



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN (PSA) DEĞERİ 2-10 ng/mL
OLAN HASTALARDA PROSTAT KANSERİ
SAPTANMASINDA mikroRNA'LARIN TANISAL DEĞERİ

Dr. Serin AKBAYIR
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Necati MUŞLU

MERSİN – 2013



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN (PSA) DEĞERİ 2-10 ng/mL
OLAN HASTALARDA PROSTAT KANSERİ
SAPTANMASINDA mikroRNA'LARIN TANISAL DEĞERİ

Dr. Serin AKBAYIR
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Necati MUŞLU

Bu tez, BAP BAP-TF TTB (SA) 2012-1 TU kodlu proje olarak Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

MERSİN – 2013

TEŐEKKÖRLER

Dört buçuk yıllık asistanlığım süresince, ayrıca zorlu ve uzun bir süreç olan tez yazımı ve çalışmalarını esnasında manevi desteğini, anlayışını ve yardımlarını eksik etmeyen tez hocam Doç. Dr. Necati Muşlu'ya,

Uzmanlık eğitimim süresince sorularıyla kapılarını aşındırdığım ve hiçbir zaman yanıtı bırakmayan, destek, ilgi ve gülümsemelerini eksik etmeyen hocalarım Prof. Dr. Gürbüz Polat, Prof. Dr. Lülüfer Tamer Gümüő, Prof. Dr. Gülçin Eskandari ve Prof. Dr. Burak Çimen'e,

Tezimin klinik süreci ve hasta grubu örneklerinin toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Murat Bozlu'ya, Üroloji polikliniği sekreteri ve çalışanlarına,

Tezimin istatistik analizlerini yapan, telefonla dahi olsa yardımlarını esirgemeyen Sema Erden ve Hikmet Çelik'e,

Anlamadığım ya da çözemediğim her soruda bir telefon kadar yakın olup, sabrını ve anlayışını eksik etmeyen Yrd. Doç. Dr. Bahadır Ercan'a,

Yıllarımızı birlikte geçirip, güzel anılara, kalıcı dostluklara yelken açtığımız, çalışmalarımnda yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum giden ve kalan tüm asistan ve mesai arkadaşlarıma,

Yaşamımın her aşamasında sonsuz sevgi, destek, güven, anlayış ve sabırları için aileme,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	9
Prostat Kanseri	10
Patoloji	11
Tanı	14
a. Parmakla Rektal Muayene	14
b. Görüntüleme Yöntemleri	15
c. Biyopsi	15
d. Boyama Yöntemleri	16
e. Biyokimyasal Belirteçler	16
1-Human Kallikrein 2	16
2-Prostat Spesifik Membran Antijen	17
3-Prostatik Asit Fosfataz	17
4-Nöroendokrin Belirleyiciler	17
5-Prostat Spesifik Antijen	17
a) Yaşa Özgü PSA	20
b) PSA Hızı (Velositesi)	21
c) PSA'nın Hacme Bağlı Türevleri	21
d) PSA'nın Serum Dağılımına Bağlı Türevleri	22
Serbest PSA	22
Kompleks (Bağlı) PSA	23
α -1 Antikimotripsin Bağlı PSA	23
α -2 Makroglobulin Bağlı PSA	23
α -1 Proteaz İnhibitör Bağlı PSA	23
f. Moleküler Tanı	24
MikroRNA	24

a. mikroRNA'nın Keşfi	24
b. Tanım	25
c. mikroRNA'lar Nerede Kodlanır	25
d. mikroRNA Biyogenezi	26
e. mikroRNA'nın Görevleri	28
Kanser ve mikroRNA	30
Prostat Kanseri ve mikroRNA	31
GEREÇ VE YÖNTEMLER	34
Çalışma Grubu ve Örnek Alımı	34
İşlemlerde Ortak Kullanılan Sarf Malzemeler	34
İşlemlerde Ortak Kullanılan Cihazlar	35
1-EDTA'lı tüpe alınan tam kandan plazma eldesi	37
2-Plazmadan total RNA izolasyonu	38
3-Total RNA'lardan cDNA eldesi	39
4-mikroRNA pre-amplifikasyonu	41
5-Dynamic array ile mikroRNA amplifikasyonu	43
mikroRNA Ekspresyonunun İstatistiksel Analizi	45
BULGULAR	47
Hasta-1 ile Kontrol Gruplarında T-PSA ve s/T PSA Değerlerine Ait Bulgular	47
Hasta-1 ile Kontrol Gruplarında miRNA Ekspresyon Değerlerine Ait Bulgular	49
Hasta-2 ile Hasta-1 Gruplarında T-PSA ve s/T PSA Değerlerine Ait Bulgular	53
Hasta-2 ile Hasta-1 Gruplarında miRNA Ekspresyon Değerlerine Ait Bulgular	54
Hasta-2 ile Kontrol Gruplarında T-PSA ve s/T PSA Değerlerine Ait Bulgular	61
Hasta-2 ile Kontrol Gruplarında miRNA Ekspresyon Değerlerine Ait Bulgular	61
TARTIŞMA	66
SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	92
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	95
TABLolar DİZİNİ	97

ÖZET

Erkeklerde görülen kanserler arasında ikinci sırada yer alan prostat kanserininin erken tanısında kullanılan PSA, bilinen en iyi tümör belirteçlerindendir. Bununla birlikte gri zon olarak isimlendirilen PSA'nın 2-10 ng/mL arasında olduğu durumlarda benign prostat hastalıkları ile prostat kanserlerini ayırmada çok yetersizdir. Özellikle gri zon hastalarında PSA'nın tanısal gücünü arttırabilmek amacıyla kanserle ilişkisi birçok çalışma ile gösterilmiş miRNA'lardan faydalanmayı amaçladık.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran, prostat biyopsisi yapılmış hastalardan; PSA değeri 2-10 ng/mL aralığında olan ve patoloji sonucu benign olan 44 hasta kontrol grubunu, malign olan 37 hasta hasta-1 ve PSA değeri >10 ng/mL ve patoloji sonucu malign olan 13 hasta hasta-2 grubunu oluşturdu. Toplam 94 hasta serumundan sPSA ve T-PSA düzeyleri direkt kemiluminometrik sandviç immunoassay yöntemi ile ölçüldü. Plazmadan izole edilen miRNA'ların ekspresyonları ise qRT-PCR ile çalışıldı. T-PSA, s/T PSA oranı ve miRNA'ların ROC eğrileri çizilerek en uygun özgüllük, duyarlılık ve kestirim değerleri bulunarak tanısal güçleri karşılaştırıldı.

Kontrol-hasta-1 karşılaştırmasında; miRNA'ların tanısal güçleri, daha yüksek AUC'ye sahip olduğu için s/T PSA (AUC=0.602) ile karşılaştırıldı. miR-16-5p (AUC=0.586) ile s/T PSA kombinasyonunun tanısal gücünün daha iyi olduğu gösterildi (AUC=0.616). Kontrol-hasta-2 karşılaştırmasında ise miR-125b-5p ve miR-194-5p'nin tanısal güçlerinin diğer parametrelere göre daha değerli olduğu görüldü (sırasıyla; AUC=0.818 ve 0.806).

Sonuç olarak, gri zondaki hastalarda prostatın benign ile malign ayırımını yaparken miR-16-5p ile s/T PSA kombinasyonun tek başına T-PSA veya s/T PSA'dan daha değerli olduğu bulundu. Erken tanıda miRNA rollerinin prostat kanseri evrelerine göre, daha geniş gruplarla ileri araştırmalarla gösterileceğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Belirteç, Gri zon, mikroRNA, Prostat kanseri.

ABSTRACT

Detection of microRNAs' Diagnostic Value in Prostate Cancer Patients With 2-10 ng/mL Prostate Specific Antigen (PSA) Levels

PSA is the best tumor marker so far used in early diagnosis of prostate cancer which is known as the second most common cancer seen in males. Withal in cases with levels of PSA between 2-10 ng/mL which is known as grey zone it is insufficient to distinguish prostate cancer from benign prostate diseases. In order to increase diagnostic power of PSA we aimed to take the advantage of miRNAs which has been shown to play role in cancer.

Prostate biopsy performed patients were grouped to form, PSA in the range of 2-10 ng/mL diagnosed as benign in 44 patients as the control, 37 patients diagnosed with malignancy as patient-1 and PSA is >10 ng/mL, diagnosed as malignant of 13 patients as the patient-2, who applied to Mersin University Medical Faculty Hospital Urology department. A total of 94 patients fPSA and T-PSA levels in serum was measured by direct chemiluminometric sandwich immunoassay method. Expressions of miRNAs isolated from plasma samples were performed by qRT-PCR method. T-PSA, f/T PSA and miRNA expressions were evaluated using ROC curves in order to achieve prognostic power via sensitivity, specificity and cut-off values.

Control-patient-1 comparison has shown that f/T PSA ratio has been used to compare with miRNAs diagnostic power because of its better AUC (0.602). miR-16-5p (AUC=0.586) and f/T PSA combination's diagnostic power (AUC=0.616) has shown the better. Control-patient-2 comparison has seen that miR-125b-5p and miR-194-5p's diagnostic powers have found to be more valuable than the other parameters (respectively; AUC=0.818 and 0.806).

In conclusion, discriminate the benign disease from prostate cancers in grey zone, miR-16-5p with f/T-PSA ratio is found more valuable than single T-PSA or f/T PSA ratio. We think the role of miRNA in early diagnosis of prostate cancer according to the stages, will be shown with further researches in larger sample groups.

Key Words: Grey zone, Marker, microRNA, Prostate cancer.

GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri, erkeklerde tüm kanserler arasında ikinci sırada yer alan, ileri yaşlarda görülen, son yıllarda tarama çalışmaları ile daha erken yaşlarda tanı almaya başlayan, yavaş ilerleyen sessiz kanserlerdendir¹⁻³.

Prostat kanserini organa sınırlı hastalık durumunda yakalamak, bu kişilerde hastalısız yaşamı artırmak ve mortaliteyi azaltmak açısından önemlidir. Bu amaçla erken tanı için 50 yaşından sonra yıllık prostat spesifik antijen (PSA) ve parmakla rektal muayene (PRM) kombinasyonu tarama olarak önerilmektedir⁴⁻⁷. Şüpheli kitle varlığında transrektal ultrason (TRUS) eşliğinde biyopsi, prostat kanseri tanısı için altın standart yöntem olarak kullanılmaktadır⁴.

Günümüzde en çok kullanılan tümör belirteci olan PSA'nın, prostat kanseri erken tanısı, tedavinin izlemi ve evrelemede önemli katkıları vardır. PSA ve duyarlılığını artırmak amaçlı kullanılan PSA türevlerinin klinik kullanıma girmesiyle lokalize prostat kanseri insidansı, erken dönemde kanser tanısı konulabildiği için, giderek artmıştır. Prostat hacminin iyi bir göstergesi olduğu bilinen PSA'nın prostat malignitesi yanında benign hastalıklarda da artması kansere değil organa özgü bir tümör belirteci olduğu görüşünü desteklemiştir, benign-malign kitle ayırımında özgüllük ve duyarlılığının düşük kalması ile tümör belirteci olarak değeri sorgulanmaya başlanmıştır. Diğer yandan, özellikle benign prostat hipertrofisi (BPH) ve prostat kanserli olguların çakıştığı PSA'nın 2-10 ng/mL olduğu değerlerde, biyopsi yapılması, sonrasında tedavi uygulanması yük oluşturmaktadır⁸⁻¹⁰. Bu nedenle, prostat kanseri erken tanısında, girişimsel işlem yapılmadan elde edilebilecek, duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla araştırılan moleküllerden biri de mikroRNA'dır (miRNA).

miRNA'lar; 21-23 nükleotid uzunluğunda, proteine çevrilmeyen, tek zincirli RNA'lardır. Mesajcı ribonükleik asit'e (mRNA) tam ya da kısmi bağlanmasına göre yıkımını tetikleyerek veya translasyonunu baskılayarak gen ekspresyonunu düzenleyici rol oynarlar¹¹⁻¹³. Genlerinin çoğunun kanser ile

ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde veya kırılğan bölgelerde yerleşik olması miRNA'ların neoplazi patogenezinde önemli rolleri olduğuna işaret etmektedir¹⁴.

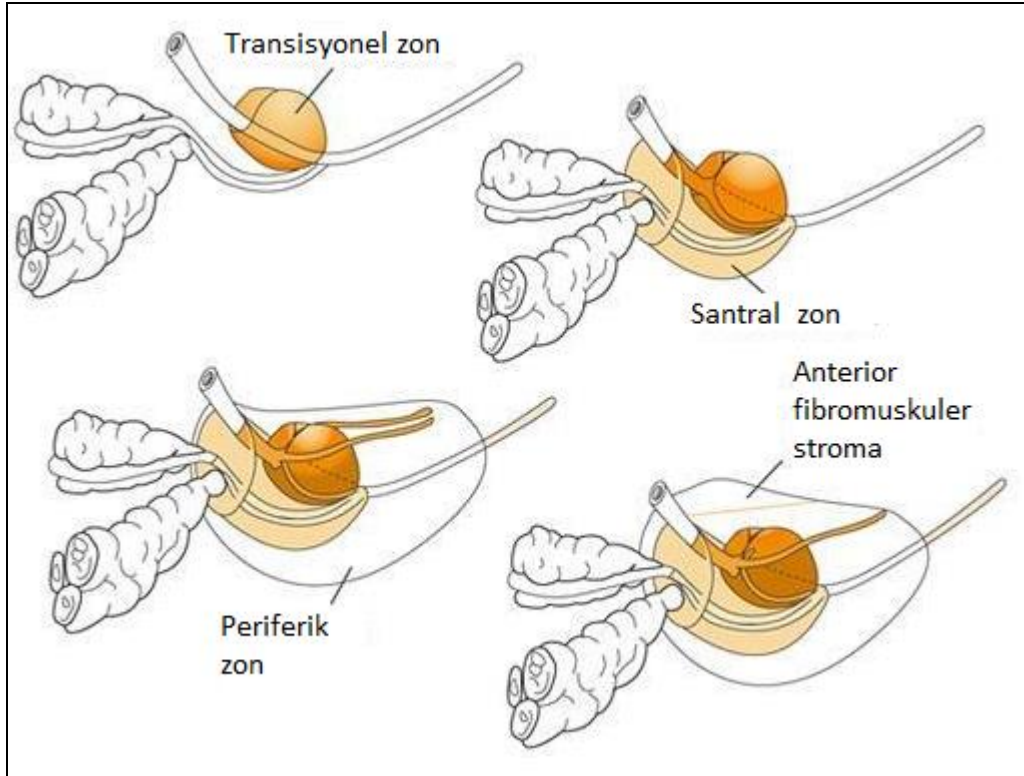
miRNA ekspresyon düzeylerinin normal-malign dokular arasında farklılık göstermesi, ekspresyon şiddeti ile prognoz arasında ilişkinin varlığı yanında doku örnekleri ve vücut sıvılarında uzun süre stabil kalmaları miRNA'ların malign hastalıkların tanı, prognoz ve sınıflamasında yeni belirteçler olabileceklerini düşündürmüştür. Bu amaçla birçok kanser türünde ve prostat kanserli gruplarda çalışmalar yapılmıştır¹⁵⁻²⁶.

Bu çalışmada, PSA'nın benign-malign ayırımını yapmakta yetersiz kaldığı düzey olan gri zonda bulunan hastalar hedef alındı. Bu hastalar içinde patolojik olarak benign prostat hastalıkları tanısı alanlar kontrol, prostat kanseri tanısı alan, PSA değeri 2-10 ng/mL aralığında olanlar hasta-1, PSA>10 ng/mL olan kanserli hastalar ise hasta-2 grubu olarak seçildi. Bu üç grupta daha önceden belirlenen 59 farklı miRNA'nın ekspresyon profillerini çalışıldı. Böylece gri zondaki hastalarda, benign-malign ayırımı yapmada total PSA (T-PSA), serbest/total PSA (s/T PSA) ve miRNA ekspresyon düzeylerinin her birinin ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında tanısal güçlerini değerlendirmek amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

Prostat, gestasyonun üçüncü ayında prostatik üretra epitelinin mezenşime invajinasyonu ile oluşup, 25-30'lu yaşlarda 18-20 gram ağırlığa ulaşan, duktal sisteme sahip, mesane tabanına yaslanmış ters koni şeklinde bir bezdir^{4, 27}.

Santral zon, periferik zon, transisyonel zon ve anterior fibromuskuler stroma olmak üzere 4 zondan oluşan normal erişkin prostatının %30'u fibromuskuler doku, %70'i ise glandüler dokudan oluşmaktadır (Şekil 1). Glandüler doku %70-75 periferik zon, %20 santral zon ve %5 transisyonel zondan oluşur. Fibromuskuler stroma özellikle glandin anterior bölgesinde yoğunlaşmıştır^{4, 28}.



Şekil 1: Prostatın zonal anatomisi.

Prostatın posterior ve posterolateral bölgesinde yoğunlaşan fibröz doku, gerçek bir kapsül yapısında olmasa da kapsül olarak adlandırılır ve glandın özellikle posterolateralini korur⁴.

Prostat Kanseri

Prostat kanseri, erkeklerde tüm kanserler arasında ikinci, ölüme sebep olan kanserler arasında ise altıncı sırada yer alan, insidansı hemen hemen tüm ülkelerde giderek artmakta olan bir kanserdir^{1, 2}.

Türkiye’de sağlıklı bir istatistik olmamakla birlikte Sağlık Bakanlığı’nın bildirilen vakalarla yaptığı değerlendirmelerde prostat kanseri tüm kanserler arasında 6.-7. sıralarda yer almaktadır⁴.

Prostat kanseri, çoğu yavaş ilerleyen sessiz kanserlerdendir ve hastaların %75’i 65 yaş üstünde tanı alır, ancak son yıllarda tarama çalışmaları ile 50 yaş civarında tanı konulmaya başlanmıştır³. Değişik ülkelerde, başka nedenlerle ölen 50 yaş üzeri erkeklerden yapılan otopsilerde %30-50’sinde histolojik (latent) prostat kanseri tespit edilmektedir^{4, 29}.

Etiyolojisi tam olarak netleşmese de etnik populasyonlar ve ülkeler arasında farklı sıklıkta görüldüğü, örneğin Çin ve Japonya’da düşük oranda, Kuzey Amerika ve İskandinav ülkelerinde ise daha yüksek oranda saptandığı, bilinmektedir. Prostat kanseri oluşumu ile yağlı beslenmenin, yüksek serum kalsiyum düzeyinin, kadmiyum ilişkili mesleklerin, kronik infeksiyonların, yüksek androjen seviyelerinin, vazektomi operasyonunun ilişkili olduğunu gösteren yayınlar vardır⁴.

Kronik infeksiyon sonrası gelişen proliferatif inflamatuvar atrofının histopatolojik olarak prostat kanseri prekürsörü olabileceği düşünülmektedir. BPH ve prostat kanserinin, yaşlı erkeklerde görülme, androjen bağımlı olma gibi ortak noktaları olmasına karşın aralarında kesin bir etkileşim görülmemiştir. Vazektomi sonrası antisperm antikörlerin gelişmesi, seminal androjen konsantrasyonunun ve prostatik sekresyonların azalması prostat kanseri riskini artırıcı faktörler olarak ileri sürülse de ispatlanmamıştır⁴.

Dolaşımdaki androjenler normal prostat gelişiminde etkin olduğu gibi, BPH ve kanser sürecinde de etkilidirler. Kanseri sürecindeki rolleri tam olarak

bilinmemekte, ancak hücre büyüme ve bölünmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Serum testosteron seviyesiyle prostat kanseri gelişme riski arasında ilişki bulunmamaktadır. Testosteron prostatta 5- α redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona (DHT) çevrilir. 5- α redüktaz eksikliği olan psödohermafroditlerde prostat kanseri görülmez. Hepatik sirozda dolaşımdaki östrojenler artarken, testosteron seviyesi ve ona bağlı olarak DHT seviyesi düşmektedir. Bu değişiklikler, sirozlu hastalarda prostat kanseri riskinin azalmasında etkilidir⁴.

Prostat kanserinin erken yaşlarda familial, ileri yaşlarda ise sporadik geliştiği gözlenmiştir. Birinci derece yakınlarında prostat kanseri olan kişilerde, genel popülasyona göre 2.1-2.8 kat daha fazla kanser görülme riski vardır. Prostat kanseri çok basamaklı, kronik ve kompleks karsinogenez olaylarının etkileşimi ile oluşmaktadır. Genetik değişiklikler bu basamakların en önemlilerindedir ki bunlar nokta mutasyonları, amplifikasyon, delesyon, translokasyon ve mitotik rekombinasyonlar şeklindedir. Ayrıca hücre proliferasyon ve diferansiasyonunu kontrol eden genler, fonksiyon ve etkinliklerini değiştirerek, gelişim-kontrol mekanizmalarından kurtulmuş hücrelerin oluşmasına neden olur^{4, 29, 30, 31}.

Patoloji

Prostatta; kanser, kronik prostatit ve postinflamatuar atrofinin en çok yerleştiği alan periferik zondur. Yaşla orantılı olarak periferik zon epitelinde yassılaşıma ve atrofi başlarken, transisyonel zonda ise glandüler-stromal hiperplazi yani BPH görülür. Prostat kanserinin %10'u transisyonel zonda, %10 kadarı da santral zonda yerleşim göstermektedir^{4, 32}.

Prostat kanserinin fibröz kapsülü geçip etraftaki yağ ve bağ dokusuna yayılmasına göre; prostata sınırlı veya prostatı aşan tümörler olarak ayrılmaktadır. Prostat kapsülü, apeks ve ön yüzde daha zayıftır ve kanser glandin hemen üzerinde yer alan vezikula seminalis aracılığıyla ve perinöral olarak yayılabilir. Kanserin vezikula seminalise invazyonu çok önemli bir prognostik göstergedir⁴.

Prostat dokusunda kanserle ilişkili lezyonlar 3 grupta ele alınabilir.

1-Atipik Küçük Asiner Proliferasyon (Atypical small acinar proliferation; ASAP): Kanser veya kanserle karışabilecek benign lezyonlardır. Her zaman klasik asiner proliferasyon olmayabilir. Prostat biyopsilerinde atipik ya da kesin tanının konamadığı oran ortalama %7 kadardır ve bu hastalarda tekrarlanan biyopsilerde %35-50 kansere rastlanması nedeniyle, atipik görülen her biyopsinin tekrarlanması gereklidir⁴.

2-Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (Prostatic Intraepithelial Neoplasia; PIN): Önceden histolojik değişikliklerin şiddetine göre PIN1, PIN2, PIN3 şeklinde sınıflandırılırken şimdi yüksek dereceli PIN (High Grade PIN; HGPIN) ve düşük dereceli PIN (Low Grade PIN; LGPIN) olarak sınıflandırılmaktadır⁴.

LGPIN, normal prostat dokusundan her zaman ayırt edilemez, bu nedenle raporlanmamalıdır⁴.

HGPIN ise, stromal invazyon göstermeyen, bazal hücre tabakası korunmuş benign bezlerde küçük büyütmede hiperkromazi ve daha büyük büyütmede sitolojik atipi ve belirgin nukleolus görülen proliferatif lezyondur. Bu lezyon ne kadar fazla alanda görülürse o kadar fazla kanser odağı var demektir. HGPIN'in prostat adenokarsinomu gibi periferik zonda daha fazla görülüyor olması HGPIN'in prostat karsinomunun ön belirtilerinden biri olduğunu düşündürmektedir. Biyopsilerde HGPIN insidansı ortalama %6'dır ve bu hastaların bir yıl sonra tekrarlanan biyopsilerinde %23-35 oranında kanser görülmektedir⁴.

3-Prostat Kanseri: Çok büyük kısmını adenokarsinomlar oluştururken çok az bir kısmı transisyonel hücreli karsinom tipindedir. Prostatta görülebilen diğer kanser tipleri ise çok ender görülürler⁴.

a) Adenokarsinom (%98), mikroasiner yapıların proliferasyonu ve lümeni döşeyen hücrelerin bazal tabakasının yokluğu ile karakterizedir. Belirgin nukleol içerebilir, ancak hücrede belirgin hiperkromazi-atipi varlığı, sınırların yarısından fazlasının etrafında glandüler yapı görülmesi adenokarsinom tanısı için yeterlidir. Mikroasiner proliferasyon gösteren glandlar rastgele sıralı olarak

görülebilmektedir. Radikal prostatektomiden sonra yapılan incelemelerde adenokarsinomların %60 kadarının iyi ve orta derecede differansiye, %40 kadarının az differansiye olduğu görülmüştür. Derece tespitinde son zamanlarda; ploidi, nükleer morfoloji, histokimyasal belirleyiciler ve proliferasyon belirleyicileri kombine edilmeye çalışılmaktadır. McNeal, prostat adenokanserlerinin %68'inin periferik zondan oluştuğunu belirtmiştir²⁸. Transüretral rezeksiyon (TUR) ile tespit edilenlerin çoğu transisyonel zondan gelişen kanserlerdir ve bunlar genelde anterior bölümden köken alan, hiperplastik nodüller içerisinde başlayan, derecesi düşük ve iyi diferansiye tümörlerdir. Anterior bölüm fibromuskuler zon ile sınırlı olduğundan ve ejakülatör kanala uzak olduğundan lenf nodu metastazı, kapsül penetrasyonu veya vezikula seminalis invazyonu çok seyrekdir⁴.

b) Transisyonel Hücreli Kanserlerde (%1-5), hemen daima stroma invazyonu görülür. Mesane boynuna ve çevre yumuşak dokuya yayılma eğilimi gösterir. Hastaların %20'sinde, en sık osteolitik karakterdeki kemik, akciğer ve karaciğerin tutulduğu uzak metastazlar görülmektedir⁴.

c) Müsinöz Adenokarsinom, agresiftir ve kemik metastazı yapmaya eğilimlidir⁴.

d) Prostatik Duktal Adenokarsinom, papiller ve villö-glandüler yapısı ile endometrium adenokarsinomlarını anımsatır ve agresif seyreder⁴.

e) Skuamöz ve Adenoskuamöz Kanserler, genellikle hormon tedavisi veya radyoterapi alan adenokanserlerde sık görülür. Osteolitik metastaz yapar ve östrojen tedavisine cevap vermezler⁴.

f) Küçük Hücreli Kanser (Small cell carcinoma), çok agresif ve ölümcül bir formdur. Çok nadir rastlanır ve olgularının %50'sinde adenokarsinom içeren mikst tipte tümör olarak görülür. Adrenokortikotropik hormon ve antidiüretik hormon salgılayan prostat tümörlerinin çoğunu oluşturmaktadır⁴.

g) Sarkomatoid Karsinom (Karsinosarkom), çok nadir görülür ve tedaviye dirençlidir⁴.

h) Rhabdomyosarkom ise prostatın en sık mezenşimal tümörü olup özellikle çocuklukta görülür. Yetişkinlerde ise leiomyosarkom prostatın en sık görülen sarkomudur⁴.

Tanı

Erkek popülasyonunda gözlenen en önemli malignitelerden biri olan prostat kanserinin erken tanısı ve 50-60 yaşlarında sıklığı artmaya başlayan BPH ile ayırımı başarılı tedavi için çok önemlidir³³.

Diğer kanserlerde olduğu gibi prostat kanserinde de organa sınırlı hastalık durumunda yakalamak, bu kişilerde hastalısız yaşamı uzatmak ve mortaliteyi azaltmak açısından önemlidir. Bununla birlikte başka nedenlerle ölen erkeklerin postmortem incelemesinde, %30-50'sinde prostat kanseri histolojik görüntüleri bulunmuş olması her prostat kanserinin ölüme sebep olmadığını ve en az yarısının yavaş ilerlediğini düşündürmektedir. Ancak genç, yüksek dereceli, anöploid kanserlerde ilerleme hızlı olduğundan, bu kişilerde erken tanı hayat kurtarıcı olmaktadır. Bu amaçla erken tanı için 50 yaş üzerindeki erkeklerde yıllık PSA ve PRM kombinasyonu önerilmektedir. Ayrıca aile hikayesi olanlarda kanser görülme riski artmış olduğu için PSA taramalarına daha erken, 40-45 yaş civarında, başlamak gerekmektedir. Erken tanı çalışmaları sonucu, gelişmiş ülkelerde hastaların yalnızca %5'inde ilk tanıda uzak metastatik hastalık bulunmaktadır^{4-7, 34-38}.

Prostat kanseri tanısında birçok farklı yöntem kullanılmaktadır.

a. Parmakla Rektal Muayene (PRM): PRM, PSA'nın yaygın olarak kullanılmaya başlamasından önce en önemli erken tanı aracıydı. 50 yaş üzeri erkeklerde yılda bir kez PRM yapılması tavsiye edilmektedir. Kanser kitlesi 0.3-1.3 mL arası olanların bile PRM ile palpe edilebileceği bildirilmektedir. PRM ile kanser ve yine kitle bulgusu veren BPH, prostatit, prostat taşları, infarktüs, tüberküloz ve biyopsi sonrası oluşan endurasyon ve nodüllerin ayrılması mümkün olmayabilir. PRM'nin prostat kanseri tanısında tek başına pozitif kestirim değeri %23-56 arasındadır. PSA değerleri arttıkça PRM'nin pozitif kestirim değerinin de arttığına yönelik sonuçlar mevcuttur. Prostat kanserli hastaların %25'i, 4 ng/mL'den daha düşük PSA düzeylerine sahip olmasından dolayı anormal PRM'li olanlara PSA sonucuna bakılmaksızın prostat biyopsisi önerilmektedir^{4, 39-42}.

b. Görüntüleme Yöntemleri: Kemik metastazı varlığını değerlendirmek amacıyla Kemik Sintigrafisi, kemik sintigrafisinde bulunan pozitif bulguların desteklenmesi için Direkt Üriner Sistem Grafisi (DÜSG) ya da direkt kemik grafileri ve ayrıca mesanenin durumu, kanserin trigon ve üreter alt uçlarına invazyonu ile oluşan üreterohidronefrozun gösterilmesi amacıyla İntravenöz Pyelogram (IVP) uygulanabilmektedir⁴.

TRUS'un tanıda en yaygın kabul edilen rolü, hastalığın tanısı için altın standart yöntem olan sistematik prostat biyopsisine kılavuzluk yapması, prostat hacminin belirlenmesi ve kanser evrelemesinde de yararlı olmasıdır. TRUS ile tümör hacmi kesin olarak belirlenemese de prostat hacmi "uzunluk x genişlik x derinlik x 0.52" formülüyle hesaplanmaktadır. Akut prostatit durumunda kullanılmaması gereken TRUS ile periferik zon kanserleri %60-70 doğrulukla gösterilebilmektedir⁴.

Bilgisayarlı Tomografi (BT), lenfadenopatinin gösterilmesi ve özellikle klinik lokal invaziv tümörde planlanan hormonal tedavi+radyoterapi öncesi ileriki takip için faydalı olabilir⁴.

Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRG), özellikle Endorektal helezonlu (coil) MRG spektroskopisi ile tamamlandığında prostatın bugün mümkün olan en ayrıntılı görüntülerini sağlar ve kanser bölgelerini, prostat dışına taşma alanlarını, periferik zonu, vezikula seminalis invazyonunu, lenfadenopati, doku karakteri (kanama, sıvı, yağ gibi) ve bölge anatomisini göstermede çok başarılıdır. Bu nedenle evreleme için de kullanılabilir^{4, 43}.

c. Biyopsi: Günümüzde PSA yüksekliği ya da PRM'de kanser şüphesi varsa TRUS eşliğinde biyopsi, hastalığın tanısı için altın standart yöntem olarak kullanılır. Periprostatik lokal anestezi sonrasında genelde 10 ya da 12 kadrandan biyopsi alınır. Önceden uygulanan 6 kadrana göre, 12 kadranda biyopsi kanser tespitini %29 oranında artırmıştır. Lateral biyopsiler, periferik zonu daha iyi örneklenmesini sağlamaktadır. Lateral midgland ve lateral taban kısımları en fazla kansere rastlanan biyopsi yerleridir. İlk biyopsi sonucu normal gelen kişide anormal PRM devam ediyorsa, PSA hala yüksekse veya ilk biyopside malign şüpheli histolojik bulgular varsa ikinci biyopsi planlanır.

Kanseri olan kişide ilk iki biyopsi %92 olasılıkla kanser tanısını koyarken üçüncü biyopsi bu oranı %97'ye taşır^{43, 4}.

d. Boyama Yöntemleri: Prostat kanserinin tanısında ve ayırıcı tanısında biyopsi materyalinin çeşitli histokimyasal metodlarla boyanması önemli yer tutar. Prostat dokusunda özellikle kanser hücrelerinde fazlaca eksprese olan PSA, prostatik asit fosfataz (prostatic acid phosphatase; PAP), *α-methyl-CoA racemase* (AMACR), nöroendokrin belirleyiciler (serotonin, kalsitonin, somatostatin gibi) prostat kanserinin diğer ürotelyal kanserler, kolon kanseri, granülomatöz prostatit ve lenfoma gibi durumlardan ayırt edilmesinde faydalıdır. Ayrıca küçük hücreli karsinomda nörosekretuar granüllerin gösterilmesi (çoğunlukla serotonin, daha az oranda da kalsitonin, somatostatin, insan koryonik gonadotropini (human chorionic gonadotropin; hCG)), adenokarsinomda sitokeratinin gösterilememesi, transisyonel hücreli karsinomda PSA/PAP negatif olması, müsinöz adenokarsinomda ise karsinoembriyonik antijen (carcinoembryonic antigen; CEA) boyası ile boyanması gibi özellikleri ile ayırt edilmelerinde boyama yöntemleri önemlidir⁴.

e. Biyokimyasal Belirteçler: Prostat kanseri tanısında, serum veya plazmada analiz edilebilecek çeşitli belirteçler kullanılmıştır. Bunlar arasında Human Kallikrein 2, Prostat Spesifik Membran Antijeni, Prostatik Asit Fosfataz, Nöroendokrin Belirleyiciler, PSA ve türevleri sayılabilir⁸.

1.Human Kallikrein 2 (hK2): Aminoasit dizisi PSA ile %80 benzerlik gösteren ve PSA aktivasyonunda görev aldığı düşünülen bir moleküldür. Serum konsantrasyonu PSA'dan 100 kat daha az olmakla birlikte, %80-95'inin serbest formda olduğu belirlenmiştir. PSA'ya üstünlüğü gösterilemese de kanserli hastalarda seviyesinin arttığı çalışmalarda gösterilmiştir. Yine de, hK2/sPSA oranının, s/T PSA'ya göre daha yüksek özgüllüğe sahip olduğu görülmüştür⁸.

2.Prostat Spesifik Membran Antijen (PSMA): Kanserli dokularda daha fazla eksprese edilen, membrana bağılı bir antijendir. Serumda görülmesi, prostat hücrelerinin dolaşımında olduğunu düşündürmektedir. Bu amaçla, metastatik prostat kanseri tespiti için değerlendirilmiş, ancak %39-91 gibi geniş bir duyarlılık aralığı olması nedeniyle güvenilirliği sorgulanmıştır. Yine de anaplastik ve hormona dirençli kanserlerde PSMA yüksek bulunduğu için, evre ve prognoz tayininde bu antijenin histokimyasal yöntemlerle gösterilmesinin faydalı olabileceği düşünülmektedir^{4, 8}.

3.Prostatik Asit Fosfataz (PAP): Prostat epitelinde bulunan, hücre proliferasyonunda önemli görevleri olduğu düşünülen protein tirozin fosfatazlardan biridir. PSA'nın 1986 yılında klinik kullanıma girmesine kadar, prostat kanserli hasta takibinde kullanılmaktaydı. PSA'ya göre, prostat kanseri tanı ve takibinde daha düşük duyarlılıkta olduğu için rutinde kullanılmamaktadır. Son zamanlardaki çalışmalarda, özellikle kanser hücrelerinde düşük seviyede PAP saptanması, bunun da klinik progresyonla ters korelasyon göstermesi, agresif seyreden olgularda PAP'ın yeniden belirteç olarak kullanılabileceğini gündeme getirmiştir⁸.

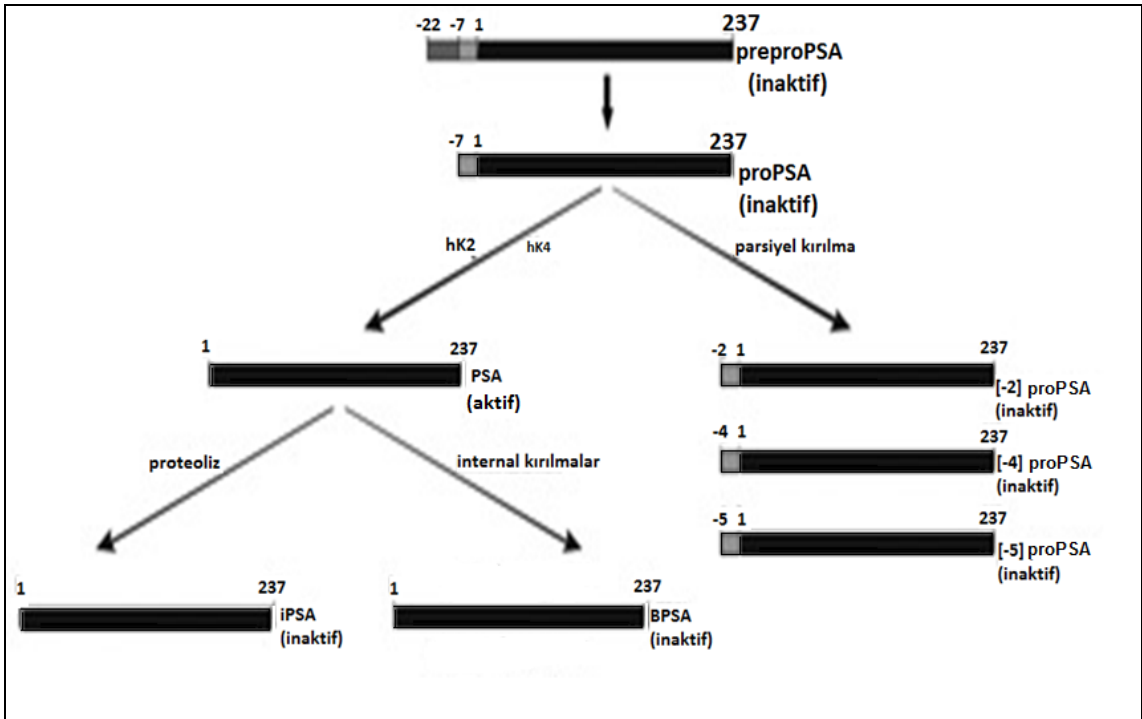
4.Nöroendokrin Belirleyiciler: Normal prostat glandı ve asinilerde serotonin, daha az oranda da kalsitonin, somatostatin gibi belirleyiciler ile dolu granüller içeren endokrin-parakrin hücreler bulunur⁸.

Küçük hücreli kanserlerde çoğunlukla fokal olmak üzere nöroendokrin diferansiasyon olabilir. Kromogranin-A, nöron spesifik enolaz, serotonin, bombesin, kalsitonin, katakalsin, tiroid uyarıcı hormon benzeri peptid ve parathormon ilişkili protein gibi sekretuar ürünler tümör belirteci olarak kullanılabilir. Nöron spesifik enolaz, özellikle de kromogranin-A'nın serum değerlerinin belirteç olarak klinik rolünün olabileceği tartışılmaktadır⁸.

5.Prostat Spesifik Antijen (PSA): PSA, human kallikrein 3 olarak bilinen, 19. kromozomun q kolunda kodlanan (19q13,4) serin proteaz grubundan bir glikoproteindir⁸.

İlk olarak 1970 yılında insan prostat dokusu ekstraterinde tespit edilmiş, 1979 yılında özellikleri tanımlanarak saflaştırılmıştır. 1980 yılında serumda saptanmış, 80'li yılların sonlarında klinik kullanıma girmiştir. Prostat kanseri için en önemli tümör belirteci haline gelmiştir⁴⁵⁻⁴⁸.

259 aminoasitten oluşan preproPSA prostatın duktal ve asiner epitelinde ve periüretral bezlerde sentezlendikten sonra sekretuar epitelden lümene 244 aminoasitlik proPSA olarak salınır. Lümene proPSA N-terminalindeki arginin ile izolösin arasından hK2 ve kısmen de hK4 tarafından parçalanarak 237 aminoasitlik aktif PSA oluşur. proPSA'dan aktif PSA oluşurken gerçekleşen 7 aminoasitlik kısalmanın kısmi olması durumunda proPSA'nın farklı üç formu, [-2] proPSA, [-4] proPSA ve [-5] proPSA, oluşur. Bunlardan iki tanesi, [-2] proPSA ve [-4] proPSA, hK2 ve hK4'ün etkisine direnç gösterir, lümene stabil ve inaktif olarak kalırlar (Şekil 2). Aktif PSA'nın büyük kısmı seminal sıvıya salgılanır, ancak çok az bir kısmı kan dolaşımına geçerken yine az bir kısmı lümene proteoliz olarak inaktif intakt PSA (iPSA)'ya dönüşür ya da internal kırılmalar uğrayarak inaktif benign PSA (BPSA)'ya dönüşür. Lümene oluşan iPSA ve BPSA türevleri de lümeden dolaşıma geçebilirler⁴⁹⁻⁵⁴.



Şekil 2: PSA biosentezi ve alt tiplerinin oluşumu.

Dolaşıma geçen aktif PSA, α -1 antikomotripsin (antichymotrypsin; ACT), α -2 makroglobulin (A2M) ve α -1 proteaz inhibitör (API) gibi proteaz inhibitörleri ile kompleks oluşturur ve bağlı PSA (complexed PSA; cPSA) olarak isimlendirilir. cPSA serumda ölçülebilen T-PSA'nın %70-90 kadarını oluşturur. T-PSA'nın %10-30'u ise iPSA, BPSA ve özellikle malign durumlarda dolaşıma çıkan [-2] proPSA ve [-4] proPSA'lardan oluşan sPSA'dır^{50, 51}.

PSA, prostattaki kolumnar epitel hücrelerince lümene, seminal sıvıya salgılanır ve burada seminal protein semenogelin'i proteolize uğratarak semenin likefaksiyonuna neden olur. PSA'nın böylece spermatozoların hareketliliğine katkı sağladığı düşünülmektedir⁸.

Seminal sıvıda yüksek konsantrasyonda bulunan PSA serumda çok daha düşük konsantrasyonlarda bulunur ve PSA değeri yaşa, ırka ve prostat hacmine göre değişebilir. Yaşla birlikte PSA değeri artar. Bu artış BPH olmayanlarda yılda 0.04 ng/mL iken, BPH'lı hastada 0.07-0.27 ng/mL aralığında olmaktadır. Siyah ırkta beyaz ırka göre aynı yaş grubunda daha yüksek değerler görülür⁸.

PSA alt tiplerinin benign ve malign durumlarda serumda farklı oranlarda görülmesi prostat glandının bazal tabakasının kanserli olgulardaki dekstrüksiyonu ile açıklanabilir. BPH'lı olgularda, bazal hücreler ve bazal membran intakt olduğundan PSA biyosentezi ve sonraki aşamalar luminal yapı içerisinde normal döngüsünde devam edeceğinden dolaşıma geçen alt tipler aktif PSA (serumda cPSA) ve sPSA'nın benign formlarıdır (iPSA ve BPSA). Kanserli durumlarda ise bazal hücre ve bazal membran dekstrüksiyonuna bağlı olarak PSA'nın luminal yapı içerisinde döngüsü bozulup dolaşıma geçişindeki sınırlama kalkar ve serumda göreceli olarak cPSA ve sPSA'nın malign formu olan proPSA (özellikle daha stabil olan [-2] proPSA ve [-4] proPSA) artar⁵⁵.

PSA, prostat kanseri erken tanısı, tedavinin izlemi ve evrelemesinde büyük katkılar sağlamıştır. Günümüzde halen en çok kullanılan tümör belirteçidir. Prostat kanserinde salgılanan PSA miktarının, normal prostat dokusunun salgıladığının 30 katı olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bunun, kanserli hücrelerin artan proteolitik aktiviteleri ile bazal membran destrüksiyonuna bağlı olarak, PSA'nın direkt vasküler sisteme geçmesi sonucu olduğu düşünülmektedir. Benign patolojilerde de histolojik yapı bozulup kanda PSA düzeyi artabilmektedir. Prostat biyopsisi, prostat masajı ya da transüretal

girişimler PSA'nın geçici olarak yükselmesine neden olabilirken; BPH, prostatit, enfarktler, ejakülasyon, akut üriner retansiyon yanında kardiyak cerrahi, by-pass ameliyatları PSA düzeyinin arttığı benign durumlardır. PRM sonrası oluşan artış ise ihmal edilebilir düzeyde olduğundan klinik olarak anlam taşımaz. Diğer yandan, BPH tedavisinde kullanılan 5- α redüktaz inhibitörleri (finasterid, dutasterid) PSA düzeyini düşürdüklerinden tedavi öncesi düzeylerine bakılıp takip edilmelidir. Bunlar, PSA'nın düşük duyarlılık ve özgüllük problemini ortaya koymuş, tanısal test olarak değerinin sorgulanmasına yol açmıştır^{4, 8-10, 56-63}.

PSA, klinik kullanıma girdikten sonra referans aralığı 0-4 ng/mL olarak kabul edilmiştir. 4-10 ng/mL aralığı ise BPH ve kanserli olguların çakıştığı "gri zon" olarak değerlendirilmiştir. 90'lı yıllarda, gri zondaki kanserli vakaları daha iyi tanımlayabilme üzerinde durulmuş, bu nedenle PSA türevleri ve PSA'nın prostat hacmine oranlanması gibi yöntemlerle çalışmalar hız kazanmıştır. Farklı popülasyonlarda ve farklı biyopsi yöntemleri uygulanmış kişilerden elde edilen veriler olduğu için klinik uygulamalar standardize edilememiş olsa da güncel algılama, PSA'nın prostat hacminin iyi bir göstergesi olduğu ve kansere özgü olmaktan çok, organa özgü bir belirteç olduğu yönündedir. Günümüzde PSA kullanımında amaç, daha küçük ve organa sınırlı tümörleri tanımlayabilmektir⁸.

PSA duyarlılığını ve özgüllüğünü artırmak için referans değer olarak yaşa özgü PSA değerleri, PSA artış hızı, PSA dansitesi veya serumdaki PSA türevleri gibi farklı yöntemler kullanılmıştır⁸.

a) Yaşa Özgü PSA: Genç hastalarda radikal tedavi ile tam tedavi olabilecek organa sınırlı tümörleri erken evrede saptama olasılığını artırmak, yaşlı hastalarda klinik önemi olmayan kanseri gereksiz yere tedavi etmekten kaçınmak asıl amaçtır⁶⁴. Birçok çalışmada, PSA değerlerinin yaşla beraber yükseldiği gösterilmiştir (Tablo 1). Sebebinin, prostatın büyümesi ile beraber membran geçirgenliğinin artması olduğu düşünülmektedir. Yaşa özgü PSA referans değerlerinin 50-59 yaş grubunda kullanımı, yapılan biyopsi sayısını %45 oranında, prostat kanseri yakalanmasını da %15 oranında artırarak avantaj sağlasa da negatif biyopsi sayısının ve sağlık giderlerinin artması gibi dezavantajlara da sahip olduğu unutulmamalıdır. Yine yaşlı hastalarda yaşa özgü referans değerlerinin kullanımının, tam tersine gereksiz biyopsi sayısını

azaltırken erken evre kanserlerin atlanmasına neden olabileceği bilinmektedir⁸.

65

Tablo 1: Yaş ve ırkla PSA'nın ilişkisi.

Yaş (Yıl)	Yaşa Özgü PSA Aralığı (ng/mL)		
	Siyahi	Sarı	Beyaz
40-49	0-2.0	0-2.0	0-2.5
50-59	0-3.0	0-3.0	0-3.5
60-69	0-4.5	0-4.0	0-4.5
70-79	0-5.5	0-5.0	0-6.5

b) PSA Hızı (Velositesi): Birbirine ardışık yapılan yıllık PSA ölçümlerinde yılda 0.75 ng/mL'den fazla artış olan olgularda prostat kanseri riski artmaktadır. İlk olarak Carter ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada en az iki yıl içinde yapılan, en az 3 PSA ölçümüyle hesaplanan PSA hızının 0.75 ng/mL/yıl ve üzeri olduğu durumlarda, %95 özgüllük ve %72 duyarlılıkla kanseri saptadığı görülmüştür⁶⁶. PSA değeri yüksek olanlarda bu takip, tedavi için zaman kaybettiricidir. Güncel çalışmalar, PSA>4 ng/mL olan olgularda 0.75 ng/mL/yıl; PSA<4 ng/mL olanlarda ise 0.1-0.5 ng/mL/yıl PSA hızının kestirim değeri olarak kullanılması gerektiğini göstermektedir. Bazı yazarlara göre, radikal cerrahi için uygun olmayan, 70 yaşından büyük erkeklerde ve prostat kanseri teşhisi konanlarda hormon tedavisinin zamanlamasına yardım için PSA hızı takibi tercih edilmelidir. Hızlı artışların, klinik olarak anlamlı kanserle ve agresiflikle uyumlu olduğu görülmüştür. Düşük PSA değeri olan olgularda ise yeni PSA kestirim değerlerinin araştırılması gerekmektedir⁸.

PSA'nın kansere özgü olmaması, hesaplamadaki zorluklar, %25'lere varan günlük PSA seviye değişimleri ve ölçümünde farklı zamanlarda farklı yöntemler kullanılabilmesi gibi dezavantajlar PSA hızının kullanımını azaltmıştır⁶⁵.

c) PSA'nın Hacme Bağlı Türevleri: Prostat kanseri tanısında kullanılan en eski PSA türevidir. Benson ve arkadaşları tarafından 1992 yılında tanımlanmıştır⁶⁷.

BPH gibi benign durumlarda salgılanan PSA göz önüne alındığında, prostat kanseri tanısını koymak için hacmin oluşturduğu etkiyi ortadan kaldırmada kullanılmaktadır. T-PSA değeri, total bez hacmine oranlanınca PSA dansitesi (PSAD), transisyonel zon hacmine oranlanınca da transisyonel zon PSA dansitesi (TZPSAD) ortaya çıkmaktadır. TRUS ile bezin hacmi belirlenmektedir. PSAD için kestirim noktası 0.15 ng/mL/cc olarak kabul edilse de Catalonia ve arkadaşları, kestirim noktası olarak bu değer alındığında yaklaşık %50 olguda kanser tanısının atlanabileceğini bildirmişlerdir⁶⁸. Djavan ve arkadaşlarının çalışmasında ise, ilk prostat biyopsisi negatif olup yüksek PSA nedeniyle yapılacak ikinci biyopsi için PSAD 0.1 ng/mL/cc olarak alınırsa %90 duyarlılıkla, gereksiz olacak ikinci biyopsiyi %31 oranında önlediği görülmüştür⁶⁹. TZPSAD değeri 0.35 ng/mL/cc üzerindeki olgularda prostat kanseri riski daha yüksek bulunmuştur. PSA değeri 4-10 ng/mL olan hasta grubunda TZPSAD'nin prostat kanseri tespitine yardımcı olabileceği görülmüştür⁷⁰.

PSAD ve TZPSAD'nin kanser taramasında, serum T-PSA'dan daha yüksek özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak, prostat hacmini doğru hesaplamak amacıyla invaziv ve pahalı bir işlem olan TRUS gerekmektedir. Ayrıca prostat boyutu, şekli ve epitelyal stroma oranındaki olguya özgü değişikliklerin fark edilmesiyle birlikte bu PSA türevlerinin kullanımı kısıtlanmıştır^{8, 65, 71}.

d) PSA'nın Serum Dağılımına Bağlı Türevleri (Serbest PSA, Bağlı PSA)

Serbest PSA: Serumdaki T-PSA'nın %10-30 kadarı iPSA, BPSA ve proPSA'dan oluşan sPSA'dır. Prostat hastalıklarının benign-malign ayırımında günümüzde en çok kullanılan PSA türevi s/T PSA oranıdır ve bu oranın azalması malign hastalık lehine yorumlanmaktadır. Prostat kanserli olgularda, kanserli hücreler daha fazla oranda ACT salgılayıp PSA'nın daha yüksek oranlarda bağlı olmasına neden olduğundan, sPSA'nın daha düşük olduğu düşünülmektedir^{65, 8}.

s/T PSA oranı, T-PSA 2.6-10 ng/mL arasında olan hastalar ve ilk biyopsi sonucu negatif olanlarda re-biyopsi kararı alınmasında da kullanılabilir. Klinisyenin prostat kanseri tanısında, duyarlılık veya özgüllük konusunda

tercihine göre %14-25 arası eşik değerler kullanılmaktadır. Çalışmalarda, T-PSA değeri 4-10 ng/mL aralığında iken, s/T PSA için %25'lik kestirim değeri alındığında kanserli olguların %95'inin tespit edildiği, %20 kadar gereksiz biyopsinin de engellendiği görülmüştür^{65, 72, 8}.

Bununla beraber, yapılan çalışmalar malign prostat hastalıklarında benign hastalara kıyasla s/T PSA oranının azalmasının yanı sıra sPSA'yı oluşturan PSA türevleri içerisinde proPSA fraksiyonunun arttığını ve proPSA/sPSA (%proPSA) oranının da tarama amacıyla kullanılabileceğini göstermiştir^{73, 54}.

Kompleks (Bağlı) PSA: Bunlar; α -1 Antikimotripsin Bağlı PSA, α -2 Makroglobulin Bağlı PSA ve α -1 Proteaz İnhibitör Bağlı PSA'dır.

α -1 Antikimotripsin Bağlı PSA (ACT-PSA): PSA'nın önemli bir kısmı serumda ACT'ye bağlı olarak bulunur ve kompleks PSA olarak adlandırılır. Kanserli olgularda daha fazla ACT salgılandığını ve T-PSA değerleri 4-20 ng/mL arası olan hastalarda kanser tanısı koymada cPSA'nın tanısal performansının T-PSA'dan daha iyi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. cPSA düzeylerinin günlük değişimlerden ve prostatın manipülasyonlarından daha az etkilenmesi gibi avantajları yanında henüz referans değerlerinin tam olarak belirlenememiş olması nedeniyle rutinde kullanılamamaktadır^{8, 74-78}.

α -2 Makroglobulin Bağlı PSA (A2M-PSA): A2M, PSA'yı tamamen sararak tüm epitoplarını bloke eder ve konvansiyonel yöntemler kullanılarak ölçülemez. Son zamanlarda A2M denatürasyonu gerektiren yeni yöntemlerle düzeyi ölçülebilmektedir⁸.

α -1 Proteaz İnhibitör Bağlı PSA (API-PSA): Yakın zamanda, sPSA ve ACT-PSA ile çapraz reaksiyon vermeyen ve sadece API-PSA'yı ölçen yöntemler geliştirilmiştir. Serumda çok az düzeylerde bulunan API-PSA'nın prostat kanserlilerde düştüğü son çalışmalarda gösterilmiş ve API-PSA'nın gelecekte diğer PSA türevlerine yardımcı bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür⁸.

PSA ve türevlerinin klinik kullanıma girmesiyle, erken dönemde kanser tanısı koymak mümkün olduğu için, lokalize prostat kanseri insidansı giderek artmıştır. Diğer yandan, özellikle BPH-prostat kanserli olguların çakıştığı ve gri zon olarak adlandırılan PSA'nın 2-10 ng/mL olduğu değerlerde, biyopsi yapılması, sonrasında tedavi uygulanması yük oluşturmaktadır. Bu nedenle, prostat kanseri erken tanısında, girişimsel işlem yapılmadan elde edilebilecek, duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

f. Moleküler Tanı: Prostat kanseri tanısında P53, retinoblastom geni, onkogenler (c-myc, ras, cerb B-2), büyüme faktörleri ve sitokinler (transforming growth faktör- α ve β) gibi onkogenez ile ilişkili parametreler moleküler yöntemlerle çalışılmış ancak bu çalışmalar yaygın klinik kullanım alanı bulamamıştır. Son yıllarda keşfedilen bir diğer molekül ise miRNA'lardır. Hedef mRNA'ları ile etkileşerek hücre döngüsünün düzenlenmesinde etkili olan miRNA'ların bazılarının kanserle ilişkili gen bölgelerinde bulunduğu anlaşılması sonrası, farklı kanser türlerinde çalışmalar yapılmıştır. Ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelendiğinde çoğu kanser türünün oluşumu ve ilerlemesi ile yakından ilişkili moleküller oldukları belirlenmiştir^{4, 79-83}.

mikroRNA

Genomun sadece %2'den az kısmının proteine çevrildiği ve transkribe olan ribonükleik asitlerin (RNA) ise en azından yarısının proteine translasyonunun olmadığı bilinmektedir. Klasik olarak bilinen mRNA, taşıyıcı RNA (tRNA), ribozomal RNA (rRNA) moleküllerinin dışında son yıllarda özellikle birçok biyolojik süreçte etkili miRNA, küçük interfere edici RNA (small interfering RNA; siRNA) ve piwi-etkileşimli RNA (piwi-interacting RNA; piRNA) gibi farklı RNA molekülleri keşfedilmiştir^{84, 85}.

a. mikroRNA'nın Keşfi

Napoli ve Stuitje'nin, genetik transformasyon çalışmalarında, petunya üzerindeki araştırmalar esnasında fark ettikleri, ancak yıllar sonra Jorgensen ve arkadaşlarının tanımladıkları "gen sessizleştirilmesi" miRNA keşfi esnasında

atılan en önemli adımlardandır. Çalışmalar sırasında, aktarılan transgenin sadece kendi kendisini değil, aynı zamanda endojenik genin ekspresyonunu da etkilediği görülmüş ve hem endojenik hem de transgenik mRNA'nın kaybını tanımlamak için *co-supresyon* terimi kullanılmıştır⁸⁶⁻⁸⁹.

İlk olarak Ambros ve arkadaşları tarafından, 1993 yılında, bir nematod olan *Ceanorhabditis elegans*'in genetik çalışması esnasında, lin-4 adı verilen ve proteine çevrilmeyen, 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA bulunmuş, ancak isimlendirilmemiştir. Sonrasında, 1998 yılında Craig C. Mello ve Andrew Z. Fire, *C. elegans*'ta çift zincirli RNA'nın (double-stranded RNA; dsRNA), gen ekspresyonunu spesifik ve selektif olarak inhibe ettiğini ilk defa deneysel olarak göstermişlerdir. Buna göre; bir hedef genin transkriptinin, sekans spesifik (diziye özgü) bir ilişki temelinde, dsRNA ile durdurulması olayı, RNA interferansı (RNAi) olarak tanımlanmıştır. RNAi, istenmeyen yabancı genlerin (eksternal RNA'lar ve viral genler, transpozonlar gibi moleküler parazitler) ortadan kaldırılması ve aynı zamanda gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel regülasyonunda hücrede kullanılan bir mekanizmadır^{12, 90-92}.

b. Tanım

miRNA'lar; 21-23 nükleotid uzunluğunda, endojen, proteine yazılımı olmayan tek zincirli RNA'lardır. mRNA'da 3' ucu yazılıma uğramayan bölgeye (3'-untranslated region; 3'-UTR) bağlanarak mRNA'nın yıkımını tetikler veya translasyonunu baskılayarak gen ekspresyonunu düzenleyici rol oynarlar¹¹⁻¹³. Günümüze kadar 1000'den fazla miRNA tanımlanmıştır. (1600 prekürsör, 2042 matür miRNA) (www.miRBase.org Erişim tarihi:11.05.2013)

c. mikroRNA'lar Nerede Kodlanır:

miRNA'ların büyük çoğunluğu (%61) protein kodlayan genlerin intronlarında, daha az bir kısmı ise genlerin eksonlarında veya intergenik bölgelerde bulunmaktadır^{14, 93}.

Protein kodlanan genlerin intron ve eksonlarında yerleşik miRNA genleri, aynı promotor aracılığıyla prekürsör mRNA (pre-mRNA) ile birlikte transkribe olmaktadır. mRNA ile korele dokuya özgü miRNA ekspresyon profilinin görülmesi, bu miRNA'ların pre-mRNA ile birlikte transkribe olmasından

kaynaklanmaktadır⁹⁴⁻⁹⁶. İntergenik bölgelerde yerleşik miRNA genlerinin transkripsiyonu ise kendi promotorları tarafından düzenlenir^{95, 97, 98}.

miRNA genlerinin %50'sinden fazlası kanser ile ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde veya metafaz esnasında replikasyon stresinin neden olduğu, kromozomda boşluk ya da kırıkların görüldüğü spesifik genomik bölgeler olarak tanımlanan kırılgen bölgelerde bulunur. Bu durum miRNA'ların neoplazi patogeneğinde önemli rolleri olduğuna işaret etmektedir¹⁴.

d. mikroRNA Biyogenezi:

Hücre döngüsü ve büyüme üzerinde düzenleyici etkileri olan küçük, protein kodlamayan RNA türü olan miRNA'ların RNA polimeraz II (pol II) tarafından sentezlenmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar ile birçok farklı miRNA lokusunda RNA polimeraz III (pol III) ile ilişkili tekrar dizilerinin gösterilmesi pol III'ün de miRNA transkripsiyonunda önemli olduğunu düşündürmüştür⁹⁹⁻¹¹⁰.

miRNA'lar, intergenik bölgelerde bulunan miRNA genlerinden, pol II veya pol III tarafından iki ucunda tek zincirli RNA uzantıları olan büyük bir sap-ilmik yapısında primer miRNA (pri-miRNA) olarak transkribe edilir^{108, 111, 112}. Bunun aksine, bir protein kodlayan genin intronu içinde yer alan miRNA geni ise pre-miRNA'nın bir parçası olarak pol II tarafından transkribe edilmektedir. Ancak sonraki aşamanın prekürsör miRNA'ya (pre-miRNA) mı pri-miRNA'ya mı çevrilerek devam edeceği net değildir. Pre-miRNA haline gelince olgunlaşma için nükleustan Eksportin-5 ile sitoplazmaya geçişi olmaktadır⁹⁵.

1 kilobazdan daha büyük transkriptler halinde sentezlenip 7-metil guanilat kep ve poli A kuyruğu eklenen pri-miRNA'lar, saç tokası (hairpin) şeklinde ikincil yapılar ve en son ~22 nükleotidlik olgun miRNA verecek şekilde işlenirler^{111, 113}.

Pri-miRNA transkriptleri, olgun ve işlevsel miRNA haline iki adımlı bir süreçten geçerek ulaşırlar (Şekil 3).

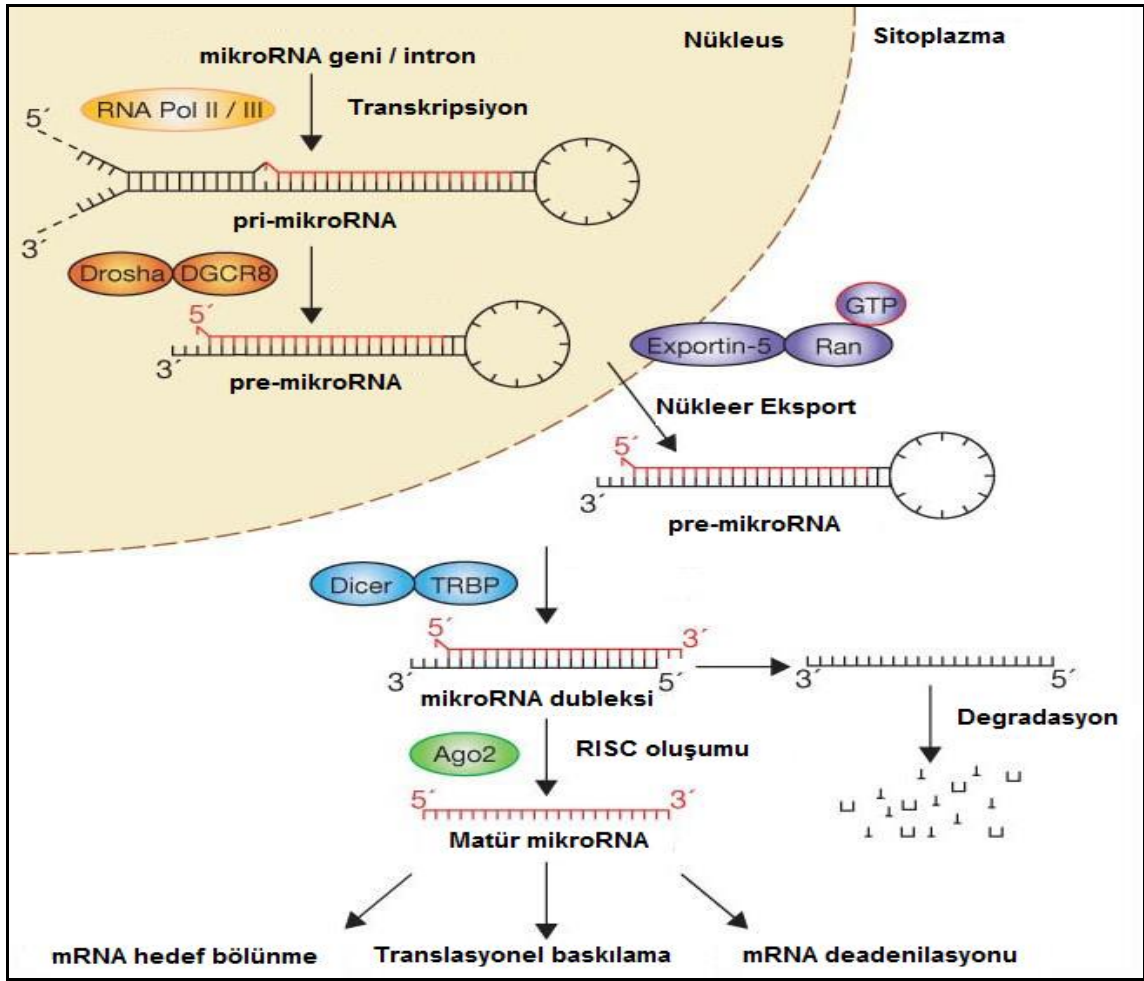
İlk adım nükleusta, bir ribonükleaz III (RNaz III) endonükleaz olan Drosha ve bir çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein (double-stranded RNA binding protein; dsRBP) olan *Di George syndrome critical region gene 8*'den (DGCR8) oluşan Mikroişlemci kompleks tarafından gerçekleştirilir. Bu kompleks, saç tokası şeklindeki pri-miRNA'yı kök kısmından asimetrik keserek 60-70 nükleotidlik, 5'

ucunda fosfat ve 3' ucunda 2 nükleotidlik çıkıntısı olan sap-ilmik formunda pre-miRNA oluşturmaktadır. Oluşan pre-miRNA'lar Guanozin trifosfat (Guanosine triphosphate; GTP) bağımlı Eksportin-5 aracılığı ile sitoplazmaya geçer^{94, 114, 115}.

Nükleusta bulunan bu mikroişlemci komplekse benzer yapıda bir başka kompleks ise bir RNaz III endonükleaz olan Dicer ve çift zincirli RNA bağlayıcı bölge (double stranded RNA binding domain; dsRBD) olan TAR-RNA bağlayıcı protein (TRBP)'den oluşur ve sitoplazmada görev alır. Bu kompleks çift zincirli pre-miRNA'yı substratın sonundan ~22 nükleotid olacak şekilde keserek iki ayrı dizi haline getirir. Birinci dizi olgun miRNA olacak diziyken diğeri pre-miRNA'nın eşlenik kolundan türeyen dizidir (miRNA*)¹¹⁶.

miRNA* ipliği genellikle degrade olurken bazı dokularda ve özel hücrel koşullarda fonksiyonel miRNA* dizilerinin gösterildiği yayınlar da bulunmaktadır.

Olgun miRNA haline dönüşecek dizi ise RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) olarak adlandırılan bir efektör kompleksine eklenir. Bu kompleks temel bileşeni *Argonaute* (Ago) proteini olan nükleaz aktiviteli bir RNA-multiprotein kompleksidir^{94, 116-124}.



Şekil 3: mikroRNA biyogenezisi.

e. mikroRNA'nın Görevleri

miRNA molekülü, RISC-miRNA kompleksini hedef mRNA'ya yönlendirir. Olgun miRNA'nın 5' ucunda 2. ile 8. nükleotidler arasında tohum (seed region) olarak isimlendirilen bölge ile hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesi etkileşirse tam uyum olurken diğer durumlarda kusurlu baz eşleşmesinin olduğu görülmüştür. miRNA-mRNA arasındaki uyumun seviyesi miRNA'nın hedefini hangi seviyede ve nasıl baskılayacağını belirler. miRNA'ların hedef mRNA üzerinde bağlanma bölgeleri genellikle 3'-UTR'dedir ancak 5'-UTR'yi veya açık okuma çerçevesini (open reading frame; ORF) hedefledikleri durumlarda da gen ekspresyonunu baskıladıkları görülmüştür¹²⁵⁻¹²⁸.

Uyum çok yüksek seviyede ise RISC, hedef mRNA'ları degrade eder. Poli A kuyruğu ve 5' kep yapılarının yok edilmesi sonucu kararlılığı azalan

mRNA'lar hücrel enzimler tarafından parçalanır. Uyum daha az ise, hedef mRNA'dan protein oluşumu baskılanır. Bu olayın mekanizması tam olarak belirlenememiş olsa da hedef genin mRNA seviyesi artarken, protein seviyesinin değişmediği, dolayısıyla da baskılamanın translasyonel seviyede gerçekleştiği gösterilmiştir. miRNA-RISC kompleksinin çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek protein translasyonunun başlangıç ve uzama aşamalarını engelliyor olması muhtemel gözükmektedir¹²⁵⁻¹³⁸.

miRNA'lar, yaklaşık 200 hedef mRNA'yı kısmi baz eşleşmesi ile düzenleyebilmektedir. Bunu, az sayıdaki miRNA'nın mRNA'ların farklı sayıda ve tipteki 3'-UTR'sine bağlanma farklılıkları ile sağlamaktadır. miRNA'lar bu şekilde, çok sayıdaki biyolojik ve patolojik sinyal yollarını, hedef mRNA fonksiyonları ve ekspresyonlarını etkileyerek düzenlemektedir¹³⁹⁻¹⁴⁴.

miRNA'lar hücre fonksiyonu ve bütünlüğünü sağlamak için kilit düzenleyici küçük moleküller olarak kabul edilmektedir. Önemli hücre kararlarını düzenleyerek, apoptozis ile organogenez ve gelişmedeki hücre sinyalizasyonu arasında değişen biyolojik süreçlerden sorumlu tutulmaktadır. Tek bir miRNA'nın temel hücrel mekanizmalardaki birçok geni düzenlediği göz önüne alındığında, miRNA'ların doğru bir hücre fonksiyonu için önemli olduğu görülmektedir. miRNA ekspresyonundaki değişiklikler kanserin hemen hemen tüm türleri de dahil olmak üzere bir çok ciddi hastalığa yol açabilmektedir. Ayrıca, miRNA ekspresyon profilleri hastalık durumu ile koreledir, bunun sonucu olarak tanı ve sonraki aşamalar için yeni biyolojik belirteç olarak kullanılabilceği yönünde çalışmalara yön verilmiştir^{145, 146}.

miRNA'ların genetik nedenli ekspresyon değişikliklerine genellikle delesyonlar, amplifikasyonlar veya translokasyonlar gibi büyük ölçekli genom değişiklikleri sebep olmaktadır. miRNA kodlayan dizideki delesyonlar o miRNA ekspresyonunun azalmasına, bunun sonucunda hedefi olan mRNA'nın baskılamadan kurtulmasına, dolayısıyla da mRNA'dan kodlanan proteinin artmasına sebep olur. Amplifikasyonlar ise miRNA miktarını artırırken hedef mRNA'nın etkinliğini ve ürünü olan proteini azaltır. Translokasyonlarda, yer değiştiren deoksiribonükleik asit (DNA) parçasının yerleşme yerine göre artırıcı veya azaltıcı yönde etkisi olabilir. Bunlar dışında; miRNA'yı ya da hedefi olan mRNA'yı kodlayan genlerdeki nokta mutasyonuna bağlı oluşan dizi

değişiklikleri, miRNA-mRNA uyumunu değiştirerek artırıcı veya azaltıcı etki yapabilir. Ayrıca, epigenetik değişiklikler ve miRNA'nın kodlandığı genin promotor etkinliğindeki değişiklikler de miRNA'nın ekspresyon düzeyini etkileyebilmektedir¹⁴⁷⁻¹⁵¹.

Kanser ve mikroRNA:

Kanser genetik değişikliklerin yaşandığı bir hastalıktır. Normal hücrelerin pre-malign lezyondan metastatik kansere kadar farklılaşabildiği, çok aşamalı bir süreçtir¹⁵².

Bazı miRNA'ların hedef mRNA'larla etkileşerek hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozu düzenlediğinin belirlenmesi ve bazılarının kanserle ilişkili gen bölgelerinde bulunduğu anlaşılmasından sonra kanser gelişimi ile miRNA'ların değişen ekspresyonlarının bağlantılı olabileceği fikri doğmuştur. miRNA genlerinin %50'sinden fazlası frajil alanlar ve kanser ile ilişkili genomik bölgelerde, çoğunluğu kümeler halinde bulunmaktadır. Farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalarda, miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin normal ve patolojik dokular arasında farklılık gösterdiği, çoğu insan kanseri türünün oluşumu ve ilerlemesi ile miRNA'ların yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Normal ve patolojik dokular arasında miRNA profili farklılıkları tespit edilerek, insan kanserlerinde etkili olan miRNA'lar ve patolojik rolleri belirlenebilmektedir^{14, 79-83, 153, 154}.

Tümörlerde ekspresyonları artan miRNA'lar onkogenler olarak sınıflandırılabilir ve 'onkomir' olarak adlandırılır. Tümör dokularında normal dokulara göre daha fazla eksprese olur ve tümör baskılayıcı genleri, hücre farklılaşmasını ve apoptozu kontrol eden gen ürünlerini hedef alarak onkojenik işlev gösterirler. Onkogen olarak çalıştığı belirlenmiş miR-17-92 grubuna dahil olan miRNA'ların lenfogenezi hızlandırdıkları, miR-155 grubuna dâhil olan miRNA'ların ise enflamasyonun düzenlenmesi ve immün cevap oluşumunda önemli rolleri olduğu tespit edilmiş, lösemiye tetikledikleri gösterilmiştir¹⁵⁵⁻¹⁵⁹. miR-21'in ise çeşitli neoplazmlarda PTEN1 ve PDCD4 gibi önemli tümör baskılayıcı gen ürünlerini hedef aldığı belirlenmiştir¹⁶⁰⁻¹⁶².

Tümör baskılayıcı olarak adlandırılan miRNA'lar ise, onkogenleri engelleyerek ve farklılaşmayı sağlayan genlerin aktivitesini artırıp tümör oluşumunu önlerler. Bu grubun, kanserli hücrelerde ekspresyonlarının azaldığı görülmüştür. İlk keşfedilen miRNA olan let-7, aynı zamanda tümör baskılayıcı olduğu belirlenen ilk miRNA'lardandır. let-7'nin kanserlerde genellikle delesyona uğrayan bir kromozomal bölgede bulunması ve gen ifadesinin azalmasının onkojenik farklılaşmayı etkilediğinin belirlenmesi sonucu tümör baskılayıcı bir miRNA olarak kabul edilmesine sebep olmuştur. Akciğer kanserinde azaldığının gösterilmesi de bunu doğrulamaktadır. Tümör baskılayıcı miRNA'lardan miR-15a ve miR-16-1 ekspresyon seviyelerinin kronik lenfositik lösemi hastalarında azaldığının gösterilmesi, miRNA ve kanserin bağlantılı olduğu yönündeki ilk kanıtlardandır. miRNA ekspresyon profillemesi çalışmasında, normal ve neoplastik meme dokusu arasında bazı miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde azalma gözlenmiştir^{154, 163-166}.

Normal ve malign dokularda miRNA'ların ekspresyon profillerinde farklılık görülmesi, miRNA'ların tümör tanı, prognoz ve evrelemesi ile ilişkili belirteç olarak tanımlanması yönündeki çalışmalara neden olmuştur. Bazı kanser türleriyle ilişkili olan miRNA'ların ekspresyon profillemesi ile tümörün diferansiasyon aşaması, köken aldığı doku tanımlanabilmekte ve bu yolla tümörün sınıflandırılması yapılabilmektedir. Özellikle erken tanı açısından potansiyel araçlar olabileceği üzerinde durulan çalışmalar göze çarpmaktadır^{15-17, 83, 167-171}.

Prostat Kanseri ve mikroRNA

Birçok kanserde miRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığı gibi, prostat kanserinde de miRNA ekspresyonunu araştıran çalışmalar olmuştur. Bu çalışmalarda, prostat kanserinde gelişim, invazyon ve metastaz esnasında bazı miRNA'ların anormal eksprese olduğu ve değişmiş ekspresyonlarının tanı, prognoz ve kanserin sınıflandırmasında biyobelirteç olarak yararlı olabileceği gösterilmiştir²⁴⁻²⁶.

miRNA-prostat kanseri ilişkisini araştıran çalışmalarda ilk olarak cerrahi sonrası elde edilen kanserli prostat dokuları ile normal dokuların miRNA

ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. miRNA'ların küçük moleküler yapıları ve RISC'e bağlanmaları sayesinde korunarak dolaşıma çıkıp stabil kalabildikleri keşfedildikten sonra dolaşımdaki miRNA ekspresyon düzeylerini araştıran çalışmalar artmıştır^{23, 25, 26, 172-176}.

Yine miRNA-prostat kanseri ilişkisini araştıran çalışmalarda BPH'lı olgular ile prostat kanserli olgular, organa sınırlı prostat kanserli hastalar ile perinöral invazyonlu olgular, BPH'lı olgular ile hormona dirençli prostat kanserli olgular, sağlıklı olgular ile prostat kanserli farklı evrelerdeki olgular gibi çok farklı çalışma gruplarında miRNA ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır^{25, 26, 172, 174, 175}.

Bu çalışmalarda çok farklı sayılardan oluşan çalışma gruplarına rastlanmasına rağmen serum ve plazmada miRNA ekspresyon profillerinin çalışılabilmesi ile çalışma gruplarının daha da genişlemesi mümkün olmuştur. Bununla birlikte bu profillemeye çalışmaları ekspresyonuna bakılabilen miRNA sayısı ve çalışma grubunun genişliği, kullanılan yöntemin kolay uygulanabilirlik düzeyi ile ilişkili olarak farklılık göstermektedir. Tüm bu çalışmalarda çeşitli prostat kanserli gruplarda ekspresyonu artan veya azalan birçok miRNA gösterilmesine rağmen çalışmalar arasında ekspresyon profilleri açısından çelişkili sonuçlar da bulunmaktadır^{23, 25, 26, 142, 172-177}.

Biz bu çalışmamızda daha önceki araştırmalarda ekspresyon değişimleri açısından ortak fikir oluşturmuş 59 farklı miRNA'yı hedefledik. Bunlardan let-7a-3p, let-7a-5p, let-7b-3p, let-7b-5p, let-7c, miR-15a-3p, miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-16-1-3p, miR-17-5p, miR-23a-3p, miR-23b-3p, miR-23b-5p, miR-100-3p, miR-100-5p, miR-125a-3p, miR-125a-5p, miR-125b-5p, miR-125b-2-3p, miR-125b-1-3p, miR-143-3p, miR-143-5p, miR-145-3p, miR-145-5p, miR-146a-3p, miR-146a-5p, miR-146b-3p, miR-146b-5p, miR-203a, miR-449a, miR-449b-5p tümör süpresör etkili miRNA'lar arasında sayılırken; miR-21-3p, miR-21-5p, miR-22-3p, miR-22-5p, miR-25-3p, miR-25-5p, miR-26a-1-3p, miR-26a-2-3p, miR-32-3p, miR-32-5p, miR-93-3p, miR-93-5p, miR-135b-3p, miR-135b-5p, miR-141-3p, miR-141-5p, miR-181a-5p, miR-181a-2-3p, miR-181c-3p, miR-181c-5p, miR-194-3p, miR-194-5p, miR-196a-3p, miR-198, miR-205-5p, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-370 ise onkomir etkili miRNA'lar arasında gösterilmektedir^{26, 168, 173, 176, 178-200}.

Çalışmamızı, invaziv elde edilmeleri gereken ve daha zor çalışma basamakları olan doku örnekleri yerine ek invaziv girişim gerektirmeden sadece PSA analizi için alınan kan örneklerinden elde edilen plazma örneklerinden yaptık. miRNA ekspresyonlarını, birçok farklı miRNA ekspresyonunu birçok örnekte aynı döngü içinde çalışma imkanı veren BioMark cihazında kantitatif ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; qRT-PCR) yöntemi ile çalıştık.

Çalışmamızda biyopsi raporları sonuçlarına göre benign prostat hastalığı ve prostat kanseri olduğu gösterilmiş gruplar arasında bu 59 farklı miRNA'nın ekspresyon profillerini karşılaştırmayı, bu grupların ayırımının zor olduğu PSA'nın 2-10 ng/mL olarak bulunduğu "gri zon"da tanıya yardımcı olabilecek ve tümör belirteci olarak kullanabileceklerimizi bulmayı amaçladık. Çalışmamızda gri zondaki PSA değerlerine sahip benign prostat hastalığı olan ve prostat kanserli hastaların ayırımında T PSA, s/T PSA oranı, miRNA ekspresyon düzeylerinin her birinin ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında tanısal güçlerini analiz etmeyi, invaziv girişim olmadan prostat kanseri erken tanısında kullanılabilirlik özgüllük ve duyarlılığı daha yüksek bir biyobelirteç kombinasyonu oluşturmayı planladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma Grubu ve Örnek Alımı: Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran, prostat biyopsisi yapılmış hastalardan PSA değeri 2-10 ng/mL aralığında olan patoloji sonucu benign (atrofi, akut-kronik inflamasyon, bazal hücre hiperplazisi, nodüler hiperplazi, benign prostat dokusu) olarak değerlendirilen yaşları 47 ve 83 arasında değişen 44 hasta kontrol grubunu, patoloji sonucu malign olarak değerlendirilen yaşları 48 ve 82 arasında değişen 37 prostat kanserli hasta hasta-1 grubunu, ayrıca PSA değeri >10 ng/mL olan ve biyopsi sonucu malign olarak değerlendirilen yaşları 53 ve 81 arasında değişen 13 prostat kanserli hasta ise hasta-2 grubunu oluşturacak şekilde çalışmaya dahil edildi.

18 yaş altı olan, kronik sistemik hastalığı bulunan ve başka bir kanser tanısı almış olan hastalar ise çalışmadan dışlandı.

Çalışma Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulun 22.12.2011 tarihli ve 2011/119 sayılı kararınca onaylandı ve çalışmaya katılan tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirilerek yazılı onamları alındı.

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol gruplarına ait yaş, boy, kilo, sigara ve alkol kullanımı, ek bir kronik hastalık varlığı, aile öyküsü ve ilaç kullanımı ile ilgili bilgiler kaydedildi.

Kontrol ve hasta grubundaki hastaların biyokimya tüplerine alınan tam kanları 4000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilerek serumları elde edildi. Advia Centaur XP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown, NY, 10591-5097, USA) hormon otoanalizöründe direkt kemiluminometrik sandviç immunoassay yöntemi ile serum sPSA ve T-PSA düzeyleri ölçüldü. miRNA analizi için ise EDTA'lı tüplere tam kan örnekleri alındı.

İşlemlerde Ortak Kullanılan Sarf Malzemeler:

Pipet ucu 1-10 µL (Katalog No: DFL10, Gilson)

Pipet ucu 2-30 µL (Katalog No: DF30, Gilson)

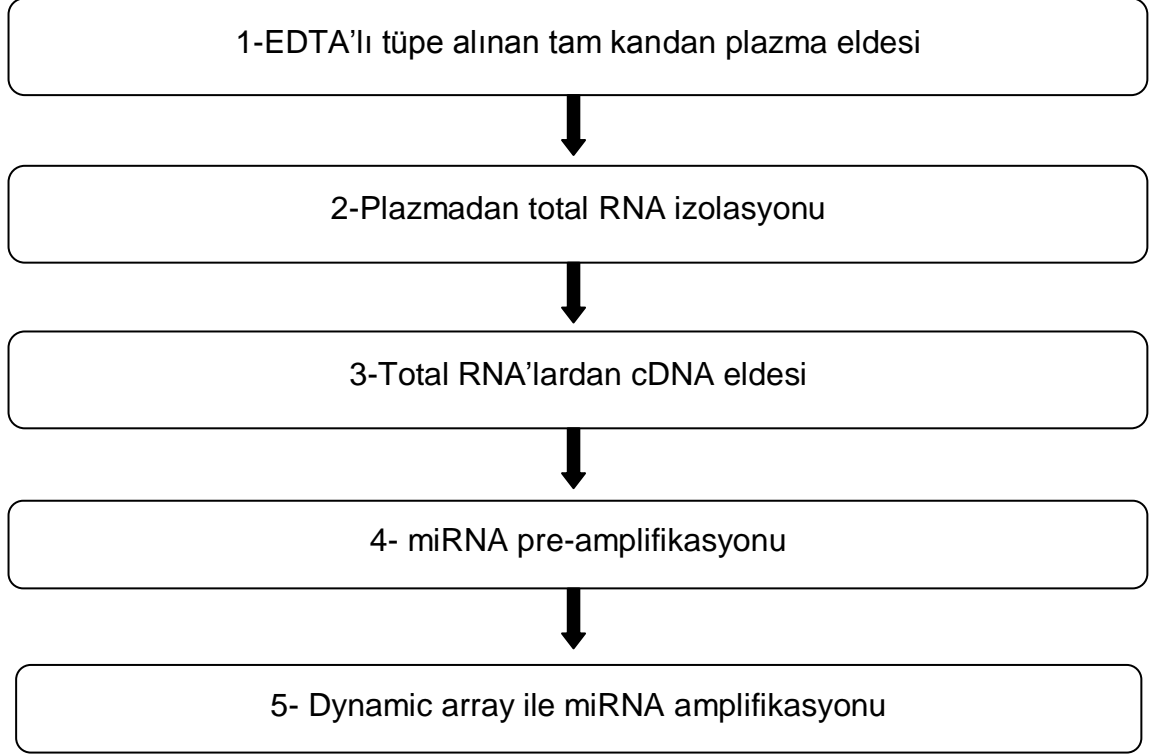
Pipet ucu 10-100 µL (Katalog No: DF100, Gilson)

Pipet ucu 20-200 µL (Katalog No: DF200, Gilson)
Pipet ucu 100-1000 µL (Katalog No: DF1000, Gilson)
0.2 mL Thermo-Strip (8'li strip tüp, Thermo Scientific, UK)
2 mL'lik mikrosantrifüj tüpü (DNaz, RNazsız)
96 Well PCR Plate (Katalog No: 1402-9400, USA Scientific)
PCR Plate Film (Katalog No: 2921-7800, USA Scientific)

İşlemlerde Ortak Kullanılan Cihazlar:

8 kanallı pipet 1-20 µL (Gilson)
8 kanallı pipet 20-200 µL (Gilson)
Pipet 2-20 µL (Gilson)
Pipet 10-100 µL (Gilson)
Pipet 20-200 µL (Gilson)
Pipet 100-1000 µL (Gilson)
Santrifüj (Nüve NF 800, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat Ve Ticaret AŞ, Ankara, Türkiye)
Santrifüj (Sigma 1-15 Microfuge, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Postfach 1713, Germany)
Santrifüj (Sigma 1-14 Microfuge, SN: 141318, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Postfach 1713, Germany)
Derin dondurucu (-80 °C, Lab -85 °C, Elcold)
Derin dondurucu (-20 °C, Uğur Soğutma Makinaları San. Ve Tic. A.Ş.)
Buzdolabı (+ 4 °C, Electrolux)
Plate Karıştırıcısı (PKT Smart Mixer, Multi Shaker, JSH-03, SN: JMC-JSH03-1005, PhileKorea, Korea)
Plate santrifüjü (PKT Mini Multi-well plate centrifuge, JCW48, SN: PKT-JCW48-1057, PhileKorea, Korea)
Termal cycler (Gene-Pro Thermal Cycler, B384G, SN: BYQ606002E-060, Korea)

Her bir hastadan alınan örneklerle şu basamaklardan oluşan işlemler sonunda 59 farklı miRNA'nın ekspresyon analizi yapıldı:



1-EDTA'lı Tüpe Alınan Tam Kandan Plazma Eldesi

Kullanılan Sarflar:

1- 5 mililitrelik (mL) %7.5 EDTA'lı tüp (BD, Vacutainer, İngiltere)

Plazma eldesi:

1. Hasta ve kontrol gruplarından kan örnekleri 5 mL'lik %7.5 etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere alındı. Oda sıcaklığında 2 saat içinde plazmaları ayrıldı.
2. Tüpler 4000 devirde (Revolution per minute; rpm) 15 dakika santrifüj edildi.
3. Sarsılmadan dikkatlice plazmanın en üst kısmından 200 mikrolitrelik (μL) pipetlerle 5 kez toplam 1000 μL olacak şekilde temiz bir DNaz, RNazsız mikrosantrifüj tüpü içerisine toplandı.
4. Bu örnek 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve plazmanın en üst kısmından 200 μL 'lik kısım DNaz, RNazsız filtreli pipet uçları kullanılarak, alttaki hücresel kısım rahatsız edilmeden temiz bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu, başka temiz bir mikrosantrifüj tüpü için işlem tekrarlandı (200 μL 'lik 2 örnek).
5. Mikrosantrifüj tüpleri hastaya ait bilgileri içerecek şekilde etiketlendi.

Bu şekilde ayrılan plazma örnekleri -80°C 'lik derin dondurucuda saklandı.

2-Plazmadan Total RNA İzolasyonu

Kullanılan Sarflar:

- 1- High Pure miRNA Isolation Kit (Katalog no:05 080 576 001, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).
 - İçeriği; *Binding Buffer* (80 mL), *Binding Enhancer* (20 mL), *Wash Buffer* (2x10 mL; her iki yıkama tamponuna 40 mL etanol eklenir), *Elution Buffer* (30 mL), High Pure Filter Tüp (2x50), toplama tüpleri (2x50).

Total RNA İzolasyonu:

1. Plazma örnekleri en az 5 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve 150 µL'lik kısım temiz mikrosantrifüj tüpüne alındı.
2. Örneklerin üzerine 312 µL *Binding Buffer* ve 200 µL *Binding Enhancer* eklendi ve karıştırıldı.
3. Karıştırılan örnekler filtreli tüp+toplama kabına aktarıldı. 13000 rpm'de 1 dakika sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.
4. Temiz toplama kaplarına alınan filtreli tüplere 500 µL *Wash Buffer* eklendi. 13000 rpm'de 30 saniye sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.
5. Temiz toplama kaplarına alınan filtreli tüplere 300 µL *Wash Buffer* eklendi. 13000 rpm'de önce 30 saniye, sonra 1 dakika sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.
6. Filtreli tüpler temiz mikrosantrifüj tüplerine alındı ve 50 µL *Elution Buffer* eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilen örnekler 13000 rpm'de 1 dakika sanrifüj edildi.
7. Elde edilen total RNA 96'lık plate'e dağıtılarak plate filmi ile sıkıca kapatıldı, -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3-Total RNA'lardan cDNA Eldesi

Komplementer DNA (cDNA) Eldesi İçin Kullanılan Sarflar:

- 1- MegaPlex RT Primers Human, Pool A v2.1 (PN 4444750, 4366596, Applied Biosystems)
- 2- MegaPlex RT Primers Human Pool B v3.0 (PN 4444750, 4366596, Applied Biosystems)
- 3- MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μ L) (PN 4444750, 4366596, Applied Biosystems)
- 4- dNTP Mix with dTTP (100 mM) (PN 4444750, 4366596, Applied Biosystems)
- 5- 10x RT Buffer (PN 4444750, 4366596, Applied Biosystems)
- 6- RNaz İnhibitör (20 U/ μ L) (PN 4444750, 4366596, Applied Biosystems)
- 7- DNaz, RNazsız su (PN 4444750, 4366596, Applied Biosystems)
- 8- MgCl₂ (25 mM) (PN 4444750, 4366596, Applied Biosystems)

cDNA Protokolü:

1. RNA örnekleri -80°C'den çıkarılıp erimeye bırakıldı.
2. Çözülen örnekler 30 saniye santrifüj edildi ve Tablo 2'deki cDNA için reaktif karışımı hazırlanana dek soğuk blok üzerinde bekletildi.

Tablo 2: cDNA için reaktif karışımı hazırlanması.

MegaPlex RT Primers (10X) A veya B *	60.00 μ L
dNTPs with dTTP	15.30 μ L
MultiScribe Reverse Transcriptase	115.00 μ L
10X RT Buffer	61.30 μ L
MgCl ₂	69.00 μ L
RNaz İnhibitörü	7.60 μ L
DNaz, RNazsız su	23.80 μ L
	Toplam 345.00 μ L

3. Bir adet temiz 8'li strip tüp alınarak her bir kuyusuna yukarıdaki karışımdan 42 µL pipetlendi.
4. 8 kanallı pipet ile temiz bir 96 kuyuluk PCR plate'in her bir kuyucuğuna 3 µL reaktif karışımından pipetlendi.
5. RNA örneklerinin bulunduğu 96 kuyuluk plate'ten 8 kanallı pipet ile 2 µL alınarak cDNA için hazırlanan reaktif karışımı üzerine pipetlendi.
6. Plate, yapışkan film ile iyice kapatıldı ve 3 dakika 3000 rpm'de karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 1 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi.
7. Daha sonra 5 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
8. miRNA TaqMan cDNA Termal Protokolü Tablo 3'de verilen şekilde üstten ısıtma özelliği olan bir *thermal cycler*'da çalıştırıldı.

*Yukarıdaki protokol primer pool A ve B'nin her ikisi için ayrı ayrı uygulandı.

Tablo 3: cDNA termal program protokolü.

16°C	120 sn.	} 40 döngü
42°C	60 sn.	
50°C	1 sn.	
85°C	300 sn.	
4°C	∞	

4- mikroRNA Pre-amplifikasyonu

Pre-amplifikasyon Eldesi İçin Kullanılan Sarflar:

- 1- DNA Suspension Buffer (Katalog No: T0223, Teknova)
- 2- TaqMan PreAmp Master Mix, 2X (PN 4444750, 4391128, Applied Biosystems)
- 3- MegaPlex PreAmp Primers (10X), Human Pool A v2.1 (PN 4444750, 4391128, Applied Biosystems)
- 4- MegaPlex PreAmp Primers (10X), Human Pool B v3.0 (PN 4444750, 4391128, Applied Biosystems)

Pre-amplifikasyon Protokolü:

1. *Thermal cycler*'dan çıkarılan cDNA plate'i 30 saniye 2500 rpm'de santrifüj edildi.
2. 8 kanallı pipet 2 µL'ye ayarlanarak cDNA örnekleri temiz bir 96 kuyuluk plate'e aktarıldı. Üzerine 8 µL DNA *Suspension Buffer* eklenip üzeri yapıştırıcı film ile kapatılarak karıştırıcıda karışması sağlandı.
3. PCR karışımı 96 örnek için (94 cDNA örneği + 1 pozitif kontrol + 1 negatif kontrol) Tablo 4'te verilen reaktifler ile hazırlandı (Rakamlara ölü hacimler dahil edilmiştir).

Tablo 4: PCR karışımı hazırlanması.

TaqMan PreAmp Master Mix (2x)	287.50 µL
MegaPlex PreAmp Primers (10X) A veya B *	57.50 µL
Toplam	345.00 µL

4. Bir adet temiz 8'li strip tüp alınarak hazırlanan karışımdan strip tüpün her bir kuyusuna 42 µL pipetlendi.
5. 8 kanallı pipet yardımı ile 8'li strip tüpe dağıtılmış karışım, temiz bir 96 kuyuluk plate'in her bir kuyucuğuna 3 µL pipetlendi.
6. 8 kanallı pipet 2 µL'ye ayarlanarak sulandırılmış cDNA örnekleri, hazırlanan PCR karışımı üzerine pipetlendi.

7. Plate, yapışkan film ile iyice kapatıldı ve plate karıştırıcısında 3 dakika 3000 rpm'de karıştırıldı. Ardından 1 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi.
8. Daha sonra 5 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
9. miRNA TaqMan PreAmp Termal Protokolü Tablo 5'de verilen şekilde *thermal cycles*'da çalıştırıldı.

Tablo 5: Pre-amplifikasyon termal program protokolü.

95°C	600 sn.	
55°C	120 sn.	
72°C	120 sn.	
95°C	15 sn.	} 18 döngü
60°C	240 sn.	
99.9°C	600 sn.	
4°C	∞	

Pre-amplifikasyon sonunda 8 kanallı pipet ile 2 µL pre-amplifiye edilmiş cDNA örnekleri temiz bir 96 kuyuluk plate'e aktarıldı. Üzerine 18 µL *DNA Suspension Buffer* eklenerek 1:10 oranında sulandırıldı.

* Bu protokol Pool A ve B preamplifikasyon primerleri için ayrı ayrı pre-amplifiye cDNA A ve B olacak şekilde hazırlandı.

5- Dynamic Array ile mikroRNA Amplifikasyonu

Kullanılan Sarflar:

- 1- Dynamic Array 96.96 (Katalog No: BMK-M-96.96, Fluidigm)
- 2- Sample&Assay Loading Kit (Katalog No: 85000802, Fluidigm)
- 3- TaqMan Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG)
- 4- GE Sample Loading Reagent (Fluidigm, PN 85000746)

Kullanılan Cihazlar:

- 1- Yüksek Kapasiteli RT-PCR Sistemi (Katalog No: BMK-PKG-MH, S/N 185, Fluidigm, Biomark, USA)
- 2- IFC Controller (HX-10273, Fluidigm, Biomark, USA)

Dynamic Array 96.96'nın Hazırlanması:

Bir adet *Dynamic Array 96.96* alınıp üst ve alt kısımlarında bulunan küçük hücelere enjektörler içerisindeki kontrol sıvıları enjekte edildi (her hücreye 1 enjektör). *Dynamic Array 96.96*, *IFC Controller'a* yerleştirilerek *PRIME* işlemi başlatıldı. 20 dakikalık bu işlem sırasında aşağıdaki hazırlık yapıldı.

Örnek ve PCR Karışımının Hazırlanması:

1. Tablo 6'daki karışım 96 örnek için ölü hacim dahil edilerek hazırlandı.

Tablo 6: Örnekler için PCR karışımının hazırlanması.

TaqMan Universal PCR Master Mix	490.00 µL
GE Sample Loading Reagent	49.00 µL
Toplam	539.00 µL

2. Temiz bir 8'li strip tüp alındı, her bir kuyucuğuna 65 µL yukarıdaki karışımdan pipetlendi.
3. Temiz bir 96 kuyuluk plate alındı ve strip tüpteki karışımdan 3.85 µL her bir kuyucuğa pipetlendi. Daha sonra 8 kanallı pipet ile 3.15 µL

sulandırılmış pre-amplifiye cDNA örneklerinden alınarak karışım üzerine pipetlendi, üzeri film ile iyice kapatılıp karıştırıcıda 3000 rpm'de 3 dakika homojen şekilde karışması sağlandı. Sonrasında 1 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi.

4. Pre-amplifiye cDNA örneklerini içeren bu karışımın bulunduğu her bir kuyucuktan 5 µL alınarak dikkatlice *Dynamic Array 96.96*'da *SAMPLE* işaretli bölüme pipetlendi.

ASSAY Karışımının Hazırlanması:

1. Çalışmaya başlamadan önce A ve B Assay *plate*'leri, 30 µL DNaz, RNazsız su ve *Assay Loading Reagent* ile 1:1 oranında çözüldü.
2. Çözülen assay'lerden 4.5 µL alınarak *Dynamic Array 96.96*'da ASSAY şeklinde işaretli bölüme pipetlendikten sonra kalan assay *plate*'i -20°C'ye kaldırıldı.
3. *Dynamic Array 96.96*, *IFC Controller*'a konularak *LOAD* programı çalıştırıldı.

Analiz İşlemi:

1. Load ve Mix işlemi bitince *BioMark Data Collection Software*'de "Start"a, sonra "New Run"a tıklandı. Bu arada BioMark üzerindeki ışıkların ikisinin de yeşil olmasına dikkat edildi (Lambanın açılmış ve hazır olduğunu gösterir). *Dynamic Array 96.96* BioMark'a koyuldu ve "Load" ile yükleme işlemi başlatıldı.
2. "Chip Run File" ekranında "This is a new chip run"a tıklandı. Dosyayı nereye kaydedeceğimiz ve dosyanın isminin ne olacağı seçildi ve "Next" ile devam edildi.
3. "Application, Reference and Probes" ekranında "Application" bölümünde "Gene Expression", "Passive Reference" bölümünde "ROX" ve "Assay" bölümünde ise "Single Probe" tıklandı ve aşağıda açılan kısımdan "FAM – MGB" seçildi ve "Next" tıklandı.
4. Protokol olarak "GE 96.96 Standart V1 Thermal Protocol"ü seçildi ve "Auto Exposure"un seçili olduğundan emin olundu, "Next" ile devam edildi.

5. "Start Run" seçilerek çalışma başlatıldı.

qRT-PCR yöntemi ile Biomark Real Time-PCR cihazında, patolojik verilere göre gruplanan 94 hastanın plazmalarından elde edilen örneklerinde 59 farklı miRNA ekspresyonu tek döngüde çalışıldı. Örnek kazanımı sırasında oluşan deneysel hataların normalleştirilmesine yönelik olarak plazmada standardize edilen bir housekeeping miRNA geni olmadığı için çalışma içi global ekspresyon analiz ortalaması baz alınarak değerlendirme yapıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ denklemi kullanılarak gruplar arası ekspresyon farkları kat değişikliği olarak belirtildi. Sonrasında miRNA'ların ekspresyonları ile T-PSA ve s/T PSA oranının tek başına ya da birlikte kullanılıncı elde edilecek tanısal gücünü değerlendirmek için istatistiksel analizi yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar yapılarak benign-malign ayırımında hangisi ya da hangilerinin daha güçlü olduğu değerlendirildi.

mikroRNA Ekspresyonunun İstatistiksel Analizi: miRNA'ların ekspresyon eğrilerinde eşik değerin aşılip artışın görülmeye başlandığı ilk nokta belirlendi. Kaçınıcı döngüde artışın başladığı o miRNA'nın ekspresyon başlangıç değerine karşılık gelmektedir ve Döngü zamanı (Cycle time; Ct) olarak tanımlanmaktadır. Her bir miRNA, miktarı ile ters orantılı şekilde bir Ct'de pik vermektedir, çok olan daha erken bir Ct değerinde görülebilir eşik değeri aşacaktır.

miRNA ekspresyon verilerinin karşılaştırılması deneysel yaklaşımımıza göre rölaf kantifikasyon ile karşılaştırma yaklaşımıdır. Veriler gruplar arası gen ekspresyonu seviyesindeki kat olarak artış/azalış (*fold change*) şeklinde ifade edilmiştir.

İstatistik analizde grupları karşılaştırmak için kullanılan Mann-Whitney testi, ortalamalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığına karar vermek için dağılımları da incelemektedir. Verilerin analizinde kullanılan Mann Whitney testinde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak incelendi. Ortalama karşılaştırma durumlarında dağılımları inceleyen testlerde 20 veri puanı önerilmekte ve en az 12 veri puanı istenmektedir.

Fluidigm Dynamic Array ile BioMARK HD Sistemi'nde yapılan miRNA ekspresyonu için Real-time PCR ölçümleri Biogazelle qBasePLUS (Belgium)

veri analizi yazılımı ile değerlendirildi. Normalizasyon için miRNA çalışmalarında tercih edilen global ortalama normalizasyonu kullanıldı.

Assay'de ölçümü yapılan örnek sayısını ifade eden veri puanı 12'nin altına düştüğünde testin anlamlılığı oldukça hassaslaşmakta ve ortalamalardan ayrı olarak testin istatistiksel anlamlılığı için incelenen dağılım büyük ihtimalle standart bir eğri oluşturamayacak kadar az bulunmaktadır. Bu yüzden testin anlamlılık düzeyini ifade eden p değeri bu gruplarda oldukça yüksek olmakta ve istatistiksel olarak anlamlı bir karşılaştırma ifade edilememektedir.

Analizler MedCalc ve SPSS 11,5 istatistik programları kullanılarak yapıldı. Analizlerden ise ROC Curve ve Faktör Analizi kullanıldı.

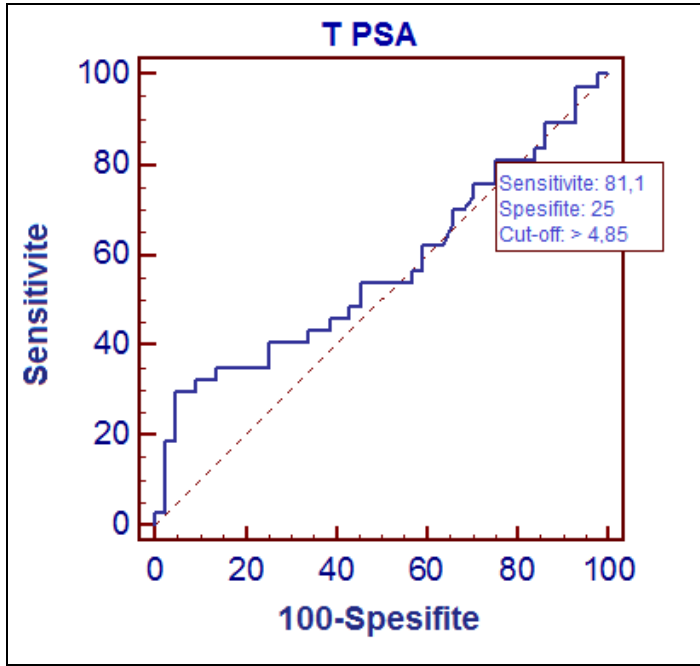
BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen gruplara ait tanımlayıcı bilgiler Tablo 7’de verildi.

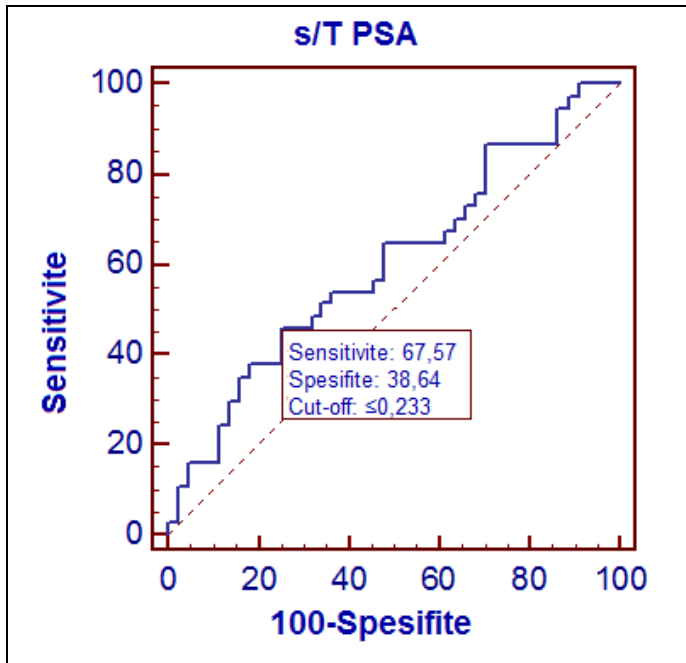
Tablo 7: Kontrol ve hasta gruplarına ait tanımlayıcı bilgiler.

Grup	Yaş ortalaması	Alkol (+/-)	Sigara (+/-)	Prostat Volümü
Kontrol (n:44)	61,8 yıl	6/38	13/31	50,4 cc
Hasta-1 (n: 37)	63,9 yıl	4/33	4/33	42,7 cc
Hasta-2 (n:13)	65,5 yıl	2/11	2/11	36,7 cc

Hasta-1 ile Kontrol Gruplarında T-PSA ve s/T PSA Değerlerine Ait Bulgular: Hasta-1 grubu (37) ile kontrol grubunun (44) T-PSA ve s/T PSA oranı verileri karşılaştırılarak, alıcı işletim karakteristik (receiver operating characteristic; ROC) eğrileri çizildi (Şekil 4, Şekil 5). Duyarlılık (sensitivite) ve özgüllükleri (spesifite) için optimum değerler belirlenerek bunlara karşılık gelen kestirim değerleri (cut-off) seçildi.



Şekil 4: Hasta-1 ile kontrol gruplarında T-PSA'nın ROC eğrisi. (AUC=0.566)



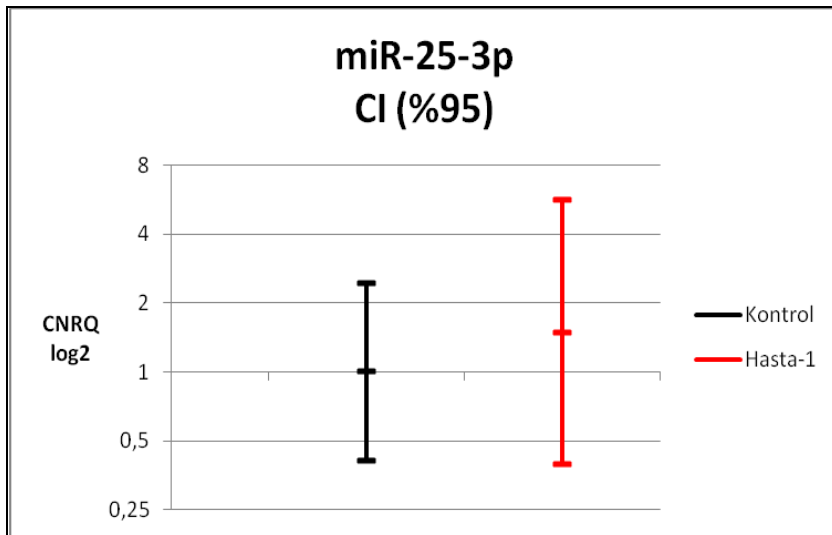
Şekil 5: Hasta-1 ile kontrol gruplarında s/T PSA oranının ROC eğrisi. (AUC=0.602)

PSA'nın kestirim değeri >4.85 ng/mL iken duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla; %81.1 ve %25 idi. s/T PSA oranının kestirim değeri ≤ 0.233 ($\leq \%23.3$) iken duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %67.57 ve %38.64 idi. T-PSA ve s/T PSA oranının eğri altında kalan alanı (area under the curve; AUC) sırasıyla; 0.566 ($p=0.3206$) ve 0.602 ($p=0.1109$) olarak hesaplandı. s/T PSA'nın tanısallık gücünün daha yüksek olduğu görüldü.

Hasta-1 ile Kontrol Gruplarında miRNA Ekspresyon Değerlerine Ait Bulgular: Ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı olan miRNA'lar belirlenerek ROC eğrileri çizildi ve bunlar arasından AUC'si s/T PSA oranına yakın ve yüksek olan miRNA'lar ile duyarlılığı ve tanısallık güçleri karşılaştırıldı.

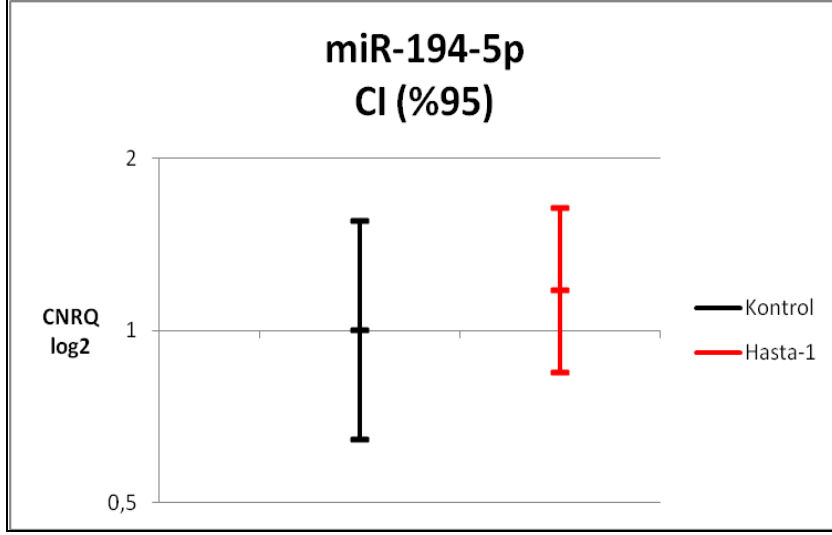
Hasta-1 grubundaki 37 bireyin miRNA ekspresyon verileri, 44 bireylik kontrol grubu ile Mann Whitney testi ile %95 güven aralığında (Confidence Interval; CI) ($p<0,05$) karşılaştırılarak istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı araştırıldı. Veri puanı olarak 11 ve üstü olan miRNA'lar alındı.

Bu iki grup arasında, bakılan miRNA'lar açısından istatistiksel fark bulunamadı ($p>0,05$). 59 miRNA arasından veri puanı 11'den yüksek bulunan iki miRNA'nın (miR-25-3p ve miR-195-5p) ekspresyon verileri değerlendirildi. Gruplardaki veri dağılımı %95 CI grafiklerinde, Şekil 6 ve 7'de gösterildi.



Şekil 6: Hasta-1 ile kontrol gruplarında miR-25-3p veri dağılımının %95 CI'da gösterimi. (CNRQ: Calibrated Normalised Relative Quantity (kalibre normalize göreceli

miktarı), CI: Güven Aralığı (Confidence Interval)), (%95 CI'da; kontrol grubunda en düşük ve en yüksek değerler: 0.412-2.425 Δ Ct, hasta-1 grubunda en düşük ve en yüksek değerler:0.396-5.617 Δ Ct, ortalama=1.491 Δ Ct.)



Şekil 7: Hasta-1 ile kontrol gruplarında miR-194-5p veri dağılımının %95 CI'da gösterimi. (CNRQ: Calibrated Normalised Relative Quantity (kalibre normalize göreceli miktarı), CI: Confidence Interval (Güven Aralığı)), (%95 CI'da; kontrol grubunda en düşük ve en yüksek değerler: 0.645-1.551 Δ Ct, hasta-1 grubunda en düşük ve en yüksek değerler:0.846-1.638 Δ Ct, ortalama=1.177 Δ Ct.)

y-ekseninde kalibre normalize göreceli miktarı (Calibrated normalized relative quantity; CNRQ) olarak sunulan miRNA ekspresyonu katsayıları \log_2 tabanında gösterilmiştir. Buna göre kontrol grup ortalaması 1 olarak ölçeklenmiş ve %95 CI'daki en düşük ve en yüksek değerler gösterilmiştir. Hasta-1 ile kontrol grubu arasında %5'ten daha fazla benzerlik olduğu, Şekil 6 ve 7'de görülmektedir. Sonuç olarak, miR-24-3p ve miR-195-5p için hasta-1 ile kontrol grupları arasında miRNA ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

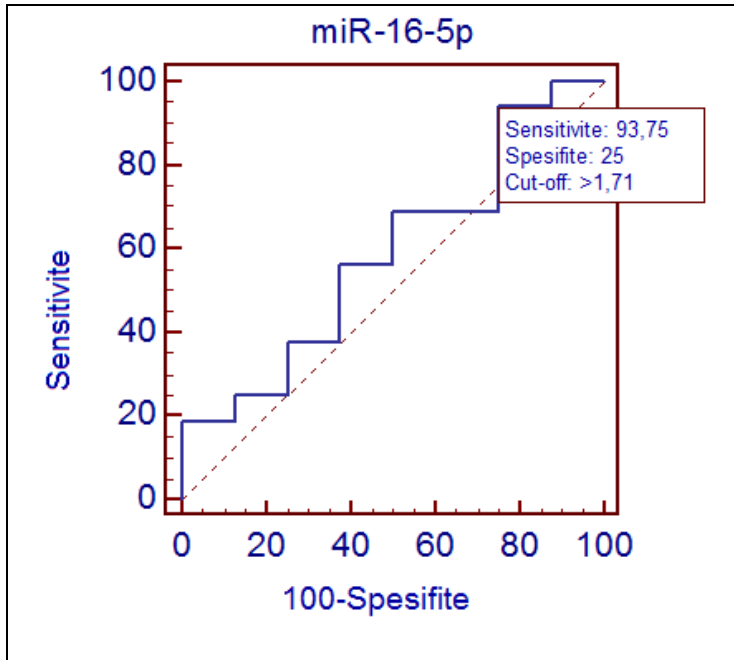
Hasta-1 ile kontrol grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da bazı miRNA'lar için hem global ortalamaya göre, hem de gruplar arası karşılaştırmaya göre 2 ve üzerinde kat değişimi olduğu görüldü ve bu değişimler anlamlı olarak değerlendirildi. 2 kat ve üzerinde değişim görülen miRNA'lar Tablo 8'de verildi.

Tablo 8: Hasta-1 ile kontrol gruplarında, ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı görülen miRNA'lar.

Artan miRNA'lar	Azalan miRNA'lar
miR-16-5p	miR-203a
miR-17-5p	

Kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) değerleri baz alınarak gruplar arası karşılaştırma ile anlamlı kat artışının belirlendiği bu 3 miRNA'nın tanısal gúcünü değerlendirmek için MedCalc istatistik programı kullanılarak ROC eğrileri çizildi. Optimum özgülük ve duyarlılık değerleri temel alınarak her bir parametrenin kestirim değerleri belirlendi. Bunlar arasından yalnızca miR-16-5p'nin AUC değerleri diğerlerine göre daha yüksek olarak değerlendirildi.

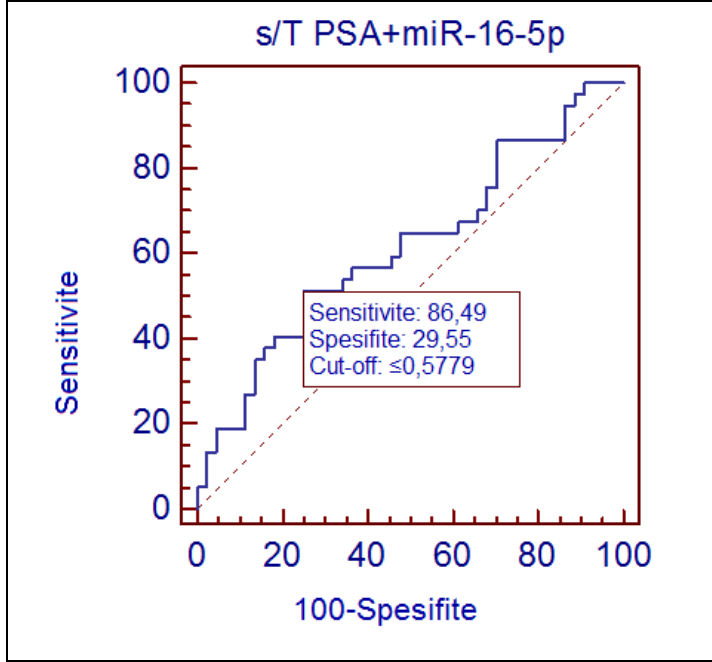
miR-16-5p için kestirim değeri >1.71 kat iken duyarlılığı %93.75 ve özgülüğü %25 idi. Buna göre AUC değeri 0.586 ($p=0.5080$) olarak hesaplandı (şekil 8).



şekil 8: Hasta-1 ile kontrol gruplarında miR-16-5p ROC eğrisi. (AUC=0.586)

s/T PSA oranı AUC'sinden daha düşük değere sahip olsa da bu üç miRNA arasından en yüksek AUC değerine sahip olan miR-16-5p seçilerek s/T PSA oranı ile kombine ROC eğrileri çizilerek değerlendirildi.

s/T PSA + miR-16-5p kombinasyonunda AUC=0.616 (p=0.0691) olarak hesaplandı (Şekil 9).



Şekil 9: Hasta-1 ile kontrol gruplarında s/T PSA + miR-16-5p kombinasyonu ROC eğrisi. (AUC=0.616)

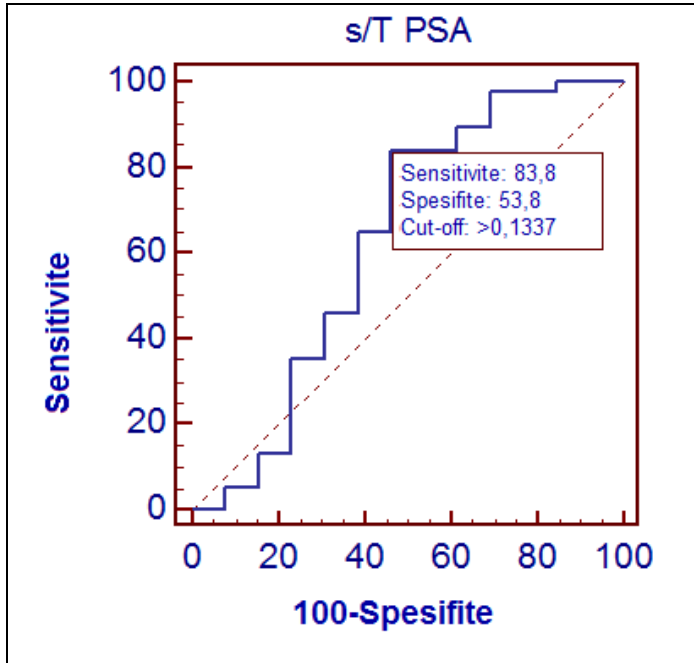
Tablo 9: Hasta-1 ile kontrol grup karşılaştırmasında, ROC eğrileri çizilen parametrelerin verileri.

Parametre	Cut-off	AUC	Duyarlılık	Özgüllük
T-PSA	4,85 ng/mL	0,566	%81,1	%25
s/T PSA	%23,3	0,602	%67,57	%38,64
miR-16-5p	1,71 kat	0,586	%93,75	%25
s/T PSA+miR-16-5p	0,5779	0,616	%86,49	%29,55

Grafiklerden yola çıkarak, Tablo 9'da da gösterilen verilere göre hasta-1 ile kontrol karşılaştırmasında; parametrelerin AUC'lerine bakıldığında en iyi sonucun s/T PSA + miR-16-5p kombinasyonu ile elde edildiği, tek başına değerlendirilen parametrelerden daha güçlü tanısal değeri olduğunu söyleyebiliriz.

Hasta-2 ile Hasta-1 Gruplarında T-PSA ve s/T PSA Değerlerine Ait Bulgular: T-PSA değerleri hasta gruplarından birinde 2-10 ng/mL, diğerinde >10 ng/mL olduğu ve ortak alanları olmadığı için duyarlılık ve özgüllüğü %100 olacaktır. Bu nedenle yalnızca s/T PSA oranı değerlendirmeye alındı. Hasta-2 grubu (13) ile hasta-1 grubunun (37) s/T PSA oranı verileri karşılaştırılarak, ROC eğrileri çizildi. Duyarlılık ve özgüllükleri için optimum değerler belirlenerek bunlara karşılık gelen kestirim değerleri seçildi.

s/T PSA oranı için kestirim değeri >0.1337 (>%13.37) olduğunda optimum duyarlılık %83.8 ve optimum özgüllük %53.8 idi. AUC'si ise 0.628 ($p=0.2448$) olarak hesaplandı (Şekil 10).



Şekil 10: Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA oranı karşılaştırılmasında ROC eğrisi. (AUC=0.628)

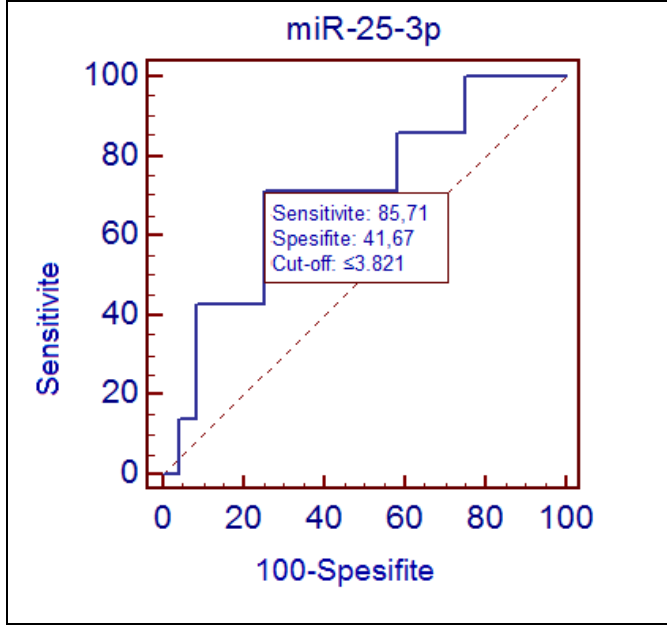
Hasta-2 ile Hasta-1 Gruplarında miRNA Ekspresyon Değerlerine Ait

Bulgular: Hasta-2 grubunun miRNA ekspresyonu verileri, hasta-1 grubu ile Mann Whitney testi ile %95 CI'da ($p<0,05$) karşılaştırılarak istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı araştırıldı. Tüm örnekler için %80 amplifikasyon verimi ile saptanan örnekler incelendi. Sonuç olarak T-PSA>10 ng/mL olan hasta-2 grubunda bazı miRNA'ların ekspresyonları azalmış olsa da (Tablo 10) bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Tablo 10: Hasta-2 ile hasta-1 grupları arasında, ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı görülen miRNA'lar.

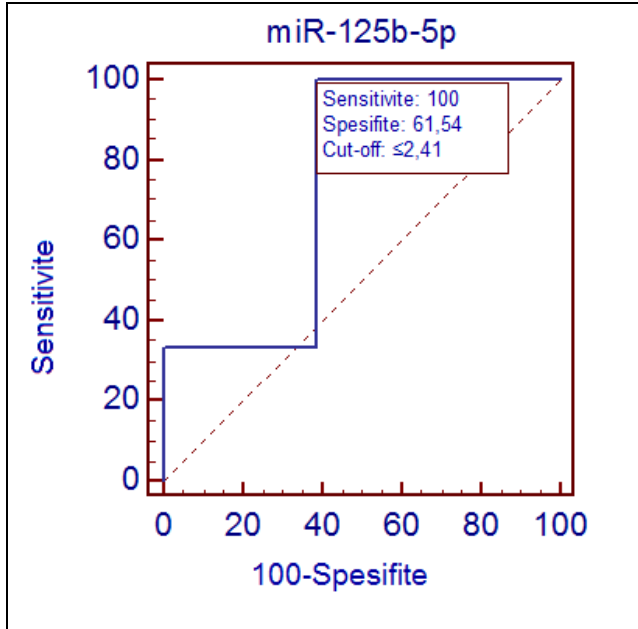
Azalan miRNA'lar	
miR-25-3p	miR-194-5p
miR-125b-5p	miR-203a

Gruplar arası kat farkı bulunan 4 miRNA'nın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine göre ROC eğrileri çizildi. Bu dört miRNA'nın da AUC'si s/T PSA oranından daha yüksek değerlere sahipti. miR-25-3p için kestirim değeri ≤ 3.821 kat olarak alınınca optimum duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla %85.71 ve %41.67 iken AUC=0.708 ($p=0.0762$) olarak hesaplandı (Şekil 11).



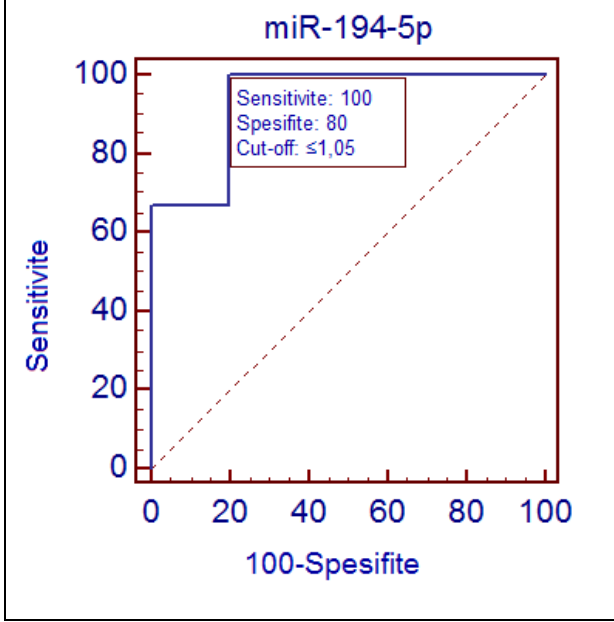
Şekil 11: Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında miR-25-3p ROC eğrisi. (AUC=0.708)

miR-125b-5p'in ROC eğrisinde ise kestirim değeri ≤ 2.41 kat olarak alınınca %100 duyarlılık ve %61.54 özgüllük görüldü. Grafikte AUC=0.744 (p=0.1249) olarak hesaplandı (Şekil 12).



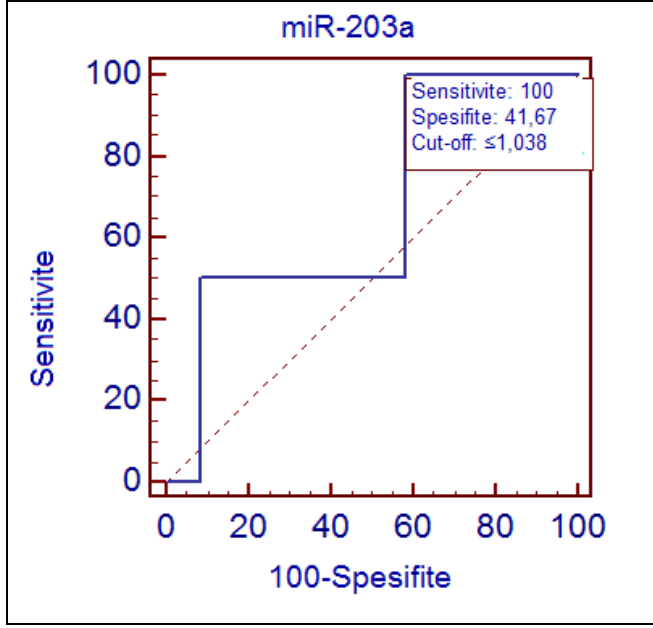
Şekil 12: Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında miR-125b-5p ROC eğrisi. (AUC=0.744)

Bir diğeri miRNA olan miR-194-5p'nin ROC eğrisinde kestirim değeri ≤ 1.05 kat alındığında optimum duyarlılık %100 ve özgüllüğü %80 iken $AUC=0.933$ ($p<0.0001$) idi (Şekil 13).



Şekil 13: Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında miR-194-5p ROC eğrisi. ($AUC=0.933$)

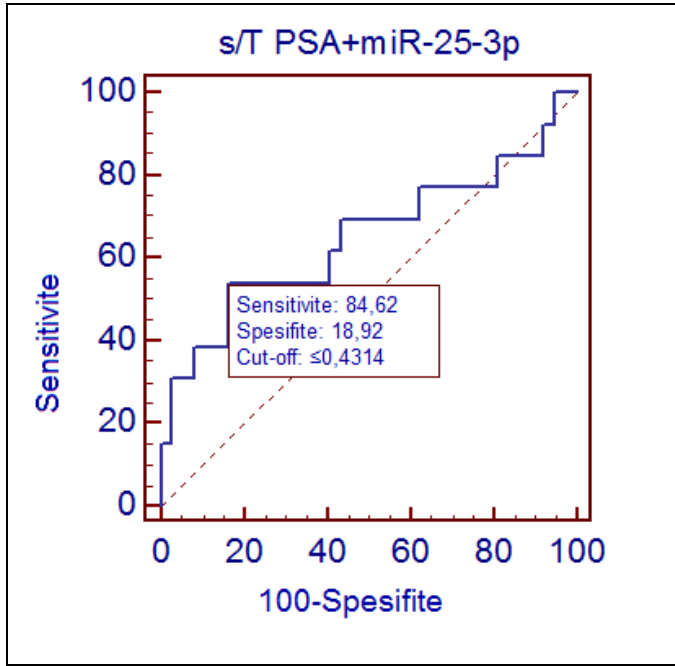
miR-203a için kestirim değeri ≤ 1.038 kat olarak alındığında optimum duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla %100 ve %41.67 iken $AUC=0.667$ ($p=0.5326$) olarak hesaplandı (Şekil 14).



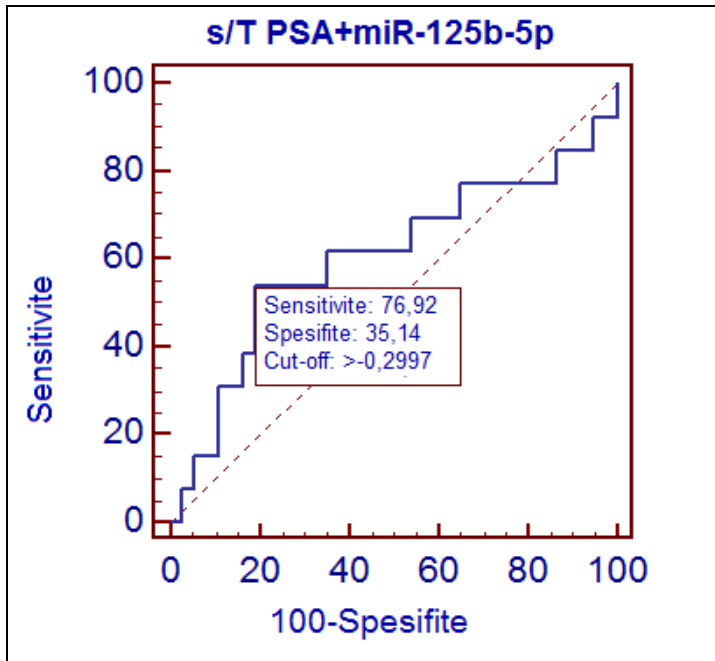
Şekil 14: Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında miR-203a ROC eğrisi. (AUC=0.667)

Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA oranından daha yüksek AUC değerine sahip olan bu dört miRNA'nın her biri tek tek ve dördü birlikte s/T PSA ile beraber ROC eğrileri çizilerek değerlendirildi, tanısal güçleri karşılaştırıldı.

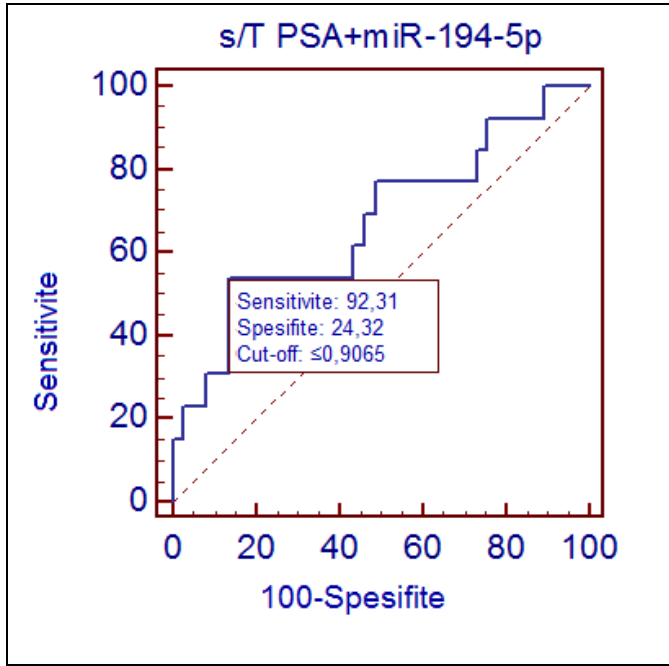
s/T PSA + miR-25-3p kombinasyonu için AUC=0.647 ($p=0.1645$) iken s/T PSA + miR-125b-5p kombinasyonunda AUC=0.601 ($p=0.3423$), s/T PSA + miR-194-5p için AUC=0.672 ($p=0.0729$), s/T PSA + miR-203a için AUC=0.707 ($p=0.0131$) olarak hesaplandı. s/T PSA + miR-25-3p + miR-125b-5p + miR-194-5p + miR-203a kombinasyonunda ise AUC değeri 0.576 ($p=0.3436$) idi (Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18, Şekil 19).



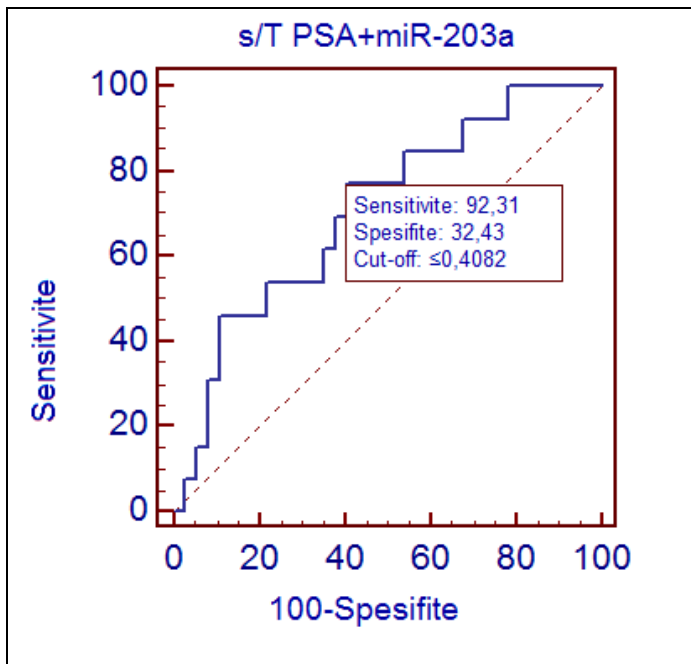
Şekil 15: Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA + miR-25-3p kombinasyonu ROC eğrisi. (AUC=0.647)



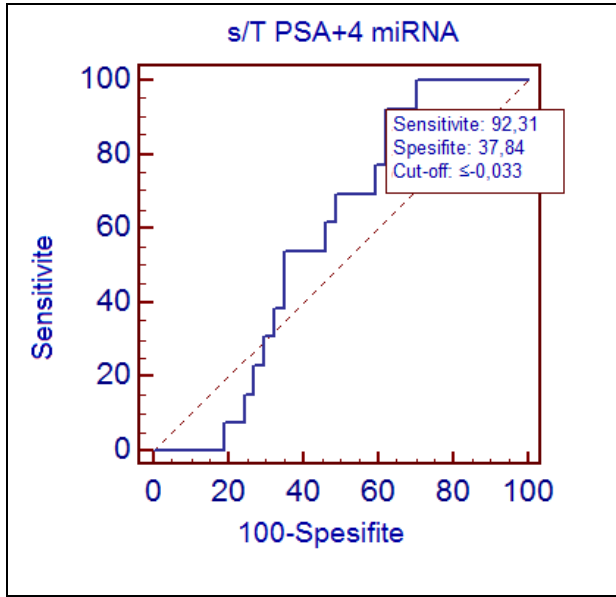
Şekil 16: Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA + miR-125b-5p kombinasyonu ROC eğrisi. (AUC=0.601)



Şekil 17: Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA + miR-194-5p kombinasyonu ROC eğrisi. (AUC=0.672)



Şekil 18: Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA + miR-203a kombinasyonu ROC eğrisi. (AUC=0.707)



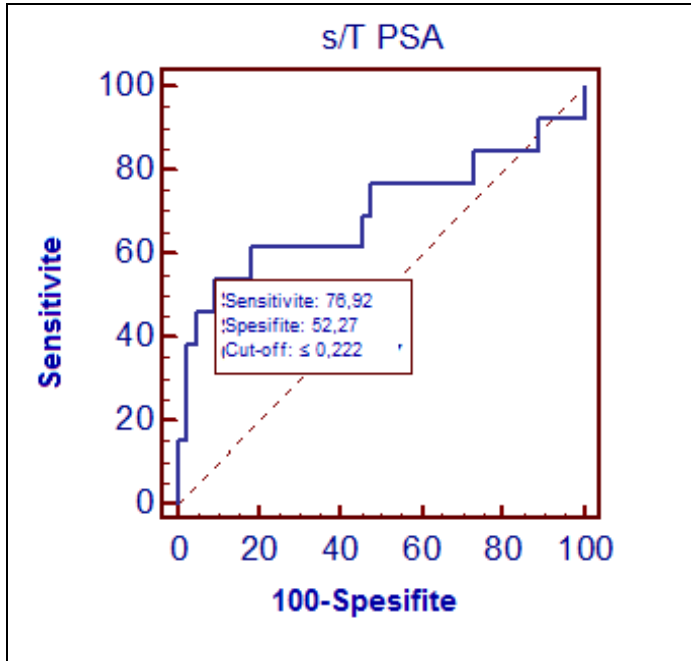
Şekil 19: Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA + miR-25-3p + miR-125b-5p + miR-194-5p + miR-203a kombinasyonu ROC eğrisi. (AUC=0.576)

Tablo 11: Hasta-2 ile hasta-1 grup karşılaştırmasında, ROC eğrileri çizilen parametrelerin verileri.

Parametre	Cut-off	AUC	Duyarlılık	Özgüllük
s/T PSA	%13,37	0,628	%83,8	%53,8
miR-25-3p	3,821 kat	0,708	%85,7	%41,67
miR-125b-5p	2,41 kat	0,744	%100	%61,54
miR-194-5p	1,05 kat	0,933	%100	%80
miR-203a	1,038 kat	0,667	%100	%41,67
s/T PSA+miR-25-3p	0,4314	0,647	%84,62	%18,92
s/T PSA+miR-125b-5p	-0,2997	0,601	%76,92	%35,14
s/T PSA+miR-194-5p	0,9065	0,672	%92,31	%24,32
s/T PSA+miR-203a	0,4082	0,707	%92,31	%32,43
s/T PSA+4 miRNA	-0,033	0,576	%92,31	%37,84

Tablo 11'deki sonuçlara göre tek başına miR-194-5p ve kombinasyonlardan ise s/T PSA + miR-203a kombinasyonunun AUC değeri en yüksek değeri.

Hasta-2 ile Kontrol Gruplarında T-PSA ve s/T PSA Değerlerine Ait Bulgular: Hasta-2 grubu (13) ile kontrol gruplarının (44) s/T PSA oranları karşılaştırıldı. Çizilen s/T PSA oranı ROC eğrilerine göre kestirim değeri ≤ 0.222 ($\leq \%22.2$) iken buna karşılık gelen optimum duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla $\%76.92$ ve $\%52.27$ idi. Bu verilere göre AUC değeri 0.698 ($p=0.0584$) olarak hesaplandı (Şekil 20).



Şekil 20: Hasta-2 ile kontrol gruplarında s/T PSA oranı ROC eğrisi. (AUC=0.698)

Hasta-2 ile Kontrol Gruplarında miRNA Ekspresyon Değerlerine Ait Bulgular: Hasta-2 grubu ile kontrol grubu miRNA ekspresyon verileri Mann Whitney testi ile $\%95$ CI'da ($p<0,05$) karşılaştırılarak istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı araştırıldı. Tüm örnekler için $\%80$ amplifikasyon verimi ile saptanan örnekler incelendi. Sonuç olarak hasta-2 ile kontrol grupları arasında

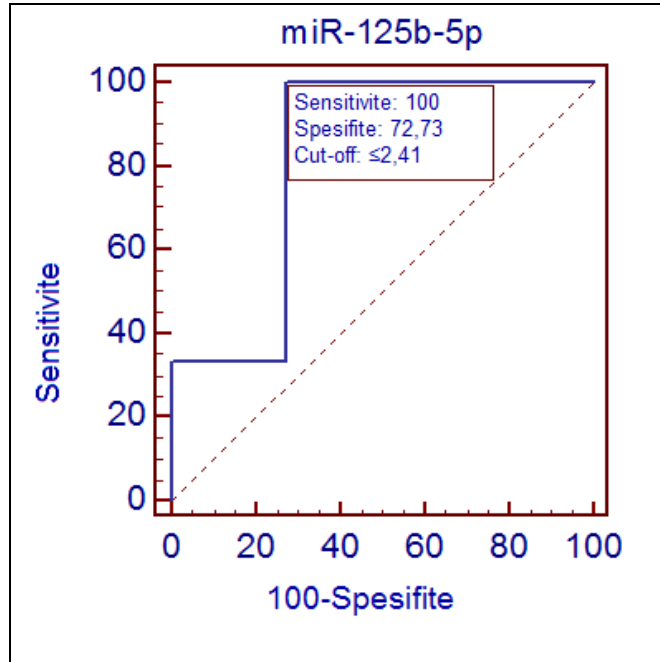
istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamasa da Tablo 12’da gösterilen miRNA’ların gruplar arasında iki ve üstü kat farkının olduğu görüldü.

Tablo 12: Hasta-2 ile kontrol gruplarında ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı görülen miRNA’lar.

Artan miRNA’lar	Azalan miRNA’lar
miR-181c-5p	miR-25-3p
	miR-125b-5p
	miR-194-5p

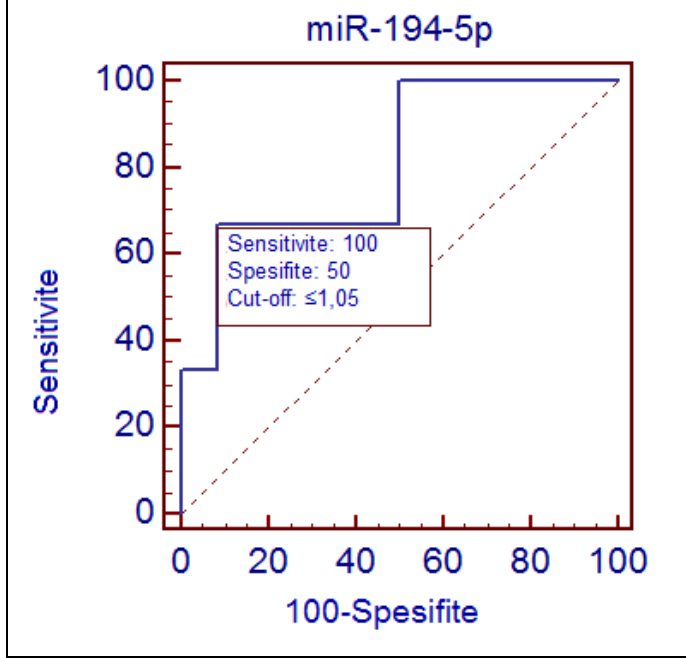
Hasta-2 ile kontrol grupları arasında kat farkı bulunan 4 miRNA’nın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine göre ROC eğrileri çizildi. s/T PSA oranı AUC değerinden daha yüksek değere sahip olan iki miRNA belirlendi, miR-125b-5p ve miR-194-5p.

miR-125b-5p için optimum duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %72.73 iken kestirim değeri ≤ 2.41 kat olarak belirlendi. Buna göre AUC=0.818 (p=0.0149) olarak hesaplandı (Şekil 21).



Şekil 21: Hasta-2 ile kontrol gruplarında miR-125b-5p ROC eğrisi. (AUC=0.818)

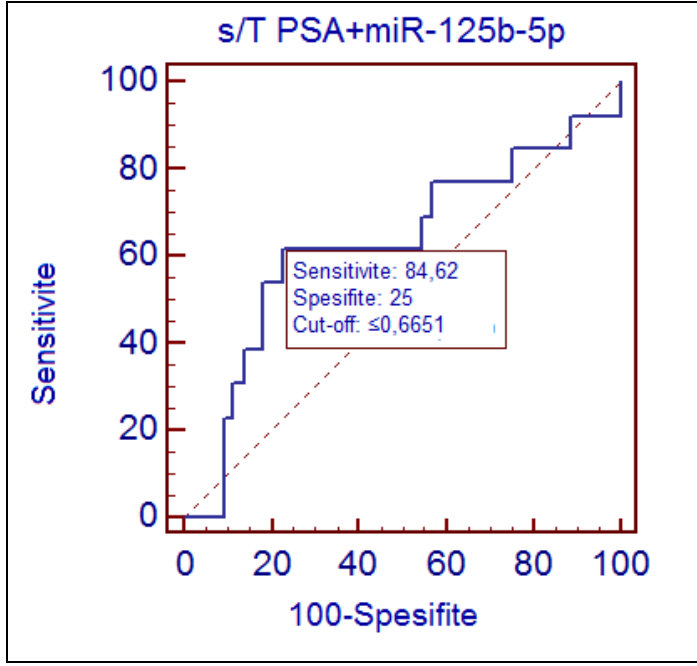
miR-194-5p için optimum duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %100 ve %50 alındığında kestirim değeri ≤ 1.05 kat idi. ROC eğrisine göre AUC'si 0.806 ($p=0.0681$) olarak hesaplandı (Şekil 22).



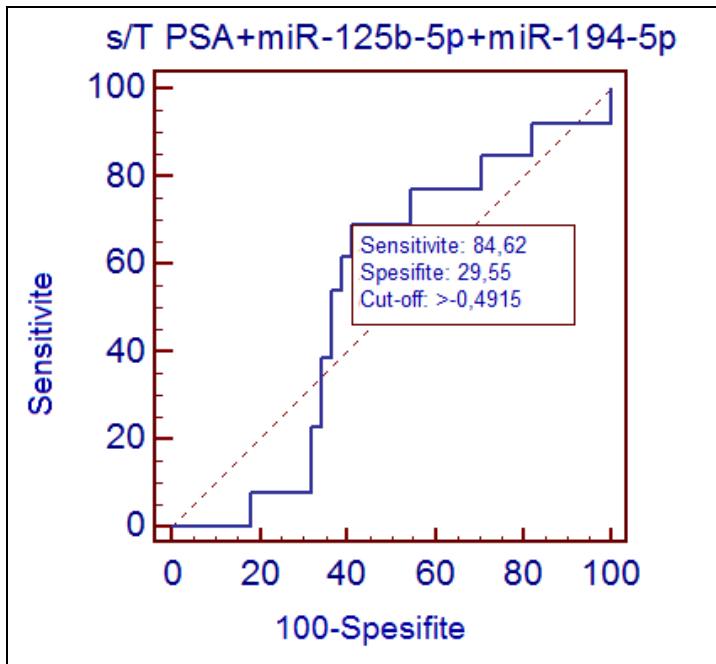
Şekil 22: Hasta-2 ile kontrol gruplarında miR-194-5p ROC eğrisi. (AUC=0.806)

Hasta-2 ile kontrol gruplarında s/T PSA oranından daha yüksek AUC değerine sahip olan miR-125b-5p ve miR-194-5p'nin her biri tek tek ve ikisi birlikte s/T PSA ile beraber ROC eğrileri çizilerek değerlendirildi, tanısal güçleri karşılaştırıldı.

s/T PSA + miR-125b-5p kombinasyonu için AUC=0.626 ($p=0.2079$) iken s/T PSA + miR-125b-5p + miR-194-5p kombinasyonunda AUC değeri 0.532 ($p=0.7133$) idi (Şekil 23, Şekil 24). İstatistik programı veri sayısı yetersiz olarak değerlendirdiği için s/T PSA + miR-194-5p ROC eğrisini çizemedi.



Şekil 23: Hasta-2 ile kontrol gruplarında s/T PSA + miR-125b-5p kombinasyonu ROC eğrisi. (AUC=0.626)



Şekil 24: Hasta-2 ile kontrol gruplarında s/T PSA + miR-125b-5p + miR-194-5p kombinasyonu ROC eğrisi. (AUC=0.532)

Tablo 13: Hasta-2 ile kontrol grup karşılaştırmasında, ROC eğrileri çizilen parametrelerin verileri.

Parametre	Cut-off	AUC	Duyarlılık	Özgüllük
s/T PSA	%22,2	0,698	%76,92	%52,27
miR-125b-5p	2,41 kat	0,818	%100	%72,73
miR-194-5p	1,05 kat	0,806	%100	%50
s/T PSA+miR-125b-5p	0,6651	0,626	%84,62	%25
s/T PSA+2 miRNA	-0,4915	0,532	%84,62	%29,55

Grafiklerden elde edilen verilere göre çizilen Tablo 13'te de görülebileceği gibi, tek başına bu iki miRNA'nın daha yüksek tanısal gücü olduğu, kombine kullanıldığında ise daha düşük bir düzeye indiği görüldü.

TARTIŞMA

Tümör belirteci; özgün olarak tümör dokusundan salgılanan makromolekül olarak tanımlanmaktadır. Başka doku ve kanserlerde sentezi en az düzeyde olmalı, hasta olmayanlarda sentezi minimum olmalı, başka doku ve kanserlerde sentezlense de immünolojik özellikleri farklı olmalı, tümörün kitlesi ve aktivitesi ile orantılı sentezlenmeli, yarı ömrü çok uzun olmamalı, çok küçük tümör kitlesinde bile ölçülebilir düzeyde belirteç üretilmelidir²⁰¹.

Prostat kanserinde tarama ve erken tanı testi olarak tümör belirteçlerinden biri olan PSA kullanılmakta, ancak prostatın benign hastalıklarında da yükseldiği bilinmektedir. Benign hastalıklarda invaziv ve hasta açısından sıkıntılı bir işlem olan biyopsiyi önlemek ve benign-malign hastalık ayırımını yapabilmek için, çalışmamızda 59 farklı miRNA'nın ekspresyonlarının benign ve malign hastalardaki düzeylerini karşılaştırarak tanısal güçlerini değerlendirdik.

Çalışmamızda, seçtiğimiz 94 hastanın plazma örneklerinden izole edilen miRNA'ların ekspresyon düzeylerini hasta grubu ile kontrol grupları arasında karşılaştırdık.

Hasta-1 ve kontrol gruplarında T-PSA verileri ile çizdiğimiz ROC eğrilerinden edindiğimiz sonuçlar literatür ile yakın değerlere sahipti. Çalışmamızda kestirim değeri 4.85 ng/mL iken duyarlılığı %81.1 ve özgüllüğü %25 olduğu görülürken, literatürde 3.9 ng/mL kestirim değeri alındığında %85 duyarlılık ve %25 özgüllükle benign hastaları malign olandan ayırabildiği gösterilmiştir⁸.

s/T PSA oranı hasta-1 ile kontrol gruplarına ait verilere göre değerlendirildiğinde de optimum duyarlılık ve özgüllük alındığında kestirim değerinin daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görüldü. Çalışmalarda s/T PSA oranı için %14-25 aralığının eşik değer olarak kullanılması önerilmiştir⁶⁵. Bizim çalışmamızda da %23.3 kestirim değerinde duyarlılığı %67.57, özgüllüğü %38.64 idi.

Prostat kanseri tanısı için gri zonda PSA değerlerine sahip hastalarla yapılan çalışmalarda s/T PSA'nın tanısal gücünün T-PSA'dan daha iyi olduğu, daha yüksek duyarlılıkla malign-benign ayırımı yaptığı gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalara göre gri zon hastalarında malign-benign ayırımını s/T PSA %95 duyarlılıkta yaparken T-PSA'nın duyarlılığı %85'te kalmaktadır^{8, 65, 72}. Bizim çalışmamızda literatürle uyumlu olarak T-PSA (0.566) ve s/T PSA (0.602) ROC eğrileri arasından s/T PSA'nın daha yüksek AUC'ye sahip olması nedeniyle daha iyi ayırım yapabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda prostat hastalıklarında benign-malign ayırımı için hedeflediğimiz miRNA'ların tanısal güçlerini de değerlendirdik. Hasta-1 ile kontrol karşılaştırmasında anlamlı kat farkı olan miRNA'lar arasından (miR-16-5p, miR-17-5p, miR-203a) s/T PSA'dan daha yüksek AUC'ye sahip bir miRNA olmadı. Gruplar arası karşılaştırmada kontrol grubuna göre kanserli hastalarda arttığı görülen ve s/T PSA oranına yakın AUC değeri olan miR-16-5p ile s/T PSA kombinasyonunun tanısal gücü değerlendirildi. Elde edilen AUC tek başına her iki parametrenin sahip olduğundan daha yüksek bulunduğu (0.616) miR-16-5p ile s/T PSA kombinasyonunun tanısal gücünün daha iyi olduğu gösterildi.

Benign-malign ayırımında tanısal olarak faydalı olabileceğini bulduğumuz miR-16-5p ile ilgili olarak literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan Watahiki ve arkadaşlarının çalışmasında benign prostat dokusu ile karşılaştırıldığında miR-16'nın (yeni isimlendirmede miR-16-5p) kanserli dokuda azaldığı gösterilmiş ve miR-16'nın prostat kanserinde metastazı baskılayıcı özelliği olduğu, metastaz gelişimi ile korele olduğu ileri sürülmüştür^{26, 202, 203}.

Prostat kanserli hasta ile yüksek ve normal aralıkta PSA seviyelerine sahip prostat kanserli olmayan kontrol grubu prostat dokularında 157 miRNA'nın ekspresyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-16'nın kanserli grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir²⁰⁴. Lokalize ve metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserli hastalarda yapılan diğer bir çalışmada ise bu iki durumun ayırımında belirteç olarak kullanılabilmesi açısından plazmadan izole edilen miRNA'ların ekspresyonları değerlendirilmiş. Çalışmaya dahil edilen miRNA'lar arasından miR-16 ekspresyonunun lokalize gruba göre metastazlı grupta azaldığı görülmüş²⁰⁵. Mahn ve arkadaşlarının

lokalize prostat kanserli, BPH'lı ve sağlıklı kontrollerin serumlarından izole edilen miRNA ekspresyonları; malign-normal prostat dokusu ve prostatektomiden önce ve sonrasında serumdan çalışılarak karşılaştırdıkları çalışmalarında ise kanserli ve normal doku miR-16 ekspresyonları arasında fark görülmezken kanserli hasta serumlarında artmış olduğu, prostatektomi sonrasında ise azaldığı gözlenmiş¹⁹⁹.

miR-16 için bazı çalışmalarda malign ve benign hastalarda ekspresyon düzeyi farklı olmadığı için plazmadan miRNA ekspresyon profillemesi için *housekeeping* olarak alınmıştır. Bazı çalışmalarda kanserli hasta örneklerinde azaldığı yönünde sonuçlar bulunmakta iken, bizim çalışmamızda Mahn ve arkadaşlarının serumdan elde edilen sonuçları ile benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kat olarak artış görüldü^{199, 206-208}.

Hasta-2 ve hasta-1 grup karşılaştırmasında s/T PSA oranı için çizilen ROC eğrilerine göre AUC'si hesaplanıp (0.628), bu değerden daha yüksek bulunan miRNA'lar ile kombine ROC eğrileri çizilerek tanısal güçleri karşılaştırıldı. miR-25-3p, miR-125b-5p, miR-194-5p ve miR-203a'nın hasta-1 grubuna göre hasta-2 grubunda azaldığı görüldü ve her birinin tek tek ve hepsi birlikte s/T PSA oranı ile kombine edilerek ROC eğrileri çizildi. miR-194-5p'nin tek başına AUC değeri (0.933) istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.0001$) ve en iyi tanı gücüne sahip olan parametre idi. Kombine olanlardan ise s/T PSA + miR-203a'nın sonuçları diğerlerine göre daha yüksek olarak hesaplandı (0.707) ve istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p = 0.0131$).

Tong ve arkadaşlarının prostatektomi örneklerinden (evre T2a/b, erken nüks, nüks görülmeyen kanserli hastalardan alınan) qRT-PCR yöntemi ile miRNA ekspresyon profillemesi yaptıkları çalışmada, miR-194 ekspresyonunun (yeni isimlendirmede miR-194-5p) kanserli grupta arttığı gösterilmiştir. Değişmiş miRNA ekspresyonunun prostattaki onkojenik sürece eşlik ettiğini, buldukları anormal miRNA ekspresyonlarının erken hastalık nüks eğilimini yansıtır olabileceğini ileri sürmüşlerdir¹⁹⁶. Bizim çalışmamızda ise plazmadan çalışılan ve PSA değerine göre ayrılan iki hasta grubu karşılaştırıldığında miR-194-5p ekspresyon düzeylerinin hasta-2 grubunda azaldığını bulduk. Doku ve plazma örnekleri arasında ekspresyon düzeyleri arasında farklılık olabileceğini gösteren

çalışmaların olması bizim çalışmamızla literatür arasındaki farklılığın sebebi olabileceğini düşündürmektedir¹⁹⁹.

Prostat kanserli ve normal prostat dokusu örneklerinden real-time PCR ile miR-203 (yeni isimlendirmede miR-203a) ekspresyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-203'ün ilerlemiş prostat kanserlerinde korele olarak azaldığı gösterilerek, "anti-metastatik" olduğu ileri sürülmüştür¹⁷². Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu şekilde miR-203a ekspresyon düzeylerinin azaldığı görüldü.

Hasta-2 ile kontrol karşılaştırmasında da öncelikle s/T PSA oranı ROC eğrileri değerlendirildi. Bu eğriye göre AUC değeri hesaplanıp (0.698) bundan daha yüksek AUC değerine sahip miRNA'lar ile birlikte analiz edildi.

Grup karşılaştırmaları sonucu azalmış olarak bulunan miR-125b-5p ve miR-194-5p'nin AUC değerleri daha yüksek olarak hesaplandı (sırasıyla; 0.818 ve 0.806). Sonrasında tek tek ve beraber s/T PSA oranı ile kombine olarak ROC eğrileri çizildi. Ancak bunlardan s/T PSA + miR-194-5p ROC eğrisi veri sayısı az olduğu için çizilemedi ve bu kombinasyon değerlendirme dışı bırakıldı. s/T PSA + miR-125b-5p kombinasyonu ve s/T PSA + miR-125b-5p + miR-194-5p kombinasyonlarının AUC'leri çok daha düşük düzeylerdeydi (sırasıyla; 0.626 ve 0.532). Bu sonuçlara göre; miR-125b-5p ve miR-194-5p ekspresyonları tek başlarına s/T PSA'dan daha yüksek tanısal güce sahiptir denebilir.

Literatürde miR-125b (yeni isimlendirmede miR-125b-5p) ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır; bazı yayınlarda onkomir olduğu ve prostat kanserlilerde ekspresyonunun arttığı bulunurken, bazı çalışmalarda ise azaldığı raporlanmıştır^{26, 195, 196, 203, 209, 210}. Mitchell ve arkadaşları 25 metastatik prostat kanserli ve 25 kontrol hastasının serum örneklerinden qRT-PCR yöntemi ile miRNA ekspresyonlarını karşılaştırmışlar ve kanserli grupta miR-125b ekspresyonunun arttığını raporlamışlardır²³. Özen ve arkadaşları, 10 tane benign ve 16 tane prostat kanserli dokudan 480 miRNA ekspresyonu önce mikroarray ile, sonrasında bazıları seçilerek gerçek zamanlı RT-PCR ile tekrar değerlendirmiş, lokalize prostat kanserli dokuda miR-125b ekspresyonlarının azaldığını görmüşler¹⁹⁵. Çalışmamızda Özen ve arkadaşlarının bulguları ile uyumlu şekilde, Mitchell ve arkadaşlarının sonuçlarından farklı olarak, miR-125b

ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı olmasa da gruplar arası karşılaştırmada kanserli grupta azalmış olarak bulduk.

Malign-benign ayırımı için taramada kullanılacak, PSA'nın tanısal gücünü artıracak ya da tek başına daha güçlü bir belirteç olarak kullanabileceğimiz biyobelirteç bulmayı amaçladığımız bu çalışmada gri zondaki hastalarda s/T PSA + miR-16-5p kombinasyonunun s/T PSA'dan daha iyi tanısal gücü olması önemli bir bulgudur. Ancak dokudaki düzeyleri ile beraber değerlendirileceği daha geniş bir çalışma grubu ile yeni araştırmalar bu verileri değerlendirmek için gereklidir.

Hasta grupları arasında istatistiksel olarak da anlamlı bulunan iki parametre, miR-194-5p ve s/T PSA + miR-203a kombinasyonu, maligniteyi destekleyen belirteçlerdir. Kanserın prognozu hakkında fikir verebileceği, faydalı olabileceğini düşünüyoruz. Bunu desteklemek için kanserin her aşamasından yeterli sayıda katılımcı ile yapılacak ileri araştırmalara ihtiyaç duymaktayız. Ancak PSA'nın >10 ng/mL olduğu durumlarda biyopsi kaçınılmaz olduğu için, tarama amaçlı belirteç kullanımı girişimsel işleme maruziyeti azaltmayacak, tanıya gidişi hızlandırmayacaktır.

miRNA ekspresyon profilleme çalışmalarında; farklı evredeki kanser gruplarının karşılaştırılması, kontrol olarak BPH'lı hasta ya da sağlıklı gönüllülerin alınması, farklı örneklerden izole edilmesi, farklı büyüklükteki popülasyonlardan çalışma yapılması, izolasyon ve ekspresyon değerlendirme yöntemlerinin farklı olması gibi birçok nedenden dolayı çelişkiler olabilmektedir. Küçük popülasyonlarda yapılan çalışmaların geneli ne kadar yansıttığı bilinmeli, iyi bir örneklem grubu seçilmelidir. Sonuçların dağılımının geniş olması ile beraber çelişkili verilerin elde edilmesine sebep olabileceği unutulmamalıdır.

Bizim çalışmamızda miRNA ekspresyonlarını değerlendirmek için çalışma içi global ortalamaya ve gruplar arası karşılaştırmaya göre $\Delta\Delta Ct$ hesaplandı, bunu kat farkı olarak göstermek için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ile artış ya da azalışlar hesaplandı. Ancak gruplar karşılaştırılınca istatistiksel olarak aralarında fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Özellikle hasta-2 grubunun sayısının az olması veri puanının 11'nin altında kalmasına, bu da testin anlamlılığını değerlendirmeyi zorlaştırmasına neden olmaktadır. Ayrıca her hastada her miRNA ekspresyonu

%80 amplifiye olmadığı için hesaplama dahil edilmedi. Bu da gruplar arası farkı değerlendirmede yetersizliğe neden olmaktadır.

Çalışmamızda bahsi geçen eksiler olsa da rahatlıkla elde edilebilen örneklerden çalışılması, çok sayıda örneği birkaç saatlik tek bir PCR işleminden sonra elde edilen verilerle değerlendirebilmek büyük bir avantajdır. Doku eldesi, miRNA'ların izolasyonu, seçilen yöntemin uzun ve zahmetli olması gibi durumlar çalışmanın verimini de etkileyecektir. Erken tanı için kullanılacak tarama amaçlı her türlü analizin kısa, kolay, ucuz olması, örneğin kolay elde edilmesi istenmektedir.

Sonuç olarak, gri zondaki benign prostat hastalığı olanlar ile prostat kanserli hastalar arasında ayırım yaparken miR-16-5p ile s/TPSA oranının birlikte kullanılmasının tek başına T-PSA veya s/T PSA'dan daha değerli olduğunu bulduk. PSA düzeyi >10 ng/mL olduğunda kanserli hastalarda ise farklı miRNA'ların ekspresyonlarında değişiklikler olduğunu gördük.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda;

- ✓ Gruplar arası karşılaştırmada miRNA ekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulamazken,
- ✓ PSA değeri 2-10 ng/mL aralığında olan malign ve benign grup karşılaştırmasında s/T PSA + miR-16-5p kombinasyonunun tanısallık gücünün s/T PSA'dan daha iyi olduğunu,
- ✓ PSA değeri >10 ng/mL olan malign hasta grubundaki miR-194-5p ekspresyonunda bulduğumuz azalmanın prostat malignitesi varlığını desteklediğini, prognozla ilişkili olabileceğini,
- ✓ PSA düzeyi >10 ng/mL olan malign hasta ile PSA değeri 2-10 ng/mL aralığında olan benign grup karşılaştırmasında ise; miR-125-5p ve miR-194-5p ekspresyonlarındaki azalmanın malignite lehine olduğu, s/T PSA'dan daha iyi şekilde bu ayrımı yapabildiğini bulduk.

Son olarak, daha geniş ve evrelerine göre gruplandırılmış populasyonlarla planlanacak araştırmalarda miRNA ekspresyon profillerinin çalışılmasının prostat kanseri erken tanısında miRNA'ların kullanılabilmesini sağlayacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
2. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *The Lancet* 2003; 361: 859-864.
3. Reiter RE, deKernion JB. Epidemiology, Etiology, and Prevention of Prostate Cancer. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (eds). *Campbell's Urology, Volume 4. 8th ed.* Philadelphia, London New York, St. Louis, Sydney, Toronto. Saunders 2002; 3003-3024.
4. Baltacı S. Prostat Kanseri. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. *Temel Üroloji. 3. Baskı.* Ankara: Öncü Basımevi, 2007: 740-765.
5. Smith RA, Mettlin CJ, Davis KJ, Eyre H. American Cancer Society Guidelines for the early detection of cancer. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 34-49.
6. Carroll P, Coley C, McLeod D, et al. Prostate specific antigen best practice policy. Part I. Early detection and diagnosis of prostate cancer. *Urology* 2001; 57: 217-224.
7. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: Results of a multicenter clinical trial of 6630 men. *J Urol* 1994; 151: 1283-1290.
8. Alkibay T, Gürocak S. Tümör immünolojisi ve tümör belirleyiciler. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. *Temel Üroloji. 3. Baskı.* Ankara: Öncü Basımevi, 2007: 687-698.
9. Stenman UH. Prostate-specific antigen, clinical use and staging: an overview. *Br J Urol, suppl.* 1997; 79: 53.
10. Deliveliotis C, Alivizatos G, Stavropoulos N, et al. Influence of digital examination, cystoscopy, transrectal ultrasonography and needle

- biopsy on the concentration of prostate specific antigen. *Urol Int* 1994; 53: 186-190.
11. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE* 2007; 367: re1.
 12. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-854.
 13. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011; 12(2): 99-110.
 14. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(9): 2999-3004.
 15. Kong W, Zhao JJ, He L, Cheng JQ. Strategies for profiling microRNA expression. *J Cell Physiol* 2009; 218: 22-25.
 16. Blenkiron C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet* 2007; 16: R106-113.
 17. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer* 2008; 122: 969-977.
 18. Nelson PT, Baldwin DA, Scarce LM, et al. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods* 2004; 1: 155-161.
 19. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA* 2007; 13: 1668-1674.
 20. Li J, Smyth P, Flavin R, et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol* 2007; 7: 36.
 21. Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, et al. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr Pathol* 2007; 18: 163-173.

22. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, et al. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 2008; 10: 203-211.
23. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating micro-RNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 10513-10518.
24. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 2006; 5: 24.
25. Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, et al. Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer. *Prostate* 2008; 68: 1152–1164.
26. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, et al. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 6130-6135.
27. Hinman F Jr. *Atlas of Urosurgical Anatomy*, Philadelphia, WB Saunders Co, 1993.
28. McNeal JE. The prostate and prostatic urethra: A morphologic study. *J Urol* 1972; 107: 1008-1016.
29. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96.
30. Epstein JI. The Lower Urinary Tract and Male Genital System. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th edition, Philadelphia, Pennsylvania. Elsevier Saunders Company 2005; 1023-1058.
31. Epstein JI. The Prostate and Seminal Vesicles. Carter D, Reuter VE, Greenson JK, Stoler MH, Oberman HA (eds). *Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology, Volume 2*. Fourth ed. Philadelphia, Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins 2004; 2083-2132.
32. Pfau A. A continuing enigma. *Urologic Clinics of North America* 1986; 13: 695.

33. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, et al. Detection of organ confined prostate cancer is increased through prostate specific antigen based screening. JAMA 1993; 270: 948-954.
34. Huland H. The risk outweigh the benefits of radical prostatectomy in localised prostate cancer: The argument against. Eur Urol 1996; 29: 31-33.
35. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2001. CA Cancer J Clin 2001; 51: 15-36.
36. Littrup PJ, Kane RA, Mettlin CJ, et al. Cost-effective prostate cancer detection. Cancer 1994; 74: 3146-3158.
37. Stone NN, DeAntoni EP, Crawford ED. Screening for prostate cancer by digital rectal examination and prostate specific antigen: Results of prostate cancer awareness week, 1989-1992. Urology 1994; 44: 18-25.
38. Bangma CH, Kramse R, Blijenberg BG, Schroeder FH. The value of screening tests in the detection of prostate cancer: Part I. Results of a retrospective evaluation of 1726 men. Urology 1995; 46: 773-778.
39. Bergstralh EJ, Roberts RO, Farmer SA, et al. Population-based case-control study of PSA and DRE screening on prostate cancer mortality. Urology 2007; 70(5): 936-941.
40. Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL Jr, et al. Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. J Urol 1990; 143(6): 1146-1152.
41. Tuncel A, Ağraş K, Aslan Y ve ark. Transrektal prostat iğne biyopsisi sonrasında prostat kanseri saptanmayan ve saptanan hastaların verilerinin analizi: retrospektif bir alışma. Turk J Urol 2004; 30(2): 148-154.
42. Altunoluk B, Bahar MB, Eren M ve ark. Prostat kanseri tanısında prostat spesifik antijen ve parmakla rektal muayene bulgularının rolünün değerlendirilmesi. JCEI 2012; 3(1): 66-70.

43. Makarov DV, Loeb S, Magheli A, et al. Significance of preoperative PSA velocity in men with low serum PSA and normal DRE. *World J Urol* 2011; 29(1): 11-14.
44. di Sant'Agnese PA. Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Hum Patol* 1992; 23: 287-296.
45. Ablin RJ, Soanes WA, Bronson P, Witebsky E. Precipitating antigens of the normal human prostate. *J Reprod Fertil* 1970; 22: 573.
46. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979; 17: 159.
47. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res* 1980; 40: 2428.
48. Partin AW, Oesterling JE. The clinical usefulness of prostate specific antigen: update 1994. *J Urol* 1994; 152: 1358.
49. Pollen JJ, Dreilinger A. Immunohistochemical identification of prostatic acid phosphatase and prostate specific antigen in female periurethral glands. *Urology* 1984; 23: 303.
50. Balk SP, Ko YJ, Bublely GJ. Biology of prostate specific antigen. *J Clin Oncol* 2003; 21(2): 383-391.
51. Gretzer MB, Partin AW. PSA markers in prostate cancer detection. *Urol Clin North Am* 2003; 30(4): 677-686.
52. Mikolajczyk SD, Song Y, Wong JR, et al. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? *Clin Biochem* 2004; 37(7): 519-528.
53. Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, et al. Expression of pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. *Cancer Res.* 1997; 57: 3111–3114.
54. Sokoll LJ, Chan DW, Mikolajczyk SD, et al. Proenzyme psa for the early detection of prostate cancer in the 2.5–4.0 ng/ml total psa range: Preliminary analysis. *Urology* 2003; 61: 274–276.
55. Sözen S, Gürocak S, Acar C. Prostat kanseri tanısında PSA alt tipleri. *Üroonkoloji Bülteni.* 2004; 4: 13-18.

56. Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J Urol* 1995; 154: 407.
57. Tchetgen MB, Song JT, Strawderman M, et al. Ejaculation increases the serum prostate specific antigen concentrations. *Urology* 1997; 47: 511-516.
58. Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ. Effect of ejaculation on serum total and free prostate specific antigen concentrations. *Urology* 1997; 50: 239-243.
59. Dalton DL. Elevated serum prostate specific antigen due to acute bacterial prostatitis. *Urology* 1989; 33: 465.
60. Semjonow A, Roth S, Hamm M, Rathert P. RE: nontraumatic elevation of prostate specific antigen following cardiac surgery and ekstrakorporeal cardiopulmonary by-pass. *J Urol* 1995; 155: 295.
61. Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, et al. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest* 1987; 80: 281-285.
62. Lilja H, Abrahamsson PA. Three predominant proteins secreted by the human prostate gland. *Prostate* 1998; 12: 29-38.
63. Chybowski FM, Bergstralh EJ, Oesterling JE. The effect of digital rectal examination on the serum prostate specific antigen concentration: results of a randomized study. *J Urol* 1992; 148: 83-86.
64. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, et al. Serum PSA in a community based population of healthy men: Establishment of age reference ranges. *JAMA* 1993; 270: 860-864.
65. Tefik T, Şanlı Ö, Esen T. Klinik pratikte prostat biyopsi endikasyonu için PSA'nın kullanımı. Baltacı S. *Ürolojide Yeni Ufuklar*. Ankara: Ayrıntı Basımevi, 2010: 19-32.
66. Carter HB, Ferruci L, Kettermann A, et al. Detection of life-threatening prostate cancer with prostate specific antigen velocity during a window of curability. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1521-1527.

67. Benson MC, Whang IS, Olsson CA, et al. Use of prostate specific antigen density to enhance predictive value of intermediate levels of serum PSA. *J Urol* 1992; 147: 817-821.
68. Catalona WJ, Beiser JA, Smith DS. Serum free PSA and PSA density measurement for predicting cancer in men with prior negative prostatic biopsies. *J Urol* 1997; 158: 2162-2167.
69. Djavan B, Zlotta A, Remzi M, et al. Optimal predictors of prostate cancer on repeat prostate biopsy: a prospective study of 1051 men. *J Uro* 2000; 163: 1144-1148.
70. Catalona WJ, Richie JP, deKernion JB. Comparison of PSA concentration versus PSA density in the early detection of prostate cancer: ROC curves. *J Urol* 1994; 152: 2031-2036.
71. Kalish J, Cooner WH, Graham SD. Serum PSA adjusted for volume of transition zone (PSAT) is more accurate than PSA adjusted for total gland volume (PSAD) in detecting adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 1994; 43: 601.
72. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, et al. A multicenter clinical trial evaluation of free PSA in the differentiation of prostate cancer from benign disease. *J Urol* 1997; 157(2): 111, abstract 434.
73. Lilja H, Haese A, Bjork T, et al. Significance and metabolism of complexed and noncomplexed PSA forms and human kallikrein 2 in clinically localized prostate cancer before and after radical prostatectomy. *J Urol* 1999; 162: 2029-2034.
74. Parsons JK, Brawer MK, Cheli CD, et al. Complexed PSA reduces unnecessary prostate biopsies in the 2,6-4 ng/mL range of total PSA. *BJU Int* 2004; 94: 47-50.
75. Djavan B, Remzi M, Zlotta R, et al. CPSA, CPSAD of total and transitional zone, C/T PSA ratio, f/t PSA ratio, density of total and transition zone PSA: Results of the prospective multicenter European trial. *Urology* 2002; 60: 4-9.
76. Croal BL, Mitchell ID, Dickie A, et al. Complexed PSA and complexed PSA/prostate volume ratio in the diagnosis of prostatic carcinoma. *Clin Chem* 1999; 45: A108.

77. Mitchell ID, Croal BL, Dickie A, et al. A prospective study to evaluate the role of complexed prostate specific antigen ratio for the diagnosis of prostate cancer. *J Urol* 2001; 165: 1549-1553.
78. Devenci K, Çomaklı T, Üstüner F ve ark. Prostat kanseri tanısında total prostat spesifik antijen, kompleks prostat spesifik antijen ve bunların volüm ilişkili formlarının değeri. *Türk Üroloji Dergisi* 2008; 34(4): 407-412.
79. Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006; 11: 441–450.
80. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5848–5856.
81. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(4): 1290-1297.
82. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome* 2006; 17(3): 189-202.
83. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 2005; 353(17): 1793-1801.
84. Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* 2007; 134(9): 1635-1641.
85. Bahadori M. New advances in RNAs. *Arch Iran Med* 2008; 11(4): 435-443
86. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* result in suppression of homologous reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* 1990; 2: 279-289.
87. Alexander R, Krol VD, Lenting PE, et al. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 1988; 333: 866-869.
88. Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in *petunia* flowers: comparison of

- sense vs. antisense constructs and single-copy vs. kompleks T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* 1996; 32(5): 957-973.
89. Jorgensen RA. Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnology* 1990; 8: 340-344.
 90. Guo S, Kempthues KJ. A gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995; 81: 611-620.
 91. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and spesific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806-811.
 92. Karagüzel A, Kalay E, Celep F. RNA interferans (RNAi): gen sessizleştirilmesi ve tedavi edici uygulamaları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 33(1): 41-44.
 93. Shomron N, Levy C. MicroRNA-biogenesis and pre-mRNA splicing crosstalk. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009; Article ID:594678, doi:10.1155/2009/594678.
 94. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419.
 95. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-1910.
 96. Ying SY, Chang CP, Lin SL. Intron-mediated RNA interference, intronic microRNAs, and applications. *Methods Mol Biol* 2010; 629: 205-237.
 97. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, et al. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003; 9: 175-179.
 98. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 17719-17724.
 99. Goodfellow SJ, White RJ. Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth. *Cell Cycle* 2007; 6: 2323-2326.

100. Felton-Edkins ZA, Kenneth NS, Brown TR, et al. Direct regulation of RNA polymerase III transcription by RB, p53 and c-Myc. *Cell Cycle* 2003; 2: 181-184.
101. Scott PH, Cairns CA, Sutcliffe JE, et al. Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry. *J Biol Chem* 2001; 276: 1005-1014.
102. White RJ, Gottlieb TM, Downes CS, Jackson SP. Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 6653-6662.
103. Costanzo G, Camier S, Carlucci P, et al. RNA polymerase III transcription complexes on chromosomal 5S rRNA genes in vivo: TFIIB occupancy and promoter opening. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3166-3178.
104. Young LS, Rivier DH, Sprague KU. Sequences far downstream from the classical tRNA promoter elements bind RNA polymerase III transcription factors. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1382-1392.
105. Besser D, Gotz F, Schulze-Forster K, et al. DNA methylation inhibits transcription by RNA polymerase III of a tRNA gene, but not of a 5S rRNA gene. *FEBS Lett.* 1990; 269: 358-362.
106. Kassavetis GA, Riggs DL, Negri R, et al. Transcription factor IIB generates extended DNA interactions in RNA polymerase III transcription complexes on tRNA genes. *Mol. Cell Biol.* 1989; 9: 2551-2566.
107. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303: 83-86.
108. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 1097-1101.
109. Hess J, Perez-Stable C, Wu GJ, et al. End-to-end transcription of an Alu family repeat. A new type of polymerase-III-dependent terminator and its evolutionary implication. *J Mol Biol* 1985; 184: 7-21.
110. Gu TJ, Yi X, Zhao XW, et al. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. *BMC Genomics* 2009; 10: 563.

111. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004; 23: 4051-4060.
112. Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125: 887-901.
113. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human micro-RNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10: 1957-1966.
114. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432: 235-240.
115. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011–3016.
116. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004; 431: 343-349.
117. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-98.
118. Haase A, Jaskiewicz L, Zhang H, et al. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 2005; 6(10): 961-967.
119. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004; 118: 57–68.
120. Czech B, Zhou R, Erlich Y, et al. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol Cell* 2009; 36: 445-456.
121. Hu HY, Yan Z, Xu Y, et al. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* 2009; 10: 413.
122. Okamura K, Lai EC. Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 673-678.
123. Seitz H, Ghildiyal M, Zamore PD. Argonaute loading improves the 5' precision of both MicroRNAs and their miRNA* strands in flies. *Curr Biol* 2008; 18: 147-151.

124. Packer AN, Xing Y, Harper SQ, et al. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci* 2008; 28: 14341-14346.
125. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404(6775): 293-296.
126. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.
127. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115(2): 199-208.
128. Karginov FV, Conaco C, Xuan Z, et al. Biochemical approach to identifying microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(49): 19291-19296.
129. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, et al. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115(7): 787-798.
130. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297(5589): 2056-2060.
131. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(11): 4034-4039.
132. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 2006; 21(4): 533-542.
133. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005; 309(5740): 1573-1576.
134. Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD. Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell* 2006; 22(4): 553-560.
135. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 1999; 216(2): 671-680.

136. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75(5): 855-862.
137. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(47): 16961-16966.
138. Nissan T, Parker R. Computational analysis of miRNA-mediated repression of translation: implications for models of translation initiation inhibition. *RNA* 2008; 14(8): 1480-1491.
139. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.
140. Xie XH, Lu J, Kulbokas EJ, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005; 434: 338-345.
141. Shyu AB, Wilkinson MF, van Hoof A. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J* 2008; 27: 471-481.
142. Schaefer A, Jung M, Kristiansen G, et al. MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology. *Urol Oncol* 2009; 28: 4–13.
143. Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005; 3: e85.
144. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 102–114.
145. Nana-Sinkam SP, Croce CM. MicroRNA in chronic lymphocytic leukemia: transitioning from laboratory-based investigation to clinical application. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 203: 127-133.
146. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* 2011; 223: 102-115.
147. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009; 4: 199-227.

148. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS* 2007; 115: 1090-1106.
149. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-1159.
150. Yang N, Coukos G, Zhang L. MicroRNA epigenetic alterations in human cancer: one step forward in diagnosis and treatment. *Int J Cancer* 2008; 122: 963-968.
151. Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 87-95.
152. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
153. Baranwal S, Alahari SK. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2009; 126: 1283-1290.
154. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7065-7070.
155. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435(7043): 828-833.
156. Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 2008;133(2):217-222.
157. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 2007; 179(8): 5082-5089.
158. Thai TH, Calado DP, Casola S, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007; 316(5824): 604-608.
159. Cully M, You H, Levine AJ, et al. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(3): 184-192.
160. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and

- stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27(15): 2128-2136.
161. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008; 283(2): 1026-1033.
 162. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133(2): 647-658.
 163. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, et al. miR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(13): 5166-5171.
 164. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(39): 13944-13949.
 165. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15524-15529.
 166. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64(11): 3753-3756.
 167. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866.
 168. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2257-2261.
 169. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-838.
 170. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, et al. MA: Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2007; 67(6): 2456-2468.

171. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 462-469.
172. Saini S, Majid S, Yamamura S, et al. Regulatory role of miR-203 in prostate cancer progression and metastasis. *Clin Cancer Res* 2011; 17(16): 5287-5298. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2619.
173. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, et al. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2009;4: e6229.
174. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer* 2011; 128: 608–616.
175. Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, et al. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate* 2011; 71: 326–331.
176. Chen Z, Zhang G, Li H, et al. A panel of five circulating microRNA as potential biomarkers for prostate cancer. *The Prostate* 2012; 72(13): 1443-52. doi: 10.1002/pros.22495.
177. Moltzahn F, Olshen AB, Baehner L, et al. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic micro-RNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Res* 2010; 71(2): 550–560.
178. Dong Q, Meng P, Wang T, et al. MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. *PLoS One* 2010; 5(4): e10147. doi: 10.1371/journal.pone.0010147.
179. Liu C, Kelnar K, Vlassov AV, et al. Distinct microRNA expression profiles in prostate cancer stem/progenitor cells and tumor-suppressive functions of let-7. *Cancer Res* 2012; 72(13): 3393-3404. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3864.
180. Nadiminty N, Tummala R, Lou W, et al. MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2012; 287(2): 1527-1537.

181. Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. The role of microRNAs in cancer. *Yale J Biol Med* 2006; 79(3-4): 131-140.
182. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, et al. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* 2010; 18(1): 181-187.
183. Gong A, Eischeid AN, Xiao J, et al. miR-17-5p targets the p300/CBP-associated factor and modulates androgen receptor transcriptional activity in cultured prostate cancer cells. *BMC Cancer* 2012; 12: 492. doi: 10.1186/1471-2407-12-492.
184. Li F, Wang Y, Zeller KI, et al. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25: 6225–6234.
185. Hagman Z, Larne O, Edsjö A, et al. miR-34c is downregulated in prostate cancer and exerts tumor suppressive functions. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2768-2776. doi: 10.1002/ijc.25269.
186. Sun D, Lee YS, Malhotra A, et al. miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2011; 71(4): 1313-1324.
187. Xu B, Niu X, Zhang X, et al. miR-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of KRAS. *Mol Cell Biochem* 2011; 350: 207-213.
188. Clape C, Fritz V, Henriquet C, et al. miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PLoS One* 2009; 4: e7542.
189. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105.
190. Suh SO, Chen Y, Zaman MS, et al. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis* 2011; 32(5): 772-778.
191. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, et al. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential

- biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist* 2010; 15: 673–682.
192. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA* 2008; 14: 417-424.
 193. Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, et al. A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nature Cell Biology* 2008; 10: 788–801.
 194. Noonan EJ, Place RF, Pookot D, et al. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene* 2009; 28: 1714–1724.
 195. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 2008; 27: 1788–1793.
 196. Tong AW, Fulgham P, Jay C, et al. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Therapy* 2009; 16(3): 206–216. doi: 10.1038/cgt.2008.77.
 197. Poliseno L, Salmena L, Riccardi L. Identification of the *miR-106b~25* microRNA cluster as a proto-oncogenic *PTEN*-targeting intron that cooperates with its host gene *MCM7* in transformation. *Sci Signal* 2010; 3(117): ra29. doi:10.1126/scisignal.2000594.
 198. Ambis S, Prueitt RL, Yi M, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Research* 2008; 68: 6162–6170.
 199. Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, et al. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology* 2011; 77: 1265 e9–e16.
 200. Wu Z, Sun H, Zeng W, et al. Upregulation of mircoRNA-370 induces proliferation in human prostate cancer cells by downregulating the transcription factor FOXO1. *PLoS One* 2012; 7(9): e45825. doi: 10.1371/journal.pone.0045825.
 201. Emerk K. Hücre büyümesi, farklılaşması ve kanser. Onat T, Emerk K, Sözman EY. İnsan Biyokimyası. 2. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 691-742.

202. Watahiki A, Wang Y, Morris J, et al. MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. *PLoS ONE* 2011; 6(9): e24950. doi:10.1371/journal.pone.0024950.
203. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 126: 1166–1176.
204. Hellwinkel OJC, Sellier C, Sylvester YJ, et al. A cancer-indicative microRNA pattern in normal prostate tissue. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 5239-5249. doi:10.3390/ijms14035239
205. Watahiki A, Macfarlane RJ, Gleave ME, et al. Plasma miRNAs as biomarkers to identify patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Int. J Mol Sci* 2013; 14: 7757-7770. doi:10.3390/ijms14047757
206. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008; 14: 844-852
207. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 2008; 14: 1271-1277.
208. Schaefer A, Jung M, Miller K, et al. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Exp Mol Med* 2010; 42: 749-758.
209. Shi XB, Xue L, Ma AH, et al. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting proapoptotic genes. *Prostate* 2011; 71: 538–549.
210. Szczyrba J, Loprich E, Wach S, et al. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 529–538.

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ L: Mikrolitre

3'-UTR: 3' ucu yazılıma uğramayan bölge (3'-untranslated region)

A2M: α -2 makroglobulin

A2M-PSA: α -2 Makroglobulin Bağlı PSA

ACT: α -1 antikomotripsin (antichymotrypsin)

ACT-PSA: α -1 Antikomotripsin Bağlı PSA

Ago: Argonaute

AMACR: α -methyl-CoA racemase

API: α -1 proteaz inhibitör

API-PSA: α -1 Proteaz İnhibitör Bağlı PSA

BPH: Benign Prostat Hipertrofisi

BPSA: Benign PSA

BT: Bilgisayarlı Tomografi

cDNA: Komplementer DNA (complementary DNA)

CEA: Karsinoembriyonik Antijen (carcinoembryonic antigen)

CI: Güven aralığı (Confidence Interval)

CNRQ: Kalibre normalize göreceli miktarı (Calibrated normalized relative quantity)

cPSA: Bağlı PSA (complexed PSA)

Ct: Döngü zamanı (Cycle time)

DGCR8: Di George syndrome critical region gene 8

DHT: Dihidrotestosteron

DNA: Deoksiribonükleik asit

DNaz: Deoksiribonükleaz

dsRBD: Çift zincirli RNA bağlayıcı bölge (double stranded RNA binding domain)

dsRBP: Çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein (double-stranded RNA binding protein)

dsRNA: Çift zincirli RNA'nın (double-stranded RNA)

DÜSG: Direkt Üriner Sistem Grafisi

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit
GTP: Guanozin trifosfat (Guanosine triphosphate)
hCG: İnsan Koryonik Gonadotropini (human chorionic gonadotropin)
HGPN: Yüksek dereceli PIN (High Grade PIN)
IVP: İntravenöz Pyelogram
iPSA: İntakt PSA
LGPIN: Düşük dereceli PIN (Low Grade PIN)
miRNA: mikroRNA
mL: Mililitre
MRG: Magnetik Rezonans Görüntüleme
mRNA: Mesajcı ribonükleik asit
ORF: Açık okuma çerçevesi (open reading frame)
PAP: Prostatik Asit Fosfataz (Prostatic Acid Phosphatase)
PIN: Prostatik İnterepitelyal Neoplazi
piRNA: piwi-etkileşimli RNA (piwi-interacting RNA)
pol II: RNA polimeraz II
pol III: RNA polimeraz III
pre-miRNA: prekürsör miRNA
pre-mRNA: Prekürsör mRNA
pre-mRNA: prekürsör mRNA
pri-miRNA: primer miRNA
PRM: Parmakla Rektal Muayene
PSA: Prostat Spesifik Antijen
PSAD: PSA dansitesi
PSMA: Prostat Spesifik Membran Antijeni
qRT-PCR: Kantitatif ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)
RISC: RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex)
RNAi: RNA interferansı
RNaz III: Ribonükleaz III
RNaz: Ribonükleazsız
ROC: Alıcı işletim karakteristik (receiver operating characteristic) eğrileri
rpm: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)

rRNA: Ribozomal RNA

s/T PSA: Serbest-total PSA oranı

siRNA: Küçük interfere edici RNA (small interfering RNA)

sPSA: Serbest prostat spesifik antijen

T-PSA: Total prostat spesifik antijen

TRBP: TAR-RNA bağlayıcı protein

tRNA: Taşıyıcı RNA

TRUS: Transrektal Ultrason

TUR: Transüretral rezeksiyon

TZPSAD: Transisyonel zon PSA dansitesi

ŞEKİLLER VE RESİMLER

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Prostatın zonal anatomisi.)	9
Şekil 2 (PSA biyosentezi ve alt tiplerinin oluşumu.)	18
Şekil 3 (mikroRNA biyogenezi.)	28
Şekil 4 (Hasta-1 ile kontrol gruplarında T PSA'nın ROC eğrisi.)	48
Şekil 5 (Hasta-1 ile kontrol gruplarında s/T PSA oranının ROC eğrisi.)	48
Şekil 6 (Hasta-1 ile kontrol gruplarında miR-25-3p veri dağılımının %95 CI'da gösterimi.)	49
Şekil 7 (Hasta-1 ile kontrol gruplarında miR-194-5p veri dağılımının %95 CI'da gösterimi.)	50
Şekil 8 (Hasta-1 ile kontrol gruplarında miR-16-5p ROC eğrisi.)	51
Şekil 9 (Hasta-1 ile kontrol gruplarında s/T PSA + miR-16-5p kombinasyonu ROC eğrisi.)	52
Şekil 10 (Hasta 1 ve hasta-2 gruplarında s/T PSA oranı karşılaştırılmasında ROC eğrisi.)	53
Şekil 11 (Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında miR-25-3p ROC eğrisi.)	55
Şekil 12 (Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında miR-125b-5p ROC eğrisi.)	55
Şekil 13 (Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında miR-194-5p ROC eğrisi.)	56
Şekil 14 (Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında miR-203a ROC eğrisi.)	57
Şekil 15 (Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA + miR-25-3p kombinasyonu ROC eğrisi.)	58
Şekil 16 (Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA + miR-125b-5p kombinasyonu ROC eğrisi.)	58
Şekil 17 (Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA + miR-194-5p kombinasyonu ROC eğrisi.)	59

Şekil 18 (Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA + miR-203a kombinasyonu ROC eğrisi.)	59
Şekil 19 (Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında s/T PSA + miR-25-3p + miR-125b-5p + miR-194-5p + miR-203a kombinasyonu ROC eğrisi.)	60
Şekil 20 (Hasta-2 ile kontrol gruplarında s/T PSA oranı ROC eğrisi.)	61
Şekil 21 (Hasta-2 ile kontrol gruplarında miR-125b-5p ROC eğrisi.)	62
Şekil 22 (Hasta-2 ile kontrol gruplarında miR-194-5p ROC eğrisi.)	63
Şekil 23 (Hasta-2 ile kontrol gruplarında s/T PSA + miR-125b-5p kombinasyonu ROC eğrisi.)	64
Şekil 24 (Hasta-2 ile kontrol gruplarında s/T PSA + miR-125b-5p + miR-194-5p kombinasyonu ROC eğrisi.)	64

TABLULAR

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (Yaş ve ırkla PSA'nın ilişkisi.)	21
Tablo 2 (cDNA için reaktif karışımı hazırlanması.)	39
Tablo 3 (cDNA termal program protokolü.)	40
Tablo 4 (PCR karışımı hazırlanması.)	41
Tablo 5 (Pre-amplifikasyon termal program protokolü.)	42
Tablo 6 (Örnekler için PCR karışımının hazırlanması.)	43
Tablo 7 (Kontrol ve hasta gruplarına ait tanımlayıcı bilgiler.)	47
Tablo 8 (Hasta-1 ile kontrol gruplarında, ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı görülen miRNA'lar.)	51
Tablo 9 (Hasta-1 ile kontrol grup karşılaştırmasında, ROC eğrileri çizilen parametrelerin verileri.)	52
Tablo 10 (Hasta-2 ile hasta-1 gruplarında, ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı görülen miRNA'lar.)	54
Tablo 11 (Hasta-2 ile hasta-1 grup karşılaştırmasında, ROC eğrileri çizilen parametrelerin verileri.)	60
Tablo 12 (Hasta-2 ile kontrol gruplarında ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı görülen miRNA'lar.)	62
Tablo 13 (Hasta-2 ile kontrol grup karşılaştırmasında, ROC eğrileri çizilen parametrelerin verileri.)	65