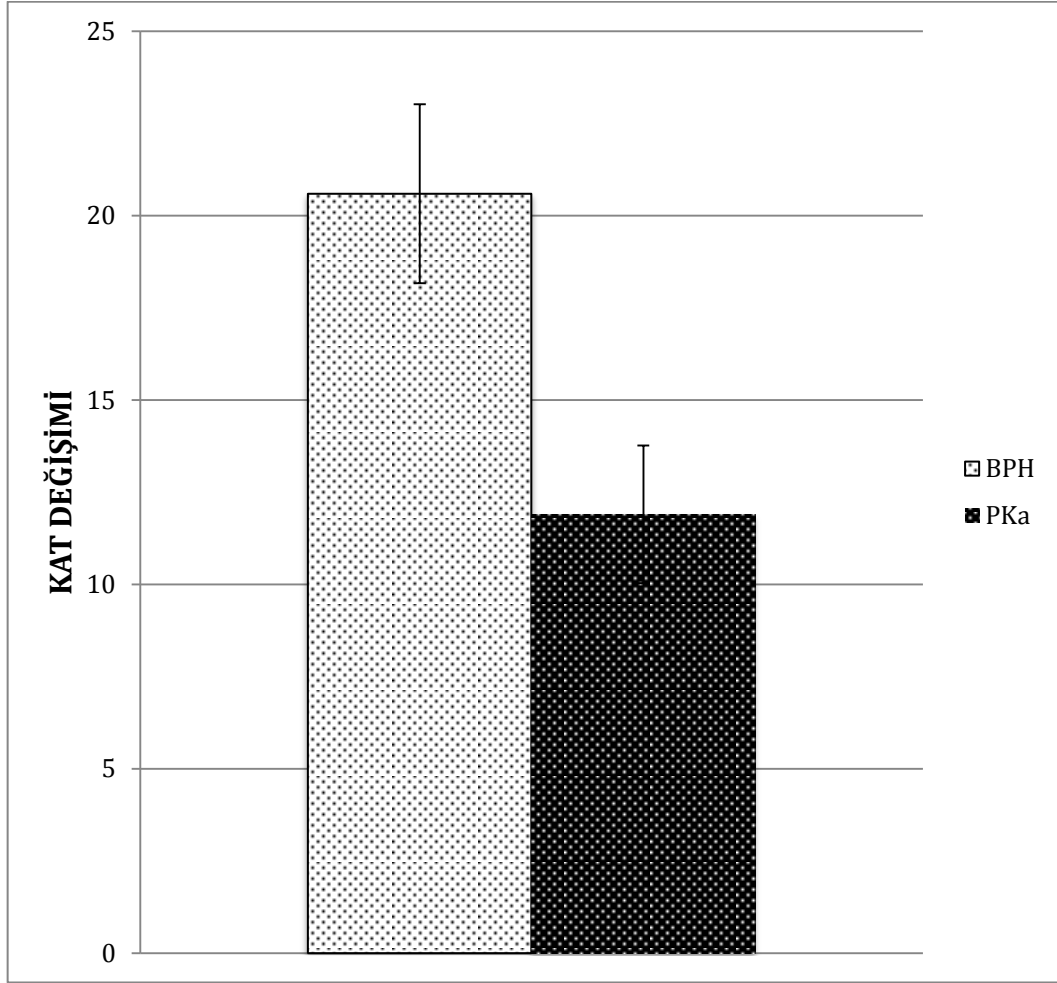
Gerçek-zamanlı PZR deneyleri Taqman miRNA Assay kiti kullanılarak gerçekleştirilmiş ve referans olarak küçük nükleolar RNA olan RNU6B ifade düzeyi kullanılmıştır. Grafiklerde standart hatalar gösterilip örnekler için p değerleri "Student's *t*-test" kullanılarak hesaplanmıştır. Gerçek-zamanlı PZR doğrulaması yapılan tüm miRNA değişim değerleri için artış ve azalışlar delta-Ct analizi ile belirlenmiştir. Mikrodizin sonuçlarına göre en anlamlı bulunan miRNA değişimlerinin doğrulanması için gereken gerçek-zamanlı PZR deneylerinin sonuçları Şekil 9-16'da verilmiştir.

miR-361-3p'nin BPH ve PKa örneklerindeki rölatif ekspresyon düzeyleri (Şekil 4-5) ve bu iki grupta ortalama ekspresyon düzeyi (Şekil 4-6) verilmiştir. En düşük ekspresyon seviyesi PKa 14 nolu örnekte, en yüksek ekspresyon da BPH 19 nolu örnekte tespit edildi. BPH'lı örneklerde ekspresyon düzeyi ortalama 20.59; PKa'lı örneklerde de 11.9 olarak hesaplandı (Tablo 4-5). Yapılan *t*-test sonucunda p değeri 0.006 hesaplanmış ve bu miRNA için PKa'lı hastalarda BPH'ya göre ekspresyon seviyesinde belirgin oranda azalış olduğu saptandı.



Şekil 4-5: hsa-miR-361-3p molekülünün BPH ve PKa örneklerinde rölatif ekspresyon miktarı

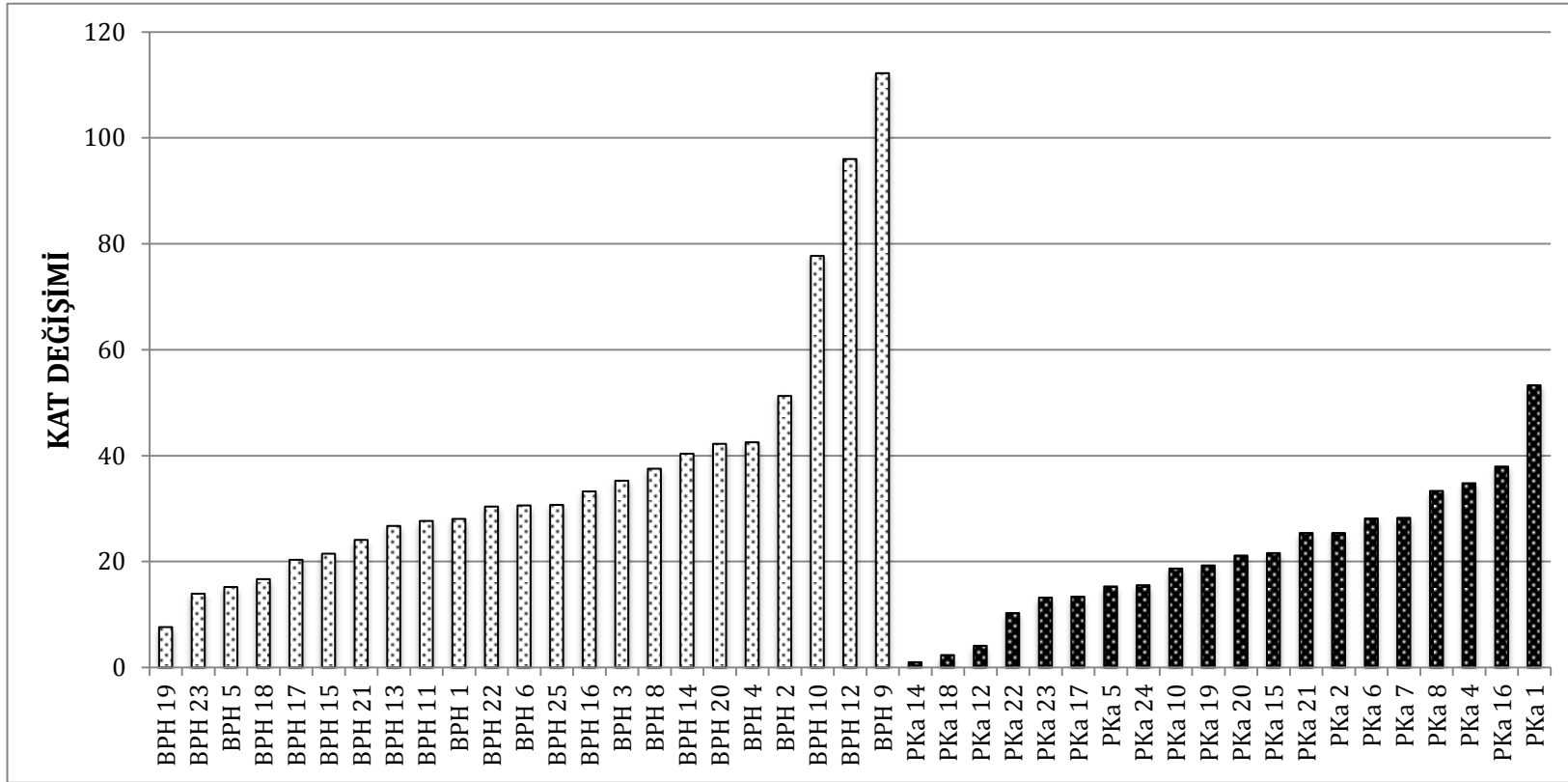
Miktarlar kontrol olarak kullanılan RNU6B ile karşılaştırmalı olarak kıyaslanarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-6: hsa-miR-361-3p molekülünün BPH ve PKa örneklerinde ortalama rölatif ekspresyon miktarı (p=0.04)

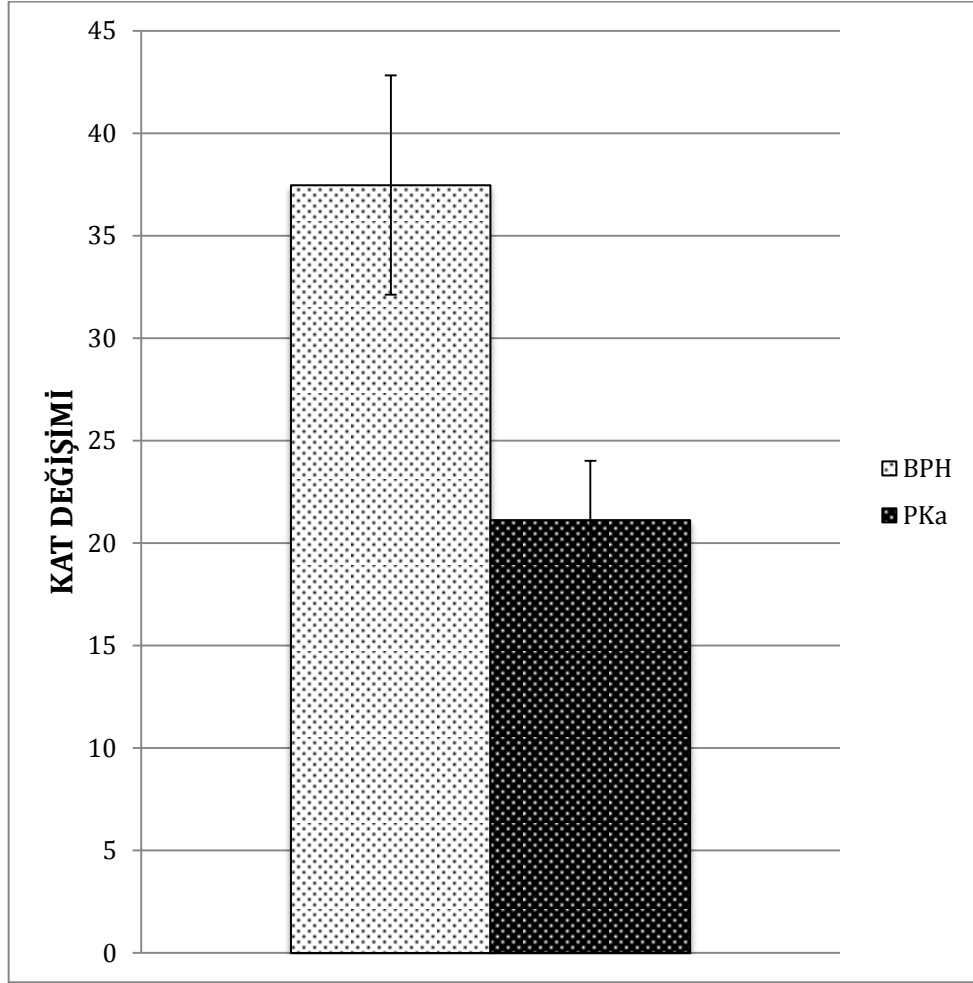
Miktarlar kontrol olarak kullanılan RNU6B ile karşılaştırmalı olarak kıyaslanarak hesaplanmıştır. Hata çubukları \pm standart hata değerleri kullanılarak çizilmiştir.

Rölatif ekspresyon seviyeleri Şekil 4-7’de ve ortalama ekspresyon düzeyleri Şekil 4-8’de verilen miR-133b’nin BPH’lı örneklerde ekspresyon düzeyi ortalama 37.46; PKa’lı örneklerde de 21.11 olarak hesaplandı (Tablo 4-5). Yapılan *t*-test sonucunda p değeri 0.01 hesaplandı ve PKa’lılarda BPH’ya oranlanla mir-133b’nin ekspresyon seviyesinde azalış olduğu gözlemlendi.



Şekil 4-7: hsa-miR-133b molekülünün BPH ve PKa örneklerinde rölatif ekspresyon miktarı

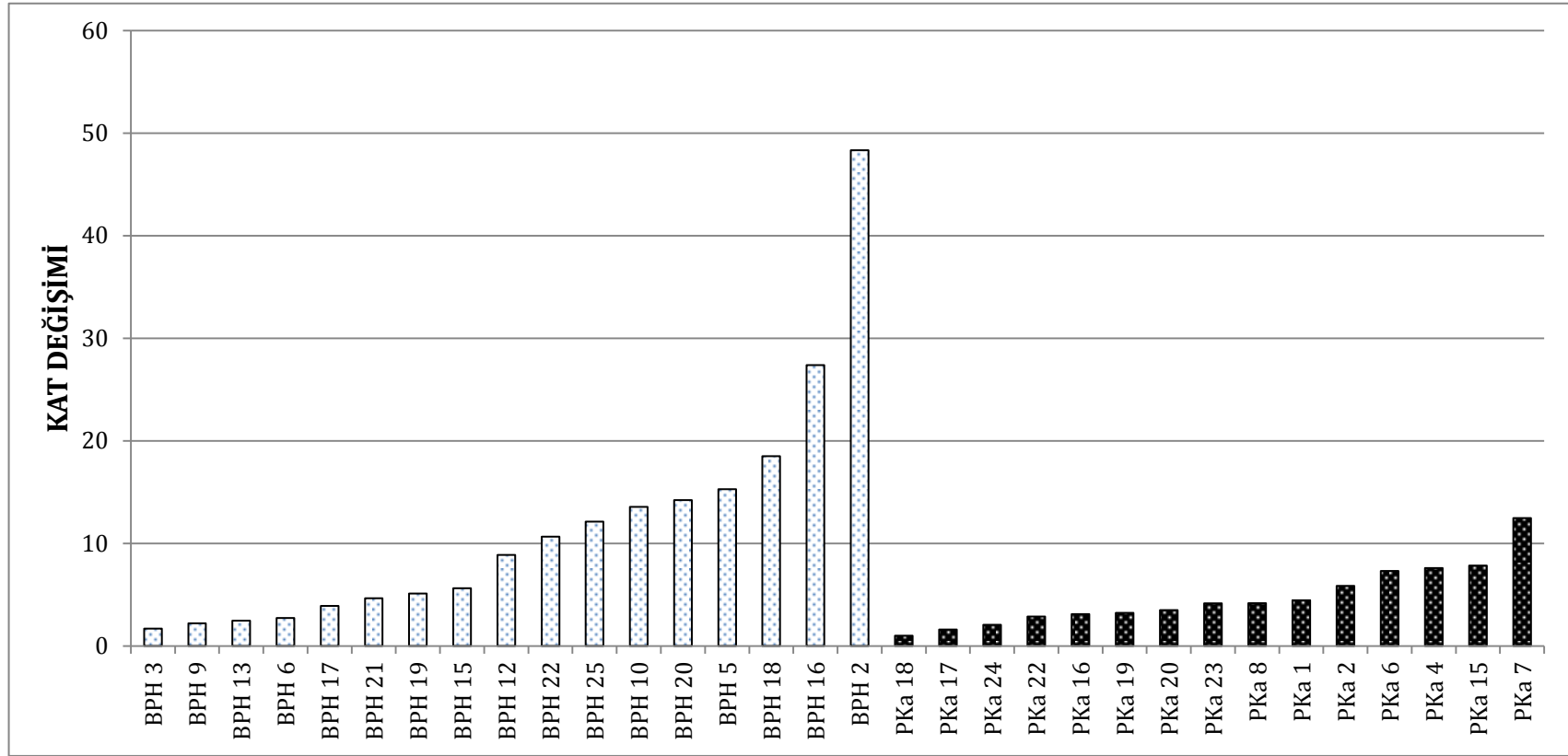
Miktarlar kontrol olarak kullanılan RNU6B ile karşılaştırmalı olarak kıyaslanarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-8: hsa-miR-133b molekülünün BPH ve PKa örneklerinde rölatif ekspresyon miktarı ($p<0.01$)

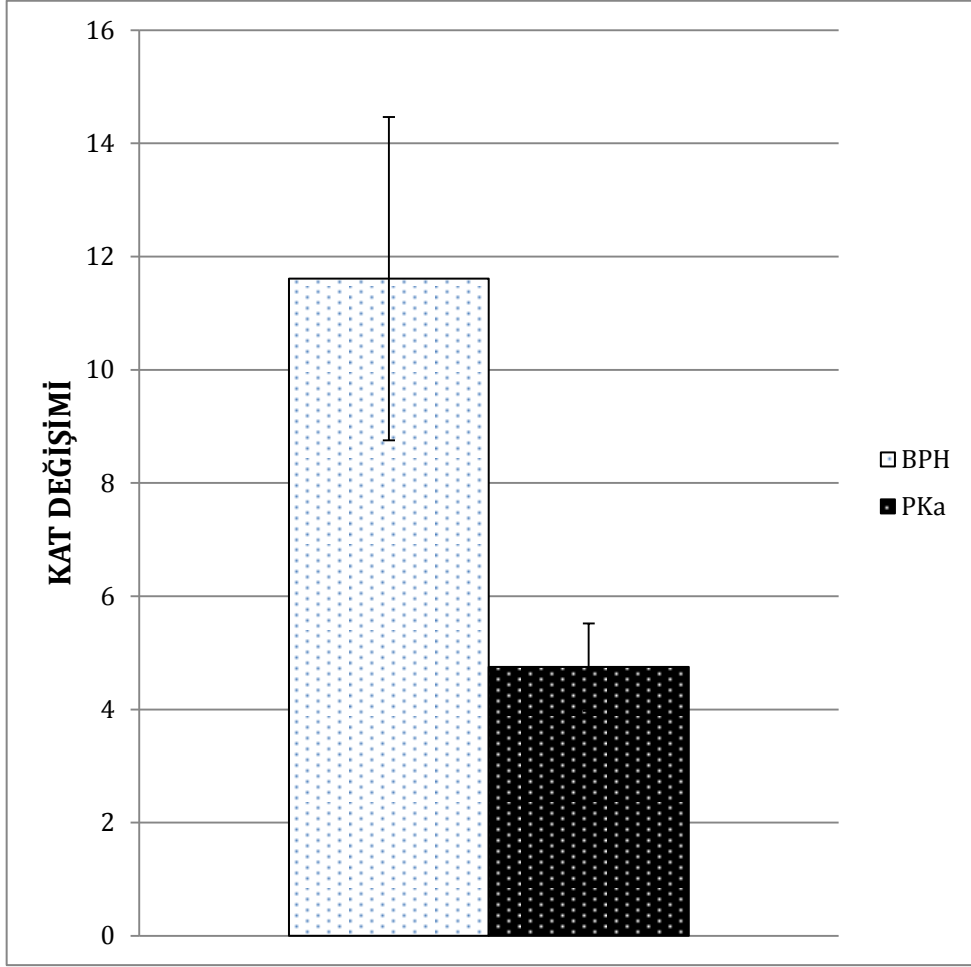
Miktarlar kontrol olarak kullanılan RNU6B ile karşılaştırmalı olarak kıyaslanarak hesaplanmıştır. Hata çubukları \pm standart hata değerleri kullanılarak çizilmiştir.

Rölatif ekspresyon seviyeleri Şekil 4-9'da ve ortalama ekspresyon düzeyleri Şekil 4-10'da verilen miR-221'in BPH'lı örneklerde ekspresyon düzeyi ortalama 11.6; PKa'lı örneklerde de 4.74 olarak hesaplandı (Tablo 4-5). Yapılan *t*-test sonucunda p değeri 0.03 hesaplandı ve PKa'lılarda BPH'ya oranla mir 221'in ekspresyon sevisinde azalış olduğu gözlemlendi.



Şekil 4-9: hsa-miR-221 molekülünün BPH ve PKa örneklerinde rölâtif ekspresyon miktarı

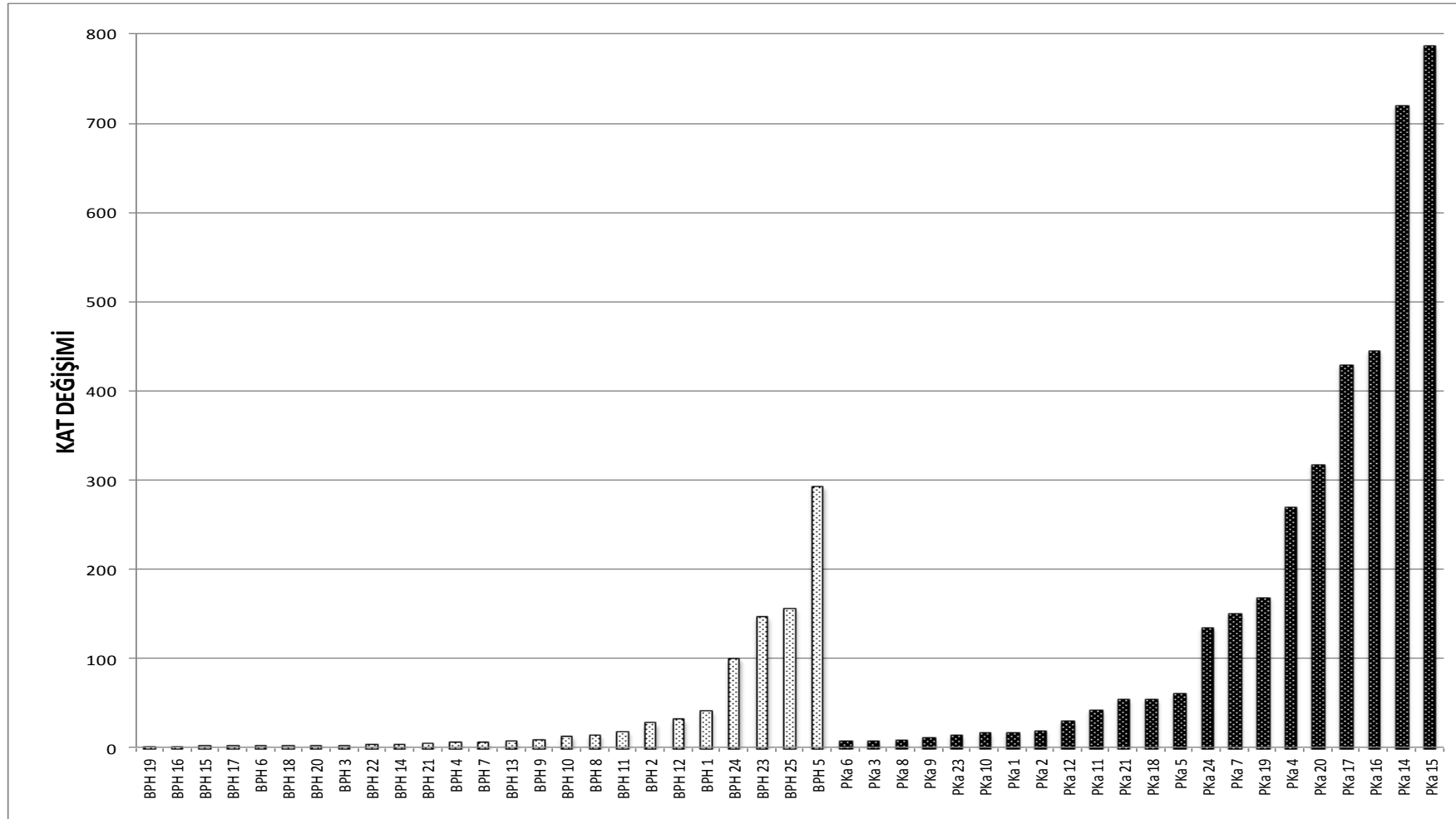
Miktarlar kontrol olarak kullanılan RNU6B ile karşılaştırmalı olarak kıyaslanarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-10: hsa-miR-221 molekülünün BPH ve PKa örneklerinde ortalama rölatif ekspresyon miktarı (p=0.03)

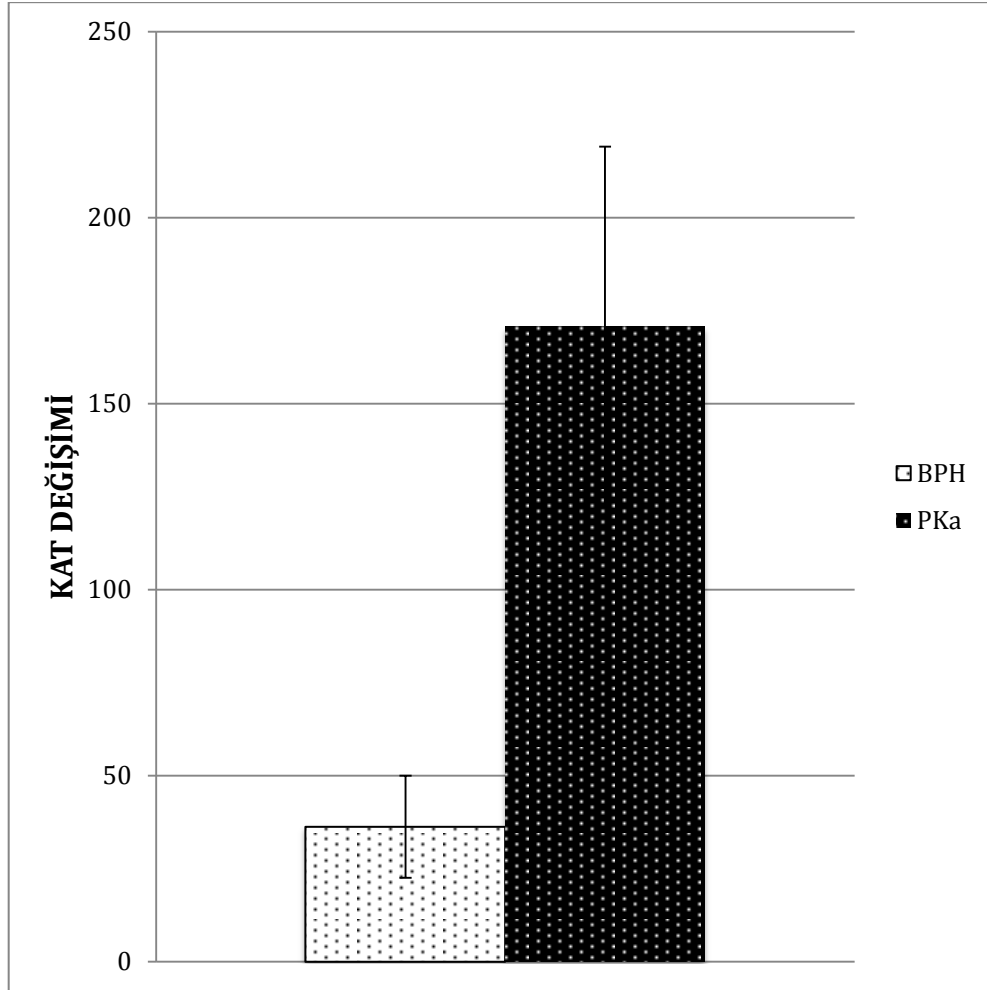
Miktarlar kontrol olarak kullanılan RNU6B ile karşılaştırmalı olarak kıyaslanarak hesaplanmıştır. Hata çubukları \pm standart hata değerleri kullanılarak çizilmiştir.

Son olarak rölatif ekspresyon seviyeleri Şekil 4.11’de ve ortalama ekspresyon düzeyleri Şekil 4.12’de verilen miR-203’n BPH’lı örneklerde ekspresyon düzeyi ortalama 36.28; PKa’lı örneklerde de 170.73 olarak hesaplandı (Tablo 4-5). Yapılan *t*-test sonucunda p değeri 0.0002 olarak bulundu, PKa’lılarda BPH’ya oranla diğer sonuçların tam tersi olarak mir-203’n ekspresyon seviyesinde artış olduğu gözlemlendi.



Şekil 4-11: hsa-miR-203 molekülünün BPH ve PKa örneklerinde rölatif ekspresyon miktarı

Miktarlar kontrol olarak kullanılan RNU6B ile karşılaştırılarak kıyaslanarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-12: hsa-miR-203 molekülünün BPH ve PKa örneklerinde ortalama rölatif ekspresyon miktarı (p=0.0002)

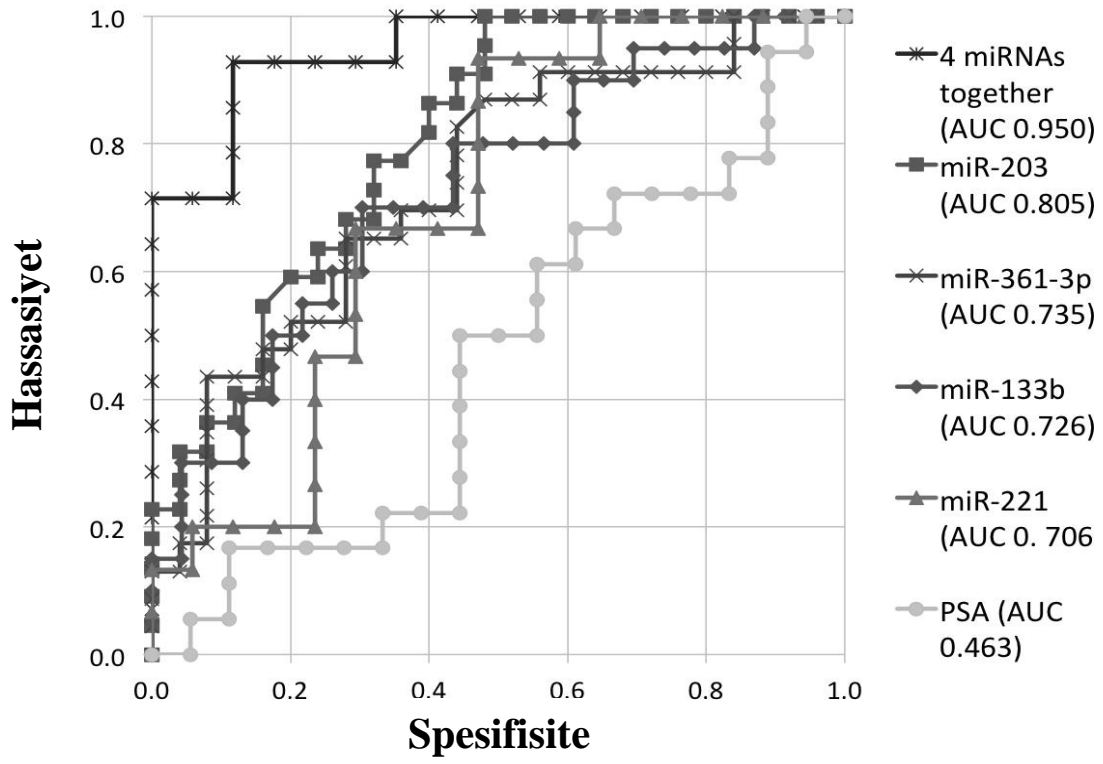
Miktarlar kontrol olarak kullanılan RNU6B ile karşılaştırmalı olarak kıyaslanarak hesaplanmıştır. Hata çubukları \pm standart hata değerleri kullanılarak çizilmiştir.

Tablo 4-5: BPH ve PKa'lı hastalardan alınan RNA'ların mir 361-3p, -133b, -221, -203 seviyelerindeki ortalama, sterr, t-test değerleri

	BPH		PKa		ttest
	mean	sterr	mean	sterr	
mir 361-3p	20.590	2.424	11.902	1.864	0.006
mir 133b	37.466	5.349	21.117	2.894	0.013
mir 221	11.609	2.854	4.747	0.772	0.036
mir 203	36.289	13.724	170.734	48.354	0.015

qRT PZR çalışmaları sonrasında BPH'dan PKa'yı ayırtetmede miRNA'ların gücünü test etmek için ROC analizi yapıldı.

Buna bağlı olarak BPH'dan PKa'yı ayırtetmede miRNA'ların etkinliğini anlamak için ROC eğrileri çizildi ve sonucunda tek tek analiz yapıldığında eğrinin altında kalan mir-203'ün en yüksek değere sahip olduğu saptandı (AUC; 0.805) (Şekil 4-13). Mir-361-3p, -133b, -221'in AUC değerlerinin sırasıyla 0.735, 0.726, ve 0.706 olduğu görüldü. Ayrıca tüm 4 miRNA birlikte değerlendirildiğinde de çok daha iyi sonuca sahip oldukları (AUC; 0.950) tespit edildi (Şekil 4-13). İlginçtir ki PKa ve BPH'lı hastaların raporlarından elde edilen PSA değerleri karşılaştırıldığında PSA'nın BPH'lı hastaları PKa'lı hastalardan ayırmada yeterli etkiye sahip olmadığı sonucuna ulaşıldı. (AUC; 0.463) (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: mir 203, -361-3p, -203, -221, PSA, ve 4 miRNA'nın ROC eğrileri

5. TARTIŞMA

PKa, kanser türleri arasında erkeklerde en sık görülen kanser türlerindedir. 2013 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde kanser türleri içinde PKa'nın, tek başına ölüm oranlarının % 28 (238,590)'inden sorumlu olacağı tahmin edilmektedir¹¹².

PKa olgularında, primer tümörler çoğunlukla organın içinde lokalize olarak kalmaktadır, ancak bazı PKa'ların diğer organlara metastaz yaptığı bilinmektedir¹¹³. Erken evrede tesbit edilen ve prostatta lökaleze olan kanser vakalarında en sık uygulanan tedavi metotları arasında, cerrahi, radyasyon ve hormon ablasyon tedavileri bulunmaktadır¹¹⁴. Çoğunlukla klinik açıdan başarılı sonuçlanmamasına rağmen ileri safhadaki kanserlerde ve metastaz yapan tümörlerde kemoterapi tek çaredir¹¹⁵. PKa'nın kompleks progresyonundan ötürü, bu kanserin tedavisine yönelik terapötik metotlar çok sınırlı kalmaktadır. Bu yüzden etkili tanı yöntemlerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak yeni tanı araçları geliştirmek için yeni prognostik belirteçler bulmak önemli bir sorundur.

Günümüzde PKa tanısında, tedavi planlaması ve tedavi sonrası izlem için rutin klinik uygulamalarda PSA yaygınlıkla kullanılan bir belirteçtir. Prostat ve üretranın çevresindeki bezlerden salınan bir protein olan PSA, prostata bağlı hastalıkların ve PKa tanısının konmasında kullanılmaktadır¹. Bunun yanı sıra kullanılan metotlar arasında parmakla rektal muayene ile prostatın sertlik ve düzensizliğinin tespiti, rektal yolla uygulanan ultrasonografik yöntem olan Trans-Rektal Ultrason Rehberliğinde Biyopsi (TRUS) ile de prostatı daha iyi görüntülemesi ve hedeflenen yerden parça alınması gibi işlemler uygulanmaktadır¹¹⁶.

Rutin tanıda yaygın olarak kullanılan PSA'nın tek başına kanser tanısı konmasında yetersiz kalması ve tümör belirteci olma özelliğini kaybetmeye başlaması yeni belirteçlerin arayışına neden olmuştur. Özellikle, PKa ile ilişkilendirilmeyen bazı sebepler PSA'nın hassasiyetini etkilemektedir. Bunların arasında hastanın yaşı, ırkı, prostat hacmi, PSA ölçümündeki yöntem değişiklikleri ve prostatı etkileyen manipülasyon ve prostatik enflamasyonların varlığı gibi faktörlerin serum PSA miktarını etkilediği düşünülmektedir. Bu sebeplerden ötürü PSA'nın hassasiyeti yetersiz kalmaktadır¹¹⁷.

PSA seviyesindeki artış PKa için spesifik olmamasına rağmen prostatta bir hastalığın geliştiğini düşündürür. Bununla birlikte prostatında rahatsızlık görülen bireylerin hepsi artmış PSA seviyesine sahip değildir. PSA seviyesinin 2,5 ng/ml ile 10 ng/ml arasında ölçüldüğü durumlarda da, BPH ve PKa'lı vakaların ayırdedilmesinde PSA etkin araç değildir. Bütün bu nedenlerden dolayı PSA klinikte tümör için kusursuz ayırım sağlayamamaktadır^{118,119}.

Son zamanlarda erken evrede ve metastasik olmayan PKa vakalarında uygulanan PKa terapi uygulamalarında büyük gelişmeler olmasına rağmen ileri safhadaki PKa hastaları için törapatik tedavi yaklaşım ihtiyacı devam etmektedir.

PKa için en çok umut vadeden tanısal belirteçlerden biri de miRNA'lardır. miRNA'lar kısa, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, kodlamayan tek sarmallı bir RNA çeşididir. Gen ifadesi düzenlenmesinde görevli olan miRNA'ların PKa dahil birçok kanserin patogeneziinde rol oynadığı gösterilmiştir⁴ ve yeni bir gen regülatörü sınıfı olarak düşünülmektedir. Ayrıca, miRNA ekspresyonunun çeşitli kanser tiplerini sınıflandırmada kullanılabileceği gösterilmiştir⁷². Normal ve kanserli örnekler arasında ifade düzeyindeki kat değişimi oldukça az olan mRNA'ların aksine miRNA'lardaki kat değişiminin 100'lerce kata kadar çıkabilmesi farklı özelliklerdeki örneklerin birbirinden ayırdedilmesindeki hassasiyetlerini artırmaktadır¹²⁰. Bunun yanı sıra, olgun miRNA'ların kompleks olmamaları, bilinen bir modifikasyona uğramıyor olmaları, varlıklarının ve ifade düzeylerinin kolayca tespit edilebilmesi, dokuya özgü ifade profillerinin olması ve dizilerinin insan ve model organizmalar arasında yüksek korunmuşluk seviyesi göstermesi ve de miRNA'ların boylarının kısa olması dolayısıyla stabiliteilerinin mRNA'lardan çok yüksek olması^{121,122}, miRNA'ların biyomarkör olarak ve fizyopatolojik durumların karakterizasyonunda kullanılabilmeleri için ideal adaylardan yapmaktadır^{84,97}.

MiRNA'lar, hücre gelişimi, çoğalması ve hücre apoptozuyla ilişkilendirilmiş, yer ve zamana göre değişen ekspresyonlarına bağlı olarak hemen hemen her hücresel işlemde düzenleyici etkileri bildirilmiştir. Son çalışmalar, miRNA'ların düzensizliğinin insan tümörlerinin oluşumunda, kanser patogenezi, kanserin başlangıcı, ilerlemesi ve metastazı da dahil olmak üzere birçok prostepte etkili rol oynadığını göstermiştir^{123,124}. miRNA'ların tümör onkogen veya tümör baskılayıcı genler olarak hareket ettikleri bu çalışmalarda rapor edilmiştir¹²⁵.

C. *Elegans*'ta ilk kez tanımlanan miRNA olan lin-4 homologuna ait mir 125-b'nin¹²⁶ aynı zamanda hücre çoğalmasında etkili olduğu¹²⁷, mide kanseri¹²⁸, rahim kanseri¹²⁹, androjenden bağımsız PKa'lı dokularda^{77,130} yüksek ekspresyon seviyesine sahip oldukları gösterilmiştir.

miRNA'ların prostat karsinogenezine katılımını gösteren birçok rapor da mevcuttur^{68,73}. PKa'da etkili olan Mir-16¹³¹, mir-24¹³², mir-29a¹³³, mir-145⁷⁶ ve mir-205¹³⁴ gibi birçok miRNA'nın iyi huylu prostat dokularına göre ekspresyon seviyelerinde azalış olduğu saptanmıştır. Ek olarak mir-16, mir-24b, let-7⁷⁷ mir-126* ve mir-145'in PKa metastazının gelişiminde etkili olan miRNA'lar arasında oldukları gösterilmiştir. Bazı miRNA'ların ekspresyon seviyeleri kanser evresine göre de değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin mir-34c'nin ekspresyonu, tümörün agresiflik derecesi, kanser greyd skoru, PSA seviyesi ve PKa'daki metastaz oluşumuyla ters bir orantıya sahip olduğu görülmüştür⁷¹.

Dokuların yanısıra miRNA'ların dolaşımdaki varlıkları da tesbit edilmiştir⁸⁷. Vücut sıvılarında bulunan miRNA'ların eksozomlarda hapsedilmiş olarak RNAz'lardan korunduğu^{79,81} ya da Argonat-2 proteinleriyle etkileşim içerisinde bulunarak stabil kaldıkları ileri sürülmektedir¹³⁵. Vücut sıvılarındaki miRNA'ların miktarları oda sıcaklığında 48 saate kadar değişmediği, üstelik tekrarlayan dondur-çöz işlemlerinin miRNA'ların stabilitelelerini değiştirmediği gösterilmiştir¹³⁶.

Şimdiye kadar serum, tükürük ve ürede bulunan miRNA'ların kanser dahil birçok patoloji ile ilişkilendirildiği, ek olarak anne sütü, kolostrum, meni, gözyaşı, amniyotik sıvı, beyin omurilik sıvısı, plevral sıvı ve periton sıvılarında da varlıkları gösterilmiştir⁸⁴. Dolaşımdaki miRNA'lar çeşitli hastalıklarda güçlü bir ayırıcı güç göstermektedir. Dolaşımda miRNA'ların varlığı ilk olarak akut miyokard enfarktüsü hastalarının serumunda mir-209 ve mir-499'un varlığı ile tesbit edilmiştir¹³⁷. İlerleyen çalışmalarda akut miyokardiyal enfarktüs tanısı için mir-1'in yeni bir biyolojik markır olabileceği düşünülmektedir¹³⁸.

Dolaşımda tesbit edilen miRNA'ların hastalıkların yanısıra birçok kanser türündeki etkileri gösterilmiştir. Örneğin vezikül ile ilişkili miRNA'lardan küçük olmayan hücre karsinomlu akciğer kanserli hastaların plazmasında bulunan let-7f ve mir-30e-3p'nin ifade düzeyleri, hastalık evresinde olan ve bu yüzden cerrahi müdahale gerektiren hastaların diğerlerinden ayırımında kullanılabilecekleri ileri sürülmüştür¹³⁹.

Ağız içi kanserlerli hastaların serumlarından yapılan çalışmalarda da mir-16 ve let-7b seviyelerinin sağlıklı kontrollerden alınan serumlara göre ekspresyon seviyelerinde artış olduğu, mir-338-3p, mir-223 ve mir-29a seviyelerinin ise azaldığı gözlenmiştir¹⁴⁰.

Mesane kanserli hastaların idrar örnekleri ile yapılan çalışmada mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-141, mir-429, mir-192 ve mir-155'in ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ameliyat sonrasında takibi yapılan hastalarda mir-200c ve mir-141 seviyesinin kontrol grubuyla aynı seviyeye geldiği, mir-200a, mir-200b ve mir-429 seviyelerinin ise ameliyat sonrasında da stabil kaldıkları gözlemlendi¹⁴¹.

Ek olarak, tümör dokusundan kaynaklanan ve tümör gelişimi ve patogenezinde potansiyel olarak anahtar rol oynadığı düşünülen bazı miRNA'ların PKa hastalarının serumunda da deregüle olduğu gösterilmiştir⁸⁷. BPH ve sağlıklı gruptan PKa hastalarını ayırt etmek için yapılan çalışmalarda PKa hastalarının serumlarında let-7e, let-7c ve mir-30c'nin azaldığı, mir-622 ve mir-1285'in ise artış gösterdiği gözlenmiştir¹⁴². Benzer bir çalışmada da PKa'lı hastaların serumları BPH serumları ile karşılaştırıldığında PKa'lılarda mir-16, mir-195 ve let-7i seviyelerinin arttığı tesbit edilmiştir⁹⁸. PKa'lı hastaların serumları sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında ise mir-125b ve mir-141 seviyelerinde belirgin artış olduğu gösterilmiştir¹⁴³.

Son zamanlarda yapılan biyomarkör araştırmalarında kullanılan kan serumu hem invaziv bir yöntemle elde ediliyor olması hem de plazma kontaminasyonu ve hemoliz gibi testin hassasiyetini ve spesifitesini kısıtlayan faktörlerin varlığı nedeniyle sorunludur⁸⁴. Kan serumundaki miRNA'larla birlikte bir kısım qRT-PZR inhibitörlerinin ko-pürifikasyonu da serumun analizinde varyasyonlara sebep olabilmektedir¹³⁶.

Bu veriler doğrultusunda yapılan çalışmada; ilk olarak PSS'de miRNA'ların varlığının tesbiti hedeflenmiştir. BPH ve PKa'lı hastaların PSS örneklerinden temin edilen RNA'lar kullanılarak miRNA mikrodizin çalışması yapılmıştır. PSS'de bulunan miRNA'ların tesbit edilmesinin ardından, BPH'lı ve PKa'lı hastaların PSS'lerindeki miRNA'ların ifade profilleri karşılaştırılmış ve qRT-PZR deneyleri ile doğrulama çalışmaları yapılmıştır. miRNA ekspresyonunun prostat sekresyon tabanlı mikrodizin profillemesi çalışmasında PKa'da tanısal belirteç tespiti için bilinen bini aşkın miRNA araştırılmıştır.

MiRNA mikrodizin sonuçları değerlendirildiğinde anlamlı şekilde deregüle olduğu gösterilen 4 miRNA, qRT-PZR ile 23 PKa ve 25 BPH'lı hastadan alınan prostat sekresyon sıvı örneklerinde doğrulanmıştır. PKa örneklerinde BPH'lı gruba göre mir-361-3p, mir-133b ve mir-221'in azalış gösterdiği, mir-203'ün ise arttığı tesbit edilmiştir. PKa'lı hastaların Gleason skorları ve PSA seviyeleri ile analiz edilen miRNA'ların ifade düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

PKa'lı hastaların PSS'lerinde BPH'lı gruba göre azalış gösteren mir-361-3p seviyesinin prostat karsinogenezindeki rolü tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, akciğer kanserli hastaların serumunda azalış gösterdiği tesbit edilerek iyi huylu akciğer tümörüyle malign tümörü birbirinden ayırmak için kan tabanlı belirteç olarak kullanılmasında aday gösterilmiştir¹⁴⁴.

BPH grubuyla PKa hastaların PSS karşılaştırıldığında benzer sonuçlara sahip olan mir-133b'nin azalan ekspresyon seviyesi, PKa'lı dokularda azalış gösteren mir-133b ile paralellik göstermektedir¹⁴⁵. Mir-133b iskelet kasının gelişimindeki etkisinden dolayı ilk zamanlar kaslara spesifik bir miRNA olduğu düşünülmekteydi^{146,147}. Daha sonraki çalışmalarda mir-133'ün baş ve boyun, akciğer, kolorektal ve skuamöz hücreli birçok kanser türünde düzensiz ekspresyona uğradıkları gösterilmiştir¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Buna ek olarak erken evredeki akciğer kanserli hastaların serumlarından elde edilen çalışmalarda mir-133b ve mir-206 seviyelerinin kontrol gruplarının serumlarına göre belirgin oranda artış gösterdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada akciğer kanserli dokularda mir-206 ve mir-133b'nin normal dokulara göre düşük ekspresyon seviyesine sahip olduğu da bildirilmiştir¹⁵².

PKa'lı dokular ve hücre hatları, normal dokularla^{73,114} karşılaştırıldığında ekspresyon seviyesi azalan mir-203'ün ise, PKa'lı hastaların PSS'leri BPH'lı örneklerle karşılaştırıldığında ifade seviyesinde artış görülmüştür. Bu miRNA'nın artmış ifade düzeyinin PKa hücre hatlarında apoptoz ve hücre siklusu inhibisyonuyla sonuçlandığı bilinmektedir⁷³. TSmiR olarak bilinen mir-203'ün, PKa hücrelerinin poliferasyonu, invazyonu ve bu hücrelerin göçü için önemli olduğu gösterilmiştir⁷⁰. Ayrıca, prostat tümörlerinin kemik metastazlarında mir-203'ün belirgin olarak azaldığı belirlenmiştir¹⁵³. Mir-203'ün, PKa dahil¹¹⁴ birçok kanser türünde azalış göstermesine rağmen, bir TSmiR olarak rol oynadığının bilinmesinin aksine, over tümörü¹⁵⁴ ve kolon kanseri¹⁵⁵ gibi tümörlerde mir-203 seviyesinin artmış olduğu da bulunmuştur.

PKa'lı hastaların PSS'lerinde BPH'ya oranla mir-221'in seviyesinde de azalma görüldüğü çalışmamızda tesbit edilmiştir. mir-221'in PKa'lı dokularda tümör süpressör veya onkogenik özellik gösterebileceği tartışmalı olarak ifade edilmektedir^{74,156}. Yüksek risk gruplu PKa'lı hastaların dokuları, BPH'lı hastalardan alınan dokularla kıyaslandığında mir-221 seviyesinin çok belirgin olarak azalış gösterdiği saptanmıştır. PKa'lı hastaların Gleason skoru, ilerleyen tümör seviyeleri ve klinik olarak tekrarlayan durumları da göz önüne alındığında mir-221 seviyesi için aynı sonuçlar elde edilmiştir¹⁵⁷.

Androjene bağlı ve androjenden bağımsız prostat kansinomlarının serumlarında mir 221 seviyesinin kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir¹⁵⁸. Diğer bir çalışmada ise PKa hastalarının serumlarında mir 221 seviyesinin sağlıklı gruba göre artış gösterdiği bulunmuştur¹⁵⁸. Metastaz yapan PKa'lı hastaların mir 221 seviyesinin lokal prostat kanseri oluşumu olan ve sağlıklı bireyleri içeren gruba oranla artış gösterdiği bildirilmiştir¹⁵⁹. Mir 221 seviyesinin PKa hücre hatlarından PC3'de normal prostat epitelyal hücrelere göre belirgin şekilde artan ekspresyonu gösterilmiştir¹⁶⁰. Yapılan başka bir çalışmada pankreatik kanserlerin serumunda da bulunan miR-221 seviyesinin iyi huylu panreatik tümör içeren hastaların serum seviyelerine göre belirgin olarak artış gösterdiği bildirilmiştir¹⁶¹. Akciğer kanserli hastalarının serumlarında mir-221 seviyesinin sağlıklı gurubun serumlarına göre azaldığı yapılan çalışmada gösterilmiştir¹⁶².

Literatüre göre PKa'lı hastaların PSS'lerinde miRNA'ların varlığının tespit edilmesi ve bu miRNA'ların BPH'lı ve PKa'lı hastaların tanısında kullanılabileceğinin gösterilmesi ilk kez tarafımızdan gerçekleştirilmiştir. Prostat masajının rutin muayene de kolayca uygulanabilir olması PKa'nın tanısının değerlendirilmesinde PSS'nin kullanımını güçlü bir non-invaziv yöntem yapmaktadır.

Çalışmanın sonuçlarına göre mir-361-3p, mir-221, mir-133b ve mir-203 seviyelerinin PKa hastalarının sekresyon sıvılarında farklı olarak ifade edildikleri ortaya konulmuş ve bu miRNA'ların kolaylıkla diagnostik belirteç için aday olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. İleriki çalışmalarda prostat sekresyon sıvılarının çok daha büyük popülasyonlarda doğrulama çalışmalarının yapılmasının ardından ek belirteçlerin de geliştirilmesiyle prostat sekresyon sıvıları, PKa için rutin tanı amaçlı kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- 1 Balk, S. P., Ko, Y. J. & Bublely, G. J. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol***21**, 383-391 (2003).
- 2 Di Leva, G. & Croce, C. M. miRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev*, doi:S0959-437X(13)00012-9 [pii] 10.1016/j.gde.2013.01.004 (2013).
- 3 Calin, G. A. *et al.* MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A***101**, 11755-11760, doi:10.1073/pnas.04044321010404432101 [pii] (2004).
- 4 Voorhoeve, P. M. & Agami, R. Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly. *Biochim Biophys Acta***1775**, 274-282, doi:S0304-419X(06)00064-3 [pii]10.1016/j.bbcan.2006.11.003 (2007).
- 5 Köpf-Maier, P. *İnsan Anatomi Atlası* 5.ed edn, (Güneş Kitabevi, 2001).
- 6 Tsukise, A. & Yamada, K. Complex carbohydrates in the secretory epithelium of the goat prostate. *Histochem* **J16**, 311-319 (1984).
- 7 Tekelioğlu, M. *Tıp Embriyolojisi*. (Er Ajans 1984 **35** Ankara,
- 8 Erkoçak, A. *Özel Histoloji* Vol. 4. Baskı Ankara Tıp Yayını,. Ankara (1982).
- 9 Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C. & Negri, E. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann Oncol***23**, 1044-1052, doi:mds024 [pii]10.1093/annonc/mds024 (2012).
- 10 Eser, S. (T.C.Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı) (2006).
- 11 BethesdaMD. General Information about Prostate Cancer. *National Cancer Institute* (2011).
- 12 System, W. H. O. S. I. <<http://www3.who.int/whosis/menu.cfm>> (25 March 2011).
- 13 Andreoiu, M. & Cheng, L. Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Hum Pathol***41**, 781-793, doi:S0046-8177(10)00108-5 [pii]10.1016/j.humpath.2010.02.011 (2010).
- 14 Boyle, P., Severi, G. & Giles, G. G. The epidemiology of prostate cancer. *Urol Clin North Am***30**, 209-217 (2003).
- 15 Kadir Polat, E. T., Fatma Aktepe, Bülent Akdoğan, Cem Güler, İbrahim Uzun. . Türkiye'de otopsi serisinde latent prostat kanseri ve yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi sıklığının araştırılması. *Türk Üroloji Dergisi* **35**, 96-100 (2009).
- 16 Hemminki, K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World J Urol***30**, 143-148, doi:10.1007/s00345-011-0801-1 (2012).
- 17 Ozen, M. & Pathak, S. Genetic alterations in human prostate cancer: a review of current literature. *Anticancer Res***20**, 1905-1912 (2000).
- 18 Kaelin, W. G., Jr. The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst***91**, 594-598 (1999).
- 19 Min, J. *et al.* An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB. *Nat Med***16**, 286-294, doi:nm.2100 [pii]10.1038/nm.2100 (2010).
- 20 Li, L. C. Epigenetics of prostate cancer. *Front Biosci***12**, 3377-3397, doi:2320 [pii] (2007).
- 21 Untergasser, G., Madersbacher, S. & Berger, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol***40**, 121-128, doi:S0531-5565(05)00003-3 [pii]10.1016/j.exger.2004.12.008 (2005).

- 22 <https://www.healthtap.com/#user_questions/108934-what-does-bph-mean-on-a-chart>
- 23 Blom, J. H. & Schroder, F. H. [Epidemiology and natural course of benign prostatic hyperplasia]. *Urologe A***31**, 129-134 (1992).
- 24 Verhamme, K. M. *et al.* Incidence and prevalence of lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia in primary care--the Triumph project. *Eur Urol***42**, 323-328, doi:S0302283802003548 [pii] (2002).
- 25 Berry, S. J., Coffey, D. S., Walsh, P. C. & Ewing, L. L. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol***132**, 474-479 (1984).
- 26 Bartsch, G., Rittmaster, R. S. & Klocker, H. Dihydrotestosterone and the concept of 5alpha-reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. *World J Urol***19**, 413-425 (2002).
- 27 Timms, B. G. & Hofkamp, L. E. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation***82**, 173-183, doi:S0301-4681(11)00125-3 [pii]10.1016/j.diff.2011.08.002 (2011).
- 28 Roehrborn, C. G. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *Int J Impot Res***20** Suppl 3, S11-18, doi:ijir200855 [pii]10.1038/ijir.2008.55 (2008).
- 29 Pirke, K. M. & Doerr, P. Age related changes and interrelationships between plasma testosterone, oestradiol and testosterone-binding globulin in normal adult males. *Acta Endocrinol (Copenh)***74**, 792-800 (1973).
- 30 Nass R., T. S., Braun B. E. and Krieg M. Age dependent steroid levels in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia. *Acta Endocr*, 79-157 (1990).
- 31 Ekman, P., Barrack, E. R., Greene, G. L., Jensen, E. V. & Walsh, P. C. Estrogen receptors in human prostate: evidence for multiple binding sites. *J Clin Endocrinol Metab***57**, 166-176 (1983).
- 32 Habib, F. K. *Handbook on Benign Prostatic Hyperplasia* (Raven Press, 1994).
- 33 Zhu, Y. S., Katz, M. D. & Imperato-McGinley, J. Natural potent androgens: lessons from human genetic models. *Baillieres Clin Endocrinol Metab***12**, 83-113 (1998).
- 34 Rossi, M. & Roumeguere, T. Silodosin in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Drug Des Devel Ther***4**, 291-297, doi:10.2147/DDDT.S10428 (2010).
- 35 Ho, C. K. & Habib, F. K. Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH. *Nat Rev Urol***8**, 29-41, doi:nrurol.2010.207 [pii]10.1038/nrurol.2010.207 (2011).
- 36 Krieg, M., Klotzl, G., Kaufmann, J. & Voigt, K. D. Stroma of human benign prostatic hyperplasia: preferential tissue for androgen metabolism and oestrogen binding. *Acta Endocrinol (Copenh)***96**, 422-432 (1981).
- 37 EMIL, A., TANOGHO, J., ve MCANINCH, J.W. *Prostat Kanseri ve Benign Prostat Hiperplazisi*. Vol. 16 (Nobel Kitabevleri, 2004).
- 38 Garcia, M. Global Cancer Facts and Figures *American Cancer Society* (2007).
- 39 Stamey, T. A. *et al.* Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. II. Radical prostatectomy treated patients. *J Urol***141**, 1076-1083 (1989).
- 40 Brawer, M. K., Rennels, M. A., Nagle, R. B., Schifman, R. & Gaines, J. A. Serum prostate-specific antigen and prostate pathology in men having simple prostatectomy. *Am J Clin Pathol***92**, 760-764 (1989).

- 41 Shariat, S. F. *et al.* Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncol***50 Suppl 1**, 61-75, doi:10.3109/0284186X.2010.542174 (2011).
- 42 Huggins C, Scott W, Heinen H. Chemical Composition Of Human Semen And Of The Secretions Of The Prostate And Seminal Vesicles, *Am J Physiol May 1, 1942 136:(3) 467-473*
- 43 Anderson, R. U. & Fair, W. R. Physical and chemical determinations of prostatic secretion in benign hyperplasia, prostatitis, and adenocarcinoma. *Invest Urol***14**, 137-140 (1976).
- 44 Nilsson, B. O., Jin, M. & Ronquist, G. Immunolocalization of prostasomes in the human prostate. *Ups J Med Sci***101**, 149-157 (1996).
- 45 Balbay, D. M. D. *Prostat.* (Güneş Tıp Kitabevi 2008).
- 46 Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res***19**, 92-105, doi:gr.082701.108 [pii]10.1101/gr.082701.108 (2009).
- 47 Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res***39**, D152-157, doi:gkq1027 [pii] 10.1093/nar/gkq1027 (2011).
- 48 Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S. & Enright, A. J. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res***36**, D154-158, doi:gkm952 [pii] 10.1093/nar/gkm952 (2008).
- 49 Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A. & Enright, A. J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res***34**, D140-144, doi:34/suppl_1/D140 [pii]10.1093/nar/gkj112 (2006).
- 50 Biasiolo, M. *et al.* Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA* expression. *PLoS One***6**, e23854, doi:10.1371/journal.pone.0023854 PONE-D-11-09957 [pii] (2011).
- 51 Spizzo, R., Nicoloso, M. S. & Calin, G. A. MicroRNAs as new biomarkers in oncology. *Expert Opin Med Diagn***2**, 115-127, doi:10.1517/17530059.2.2.115 (2008).
- 52 Lages, E. *et al.* MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front Biosci***17**, 2508-2540, doi:4068 [pii] (2012).
- 53 Calin, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A***101**, 2999-3004, doi:10.1073/pnas.03073231010307323101 [pii] (2004).
- 54 Wijnhoven, B. P., Michael, M. Z. & Watson, D. I. MicroRNAs and cancer. *Br J Surg***94**, 23-30, doi:10.1002/bjs.5673 (2007).
- 55 Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell***113**, 25-36, doi:S0092867403002319 [pii] (2003).
- 56 Cuellar, T. L. & McManus, M. T. MicroRNAs and endocrine biology. *J Endocrinol***187**, 327-332, doi:187/3/327 [pii]10.1677/joe.1.06426 (2005).
- 57 Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F. & Bartel, D. P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science***303**, 83-86, doi:10.1126/science.10919031091903 [pii] (2004).
- 58 Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet***10**, 704-714, doi:nrg2634 [pii]10.1038/nrg2634 (2009).

- 59 Gordanpour, A., Nam, R. K., Sugar, L. & Seth, A. MicroRNAs in prostate cancer: from biomarkers to molecularly-based therapeutics. *Prostate Cancer Prostatic Dis***15**, 314-319, doi:pcan20123 [pii]10.1038/pcan.2012.3 (2012).
- 60 Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol***10**, 126-139, doi:nrm2632 [pii]10.1038/nrm2632 (2009).
- 61 Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F. & Hannon, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature***432**, 231-235, doi:nature03049 [pii]10.1038/nature03049 (2004).
- 62 Siomi, H. & Siomi, M. C. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell***38**, 323-332, doi:S1097-2765(10)00251-0 [pii] 10.1016/j.molcel.2010.03.013 (2010).
- 63 Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature***409**, 363-366, doi:10.1038/35053110 (2001).
- 64 Preall, J. B., He, Z., Gorra, J. M. & Sontheimer, E. J. Short interfering RNA strand selection is independent of dsRNA processing polarity during RNAi in *Drosophila*. *Curr Biol***16**, 530-535, doi:S0960-9822(06)01128-6 [pii]10.1016/j.cub.2006.01.061 (2006).
- 65 Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N. & Shiekhattar, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell***123**, 631-640, doi:S0092-8674(05)01109-8 [pii]10.1016/j.cell.2005.10.022 (2005).
- 66 Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D. & Wang, K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res***717**, 85-90, doi:S0027-5107(11)00054-6 [pii]10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004 (2011).
- 67 Suh, S. O. *et al.* MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis***32**, 772-778, doi:bgr036 [pii]10.1093/carcin/bgr036 (2011).
- 68 Sevli, S., Uzumcu, A., Solak, M., Ittmann, M. & Ozen, M. The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis***13**, 208-217, doi:pcan201021 [pii]10.1038/pcan.2010.21 (2010).
- 69 Lu, Z. *et al.* MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene***27**, 4373-4379, doi:onc200872 [pii]10.1038/onc.2008.72 (2008).
- 70 Ozen M, Sevli S. The Role of Cancer Stem Cells and MicroRNAs in Human Prostate Cancer. *Prostate Cancer* (2011) doi: 10.5772/26430
- 71 Hagman, Z. *et al.* miR-34c is downregulated in prostate cancer and exerts tumor suppressive functions. *Int J Cancer***127**, 2768-2776, doi:10.1002/ijc.25269 (2010).
- 72 Johnson, S. M. *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell***120**, 635-647, doi:S0092-8674(05)00088-7 [pii]10.1016/j.cell.2005.01.014 (2005).
- 73 Boll, K. *et al.* MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma. *Oncogene***32**, 277-285, doi:onc201255 [pii]10.1038/onc.2012.55 (2013).
- 74 Schaefer, A. *et al.* Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer***126**, 1166-1176, doi:10.1002/ijc.24827 (2010).
- 75 Ozen M, Karatas OF. MicroRNAs in Human Prostate Cancer: From Pathogenesis to Therapeutic Implications. *miRNAs in Medicine* (Baskida)

- 76 Porkka, K. P. *et al.* MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res***67**, 6130-6135, doi:67/13/6130 [pii]10.1158/0008-5472.CAN-07-0533 (2007).
- 77 Ozen, M., Creighton, C. J., Ozdemir, M. & Ittmann, M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene***27**, 1788-1793, doi:1210809 [pii]10.1038/sj.onc.1210809 (2008).
- 78 Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature***435**, 834-838, doi:nature03702 [pii]10.1038/nature03702 (2005).
- 79 Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol***9**, 654-659, doi:ncb1596 [pii]10.1038/ncb1596 (2007).
- 80 Hunter, M. P. *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One***3**, e3694, doi:10.1371/journal.pone.0003694 (2008).
- 81 Michael, A. *et al.* Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis***16**, 34-38, doi:ODI1604 [pii]10.1111/j.1601-0825.2009.01604.x (2010).
- 82 Dimov, I., Jankovic Velickovic, L. & Stefanovic, V. Urinary exosomes. *ScientificWorldJournal***9**, 1107-1118, doi:10.1100/tsw.2009.128 (2009).
- 83 Chen, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res***18**, 997-1006, doi:cr2008282 [pii]10.1038/cr.2008.282 (2008).
- 84 Weber, J. A. *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem***56**, 1733-1741, doi:clinchem.2010.147405 [pii]10.1373/clinchem.2010.147405 (2010).
- 85 Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D. & Galas, D. J. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res***38**, 7248-7259, doi:gkq601 [pii]10.1093/nar/gkq601 (2010).
- 86 Zubakov, D. *et al.* MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med***124**, 217-226, doi:10.1007/s00414-009-0402-3 (2010).
- 87 Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A***105**, 10513-10518, doi:0804549105 [pii]10.1073/pnas.0804549105 (2008).
- 88 Ramachandran, S. & Palanisamy, V. Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdiscip Rev RNA***3**, 286-293, doi:10.1002/wrna.115 (2012).
- 89 Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K. & Ochiya, T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence***1**, 7, doi:1758-907X-1-7 [pii]10.1186/1758-907X-1-7 (2010).
- 90 Lawrie, C. H. *et al.* Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol***141**, 672-675, doi:BJH7077 [pii]10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x (2008).
- 91 Liu, X. G. *et al.* High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Med Oncol***29**, 618-626, doi:10.1007/s12032-011-9923-y (2012).
- 92 Grange, C. *et al.* Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer*

- Res***71**, 5346-5356, doi:0008-5472.CAN-11-0241 [pii]10.1158/0008-5472.CAN-11-0241 (2011).
- 93 Keller, A. *et al.* Stable serum miRNA profiles as potential tool for non-invasive lung cancer diagnosis. *RNA Biol***8**, 506-516, doi:14994 [pii] (2011).
- 94 Roth, C. *et al.* Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res***12**, R90, doi:bcr2766 [pii]10.1186/bcr2766 (2010).
- 95 Heneghan, H. M. *et al.* Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg***251**, 499-505, doi:10.1097/SLA.0b013e3181cc939f (2010).
- 96 Hanke, M. *et al.* A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol***28**, 655-661, doi:S1078-1439(09)00031-3 [pii]10.1016/j.urolonc.2009.01.027 (2010).
- 97 Park, N. J. *et al.* Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res***15**, 5473-5477, doi:1078-0432.CCR-09-0736 [pii]10.1158/1078-0432.CCR-09-0736 (2009).
- 98 Mahn, R. *et al.* Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology***77**, 1265 e1269-1216, doi:S0090-4295(11)00041-0 [pii]10.1016/j.urology.2011.01.020 (2011).
- 99 Brase, J. C. *et al.* Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer***128**, 608-616, doi:10.1002/ijc.25376 (2011).
- 100 Shen, J. *et al.* Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *Prostate***72**, 1469-1477, doi:10.1002/pros.22499 (2012).
- 101 Moltzahn, F. *et al.* Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Res***71**, 550-560, doi:0008-5472.CAN-10-1229 [pii]10.1158/0008-5472.CAN-10-1229 (2011).
- 102 Lodes, M. J. *et al.* Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One***4**, e6229, doi:10.1371/journal.pone.0006229 (2009).
- 103 Courses", U. t. R. S. C. E. t. T. S. S.
- 104 Dirican, A. Tanı testi performansının değerlendirilmesi ve kıyaslanması., *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 25-30 (2001).
- 105 Metz, C. E. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med***8**, 283-298 (1978).
- 106 Metz, C. E. Receiver operating characteristic analysis: a tool for the quantitative evaluation of observer performance and imaging systems. *J Am Coll Radiol***3**, 413-422, doi:S1546-1440(06)00074-3 [pii]10.1016/j.jacr.2006.02.021 (2006).
- 107 van Erkel, A. R. & Pattynama, P. M. Receiver operating characteristic (ROC) analysis: basic principles and applications in radiology. *Eur J Radiol***27**, 88-94, doi:S0720048X97001575 [pii] (1998).
- 108 Weinstein, S., Obuchowski, N. A. & Lieber, M. L. Clinical evaluation of diagnostic tests. *AJR Am J Roentgenol***184**, 14-19, doi:184/1/14 [pii]10.2214/ajr.184.1.01840014 (2005).
- 109 Hanley, J. A. & McNeil, B. J. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology***148**, 839-843 (1983).



- 110 Sasse, E. A. Objective evaluation of data in screening for disease. *Clin Chim Acta***315**, 17-30, doi:S0009898101007100 [pii] (2002).
- 111 DeLong, E. R., DeLong, D. M. & Clarke-Pearson, D. L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics***44**, 837-845 (1988).
- 112 Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin***63**, 11-30, doi:10.3322/caac.21166 (2013).
- 113 Damber, J. E. & Aus, G. Prostate cancer. *Lancet***371**, 1710-1721, doi:S0140-6736(08)60729-1 [pii]10.1016/S0140-6736(08)60729-1 (2008).
- 114 Viticchie, G. *et al.* MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle***10**, 1121-1131, doi:15180 [pii] (2011).
- 115 Bhatnagar, N. *et al.* Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Death Dis***1**, e105, doi:cddis201085 [pii]10.1038/cddis.2010.85 (2010).
- 116 Mocarska, A. *et al.* [Diagnostic imaging of the prostate cancer]. *Pol Merkur Lekarski***33**, 357-363 (2012).
- 117 Chybowski, F. M., Bergstralh, E. J. & Oesterling, J. E. The effect of digital rectal examination on the serum prostate specific antigen concentration: results of a randomized study. *J Urol***148**, 83-86 (1992).
- 118 Oesterling, J. E. *et al.* Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol***139**, 766-772 (1988).
- 119 Partin, A. W. *et al.* Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol***143**, 747-752 (1990).
- 120 Jiang, J., Lee, E. J., Gusev, Y. & Schmittgen, T. D. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res***33**, 5394-5403, doi:33/17/5394 [pii]10.1093/nar/gki863 (2005).
- 121 Wang, Z., Luo, H., Pan, X., Liao, M. & Hou, Y. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet***6**, 419-423, doi:S1872-4973(11)00181-5 [pii]10.1016/j.fsigen.2011.08.008 (2012).
- 122 Omelia, E. J., Uchimoto, M. L. & Williams, G. Quantitative PCR analysis of blood- and saliva-specific microRNA markers following solid-phase DNA extraction. *Anal Biochem***435**, 120-122, doi:S0003-2697(13)00014-6 [pii]10.1016/j.ab.2012.12.024 (2013).
- 123 Iorio, M. V. & Croce, C. M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol***27**, 5848-5856, doi:JCO.2009.24.0317 [pii]10.1200/JCO.2009.24.0317 (2009).
- 124 Baranwal, S. & Alahari, S. K. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer***126**, 1283-1290, doi:10.1002/ijc.25014 (2010).
- 125 Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet***9**, 102-114, doi:nrg2290 [pii]10.1038/nrg2290 (2008).
- 126 John, B. *et al.* Human MicroRNA targets. *PLoS Biol***2**, e363, doi:10.1371/journal.pbio.0020363 (2004).
- 127 Lee, Y. S., Kim, H. K., Chung, S., Kim, K. S. & Dutta, A. Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of

- differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *J Biol Chem***280**, 16635-16641, doi:M412247200 [pii]10.1074/jbc.M412247200 (2005).
- 128 Ueda, T. *et al.* Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol***11**, 136-146, doi:S1470-2045(09)70343-2 [pii]10.1016/S1470-2045(09)70343-2 (2010).
- 129 Sorrentino, A. *et al.* Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol***111**, 478-486, doi:S0090-8258(08)00645-8 [pii]10.1016/j.ygyno.2008.08.017 (2008).
- 130 Shi, X. B. *et al.* An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A***104**, 19983-19988, doi:0706641104 [pii]10.1073/pnas.0706641104 (2007).
- 131 Takeshita, F. *et al.* Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther***18**, 181-187, doi:mt2009207 [pii]10.1038/mt.2009.207 (2010).
- 132 Tong, A. W. *et al.* MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther***16**, 206-216, doi:cgt200877 [pii]10.1038/cgt.2008.77 (2009).
- 133 Volinia, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A***103**, 2257-2261, doi:0510565103 [pii]10.1073/pnas.0510565103 (2006).
- 134 Gandellini, P., Folini, M. & Zaffaroni, N. Towards the definition of prostate cancer-related microRNAs: where are we now? *Trends Mol Med***15**, 381-390, doi:S1471-4914(09)00121-X [pii]10.1016/j.molmed.2009.07.004 (2009).
- 135 Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. & Burwinkel, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res***39**, 7223-7233, doi:gkr254 [pii]10.1093/nar/gkr254 (2011).
- 136 Blondal, T. *et al.* Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods***59**, S1-6, doi:S1046-2023(12)00255-1 [pii]10.1016/j.ymeth.2012.09.015 (2013).
- 137 Corsten, M. F. *et al.* Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet***3**, 499-506, doi:CIRCGENETICS.110.957415 [pii]10.1161/CIRCGENETICS.110.957415 (2010).
- 138 Ai, J. *et al.* Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun***391**, 73-77, doi:S0006-291X(09)02161-5 [pii]10.1016/j.bbrc.2009.11.005 (2010).
- 139 Silva, J. *et al.* Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J***37**, 617-623, doi:09031936.00029610 [pii]10.1183/09031936.00029610 (2011).
- 140 Maclellan, S. A. *et al.* Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. *Cancer Med***1**, 268-274, doi:10.1002/cam4.17 (2012).
- 141 Wang, G. *et al.* Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer***10**, 106-113, doi:S1558-7673(12)00026-2 [pii]10.1016/j.clgc.2012.01.001 (2012).
- 142 Chen, Z. H. *et al.* A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate***72**, 1443-1452, doi:10.1002/pros.22495 (2012).

- 143 Pang, Y., Young, C. Y. & Yuan, H. MicroRNAs and prostate cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)***42**, 363-369 (2010).
- 144 Roth, C. *et al.* Low levels of cell-free circulating miR-361-3p and miR-625* as blood-based markers for discriminating malignant from benign lung tumors. *PLoS One***7**, e38248, doi:10.1371/journal.pone.0038248PONE-D-12-02500 [pii] (2012).
- 145 Patron, J. P. *et al.* MiR-133b targets antiapoptotic genes and enhances death receptor-induced apoptosis. *PLoS One***7**, e35345, doi:10.1371/journal.pone.0035345PONE-D-11-20757 [pii] (2012).
- 146 Panguluri, S. K. *et al.* Genomic profiling of messenger RNAs and microRNAs reveals potential mechanisms of TWEAK-induced skeletal muscle wasting in mice. *PLoS One***5**, e8760, doi:10.1371/journal.pone.0008760 (2010).
- 147 Koutsoulidou, A., Mastroyiannopoulos, N. P., Furling, D., Uney, J. B. & Phylactou, L. A. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. *BMC Dev Biol***11**, 34, doi:1471-213X-11-34 [pii]10.1186/1471-213X-11-34 (2011).
- 148 Bandres, E. *et al.* Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer***5**, 29, doi:1476-4598-5-29 [pii]10.1186/1476-4598-5-29 (2006).
- 149 Wong, T. S. *et al.* Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *Int J Cancer***123**, 251-257, doi:10.1002/ijc.23583 (2008).
- 150 Ichimi, T. *et al.* Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *Int J Cancer***125**, 345-352, doi:10.1002/ijc.24390 (2009).
- 151 Hu, G. *et al.* miR-133b regulates the MET proto-oncogene and inhibits the growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther***10**, 190-197, doi:12186 [pii] (2010).
- 152 Wu, J. *et al.* Alteration of serum miR-206 and miR-133b is associated with lung carcinogenesis induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Toxicol Appl Pharmacol***267**, 238-246, doi:S0041-008X(13)00015-X [pii]10.1016/j.taap.2013.01.002 (2013).
- 153 Saini, S. *et al.* Regulatory Role of mir-203 in Prostate Cancer Progression and Metastasis. *Clin Cancer Res***17**, 5287-5298, doi:1078-0432.CCR-10-2619 [pii]10.1158/1078-0432.CCR-10-2619 (2011).
- 154 Iorio, M. V. *et al.* MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res***67**, 8699-8707, doi:67/18/8699 [pii]10.1158/0008-5472.CAN-07-1936 (2007).
- 155 Schetter, A. J. *et al.* MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA***299**, 425-436, doi:299/4/425 [pii]10.1001/jama.299.4.425 (2008).
- 156 Galardi, S., Mercatelli, N., Farace, M. G. & Ciafre, S. A. NF- κ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells. *Nucleic Acids Res***39**, 3892-3902, doi:gkr006 [pii]10.1093/nar/gkr006 (2011).
- 157 Spahn, M. *et al.* Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence. *Int J Cancer***127**, 394-403, doi:10.1002/ijc.24715 (2010).

- 158 Zheng, C., Yinghao, S. & Li, J. MiR-221 expression affects invasion potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting DVL2. *Med Oncol***29**, 815-822, doi:10.1007/s12032-011-9934-8 (2012).
- 159 Yaman Agaoglu, F. *et al.* Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol***32**, 583-588, doi:10.1007/s13277-011-0154-9 (2011).
- 160 Chen, Y. *et al.* MicroRNAs 221/222 and genistein-mediated regulation of ARHI tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer Prev Res (Phila)***4**, 76-86, doi:1940-6207.CAPR-10-0167 [pii]10.1158/1940-6207.CAPR-10-0167 (2011).
- 161 Kawaguchi, T. *et al.* Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer***108**, 361-369, doi:bjc2012546 [pii]10.1038/bjc.2012.546 (2013).
- 162 Heegaard, N. H. *et al.* Circulating micro-RNA expression profiles in early stage non-small cell lung cancer. *Int J Cancer***130**, 1378-1386, doi:10.1002/ijc.26153 (2012).

ETİK KURUL KARARI


**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI**


Sayı : B 30277 03090 00 / 43456
 Konu : İstanbul / /

Dahili Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

01 Aralık 2011

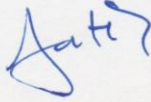
İLGİ: 17.10.2011 tarihli, 10033 sayılı yazımıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi **Doç.Dr.Mustafa ÖZEN**'nin danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğr. Bio. Esra GÜZEL**'in yürüteceği "**Prostat kanserli hastaların prostat sekresyon sıvılarından miRNA eldesi ve mikroarray yöntemi ile miRNA ekspresyon profillerinin karşılaştırılması**" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **29 Kasım 2011** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

Eki:
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Dekan Yardımcısı ve Klinik Araştırmalar
Etik Değerlendirme Kurulu Başkanı



Not: Yanıtlarda yazımızın gün sayısının belirtilmesi rica olunur.Tel:(0212)4143000

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esra	Soyadı	Güzel
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	19.01.1987
Uyruğu	TC	TC Kim No	32497794162
Email	esrgzl@gmail.com	Tel	05558179404

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Haliç Üniversitesi	2009
Lise	Arda Asalet Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce					

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi