

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MESANE KANSERLİ HASTALARIN SERBEST DNA'LARINDA
BULUNAN BAZI GENLERDEKİ TEK NÜKLEOTİT
POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

Soner BAYDENİZ

Danışman: Doç. Dr. Mehmet GÜRBÜZEL

BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI

ERZİNCAN
2019

Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Doç. Dr. Mehmet GÜRBÜZEL danışmanlığında, Soner BAYDENİZ tarafından hazırlanan bu çalışma 18 / 01 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Mehmet GÜRBÜZEL

İmza: 

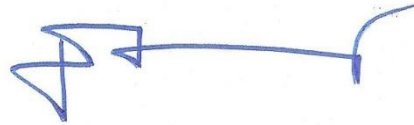
Üye : Doç. Dr. İlyas SAYAR

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza: 

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun 21 / 02 / 2019 tarih ve 9 / 13 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mustafa Fatih ERTUGAY
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etięe Uygunluk Sayfası

“Mesane Kanserli Hastaların Serbest DNA’larında Bulunan Bazı Genlerdeki Tek Nükleotit Polimorfizminin Belirlenmesi” isimli “Yüksek Lisans” tezimi tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 18/01/2019


Soner BAYDENİZ

ÖZET

Yüksek Lisans

MESANE KANSERLİ HASTALARIN SERBEST DNA'LARINDA BULUNAN BAZI GENLERDEKİ TEK NÜKLEOTİT POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

Soner BAYDENİZ

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet GÜRBÜZEL

Bu çalışmada, invazif yöntemlere kıyasla maliyet, uygulanabilirlik ve hızlı sonuç verebilme gibi sağladığı avantajlarla bir kanser biyobelirteci olarak kullanılan serbest DNA'nın mesane kanserli hastalardaki seviyesi hem fotometrik hem de florometrik ölçümlerle belirlenmiş; bu DNA'nın tek nükleotit polimorfizminin belirlenmesinde yeterlilik sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır. Gen isimleri ve polimorfizmin beklendiği lokasyonun referans numaraları şu şekildedir: *CCAT2* (rs6983267), *HRAS* (rs126289), *MIR146A* (rs2910164) ve *RET* (rs1799939). Elde edilen genel bulgular, serbest DNA ölçümlerinin hassasiyeti dikkate alındığında, florometrik ölçümlerin daha avantajlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca serbest DNA hızla muameleye tabi tutulduğunda, SNP çalışmasına bile olanak tanıyacak yeterlilikte olduğu ve bunun serbest DNA'nın kalitesinin gösterilmesi açısından önemli bir veri olabileceği sonucu da çıkarılmıştır.

2019, 71 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Mesane kanseri, Serbest DNA, Tek nükleotit polimorfizmi

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMOPHISM OF SOME GENES IN FREE DNAS OF THE PATIENTS WITH BLADDER CANCER

Soner BAYDENİZ

Erzincan Binali Yıldırım University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet GÜRBÜZEL

In this study, the levels of free DNA used as a cancer biomarker through the advantages it provided such as cost, applicability and quick results, when compared to invasive methods, were determined with both photometric and fluorometric measurements in bladder cancer patients; and, whether this DNA provided competence in determining the single nucleotide polymorphism (SNP) was also investigated. Gene names and reference numbers of the location where the polymorphism was expected were as such: CCAT2 (rs6983267), HRAS (rs126289), MIR146A (rs2910164) and RET (rs1799939). The general findings obtained indicated that fluorometric measurements were more advantageous considering the sensitivity of free DNA measurements. In addition, when it was treated quickly, it was found that free DNA was even sufficient to allow SNP working. This result could be a remarkable data due to indicating the quality of free DNA.

2019, 71 Pages

Keywords: Bladder cancer, Free DNA, Single nucleotide polymorphism

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde, SAG-A-140613-0020 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi'nin (BAP) kısmi desteğiyle yapılmıştır.

Yüksek Lisans eğitimime başladığım günden beri, tüm bilgi ve birikimini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her konuda desteğini eksik etmeyen, saygıdeğer Hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet GÜRBÜZEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Kan numunelerinin elde edilmesi ve verilerin toplanmasında verdikleri desteklerden dolayı Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. İlyas SAYAR'a ve Üroloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyelerinden Dr. Öğretim Üyesi Aliseydi BOZKURT'a teşekkür ederim.

Çalışmanın DNA kantifikasyonu Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (YÜTAM)'da gerçekleştirilmiştir. Değerli desteklerinden dolayı Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye ve Dr. Öğretim Üyesi Ayşenur YAZICI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada elde edilen verilerin analizinde yardımlarını esirgemeyen Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Ana Bilim Dalı'ndan Arş. Gör. Yusuf Kemal ARSLAN'a teşekkür ederim.

Hayatımdaki en değerli varlığım olan aileme şükranlarımı sunarım. Ayrıca her zaman yanımda olan, hiçbir zaman sevgi ve desteğini esirgemeyen eşim Merve'ye sonsuz teşekkürler.

Soner BAYDENİZ

Ocak, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Çalışma etiği.....	34
3.1.2. Örneklerin elde edilmesi.....	34
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. DNA izolasyonu.....	35
3.2.2. DNA miktarının hesaplanması.....	36
3.2.3. SNP analizi.....	36
3.2.4. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi.....	39
4. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	40
4.1. Sonuç.....	40
4.2. Tartışma.....	51
KAYNAKLAR.....	59
EKLER.....	71
Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 4.1. Gruplara ait ssDNA miktarının grafiksel gösterimi..... 41
- Şekil 4.2. Gruplara ait dsDNA miktarının grafiksel gösterimi42
- Şekil 4.3. Gruplara ait tDNA miktarının (ssDNA+dsDNA) grafiksel gösterimi..... 43
- Şekil 4.4. Gruplara ait toplam fotometrik serbest DNA miktarının grafiksel gösterimi. 43



TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Allel-boya etkileşim örneği	37
Tablo 3.2. Reaksiyon bileşen ve miktarları.....	38
Tablo 3.3. Uygulanan termal koşulların sıcaklık, zaman ve devir bilgileri	38
Tablo 3.4. Flüoresan sinyaller ve örnek sekans arasındaki korelasyon	39
Tablo 4.1. Kontrol, ameliyat öncesi ve sonrasında alınan numunelerdeki DNA miktarlarına ait tanımlayıcı istatistikler	40
Tablo 4.2. <i>CCAT2</i> (rs6983267) geninde kaydedilen tek nokta polimorfizmi.....	45
Tablo 4.3. <i>HRAS</i> (rs12628) geninde kaydedilen tek nokta polimorfizmi	46
Tablo 4.4. <i>MIR146A</i> (rs2910164) geninde kaydedilen tek nokta polimorfizmi	48
Tablo 4.5. <i>RET</i> (rs1799939) geninde kaydedilen tek nokta polimorfizmi.....	50

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
A	Adenin Bazı
C	Sitozin Bazı
G	Guanin Bazı
H^+	Hidrojen iyonu
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OR	Olasılık Oranı
p	P Değeri
T	Timin Bazı

Kısaltmalar

BPH	Benign Prostat Hiperplazisi
CEA	Karsinoembriyonik Antijen
DNA	Deoksiribonükleik Asit
NET	Nötrofil Ekstraselüler Tuzaklar
NGS	Yeni Nesil Sekans Paneli
PCa	Prostat Kanseri
PCR	Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PRE-OP	Ameliyattan Önce

POST-OP 1	Ameliyattan Hemen Sonra
POST-OP 2	Ameliyattan Bir Ay Sonra
RNA	Ribonükleik Asit
rt-PCR	Real Time PCR
q-PCR	Quantitative PCR – Kantitatif PCR
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi
UV	Ultraviyole



1. GİRİŞ

Nükleik asitler, hücredeki bütün biyolojik gelişmelerin devamı için gerekli olan, kalıtsal bilginin oluşumu, saklanması ve bu bilginin işlenip ürün elde edilmesi süreçlerinde rol oynayan biyomoleküllerdir. Bu moleküller başlıca DNA (Deoksiribonükleik asit) ve RNA (Ribonükleik asit) olarak organize olmuşlardır. Her iki molekül de 4 farklı nükleotitten oluşan polinükleotit zincirine sahiptir. Nükleosit yapısı ise azot ve karbon içeren halkasal yapıya sahip pürin ve pirimidin bazları ile bu bazlara glikozidik bağlarla bağlanan 5 karbonlu pentoz şekerlerinden oluşur. Glikozidik bağ, pentoz şekerinin 1 karbonu ile pürin bazlarının 9'uncu veya pirimidin bazlarının 1'inci azotu arasında kurulur. Adenin ve Guanin'den oluşan pürin bazları çift halkasına sahipken; pirimidinler ise tek halka yapılı Timin, Sitozin ve Urasil bazlardır. Adenin, Guanin ve Sitozin hem DNA'nın hem de RNA'nın yapısına katılır. Timin sadece DNA'da, Urasil ise sadece RNA'da bulunur. DNA'nın yapısında Deoksiriboz, RNA'da ise Riboz şekeri vardır. Riboz şekeri, yapısında Deoksiribozdan farklı olarak 2' pozisyonunda 1 oksijen atomu taşımaktadır. Nükleosite fosfodiester bağı aracılığıyla bir fosfat molekülü olan fosforik asit'in (H_3PO_4) bağlanmasıyla nükleotit yapısı oluşur. Bu bağ, fosfat molekülünün komşu pentoz şekerinin 5' pozisyonundaki karbon atomuyla bağlanmasıyla gerçekleşir. Ayrıca, yine fosfat molekülü komşu nükleositin yapısında bulunan pentoz şekerinin 3' pozisyonundaki karbon atomuyla fosfodiester bağı kurarak polinükleotit zincirinin oluşumunu sağlar. Nükleotitlerin yapısındaki fosfat gruplarından hidrojen iyonlarının (H^+) ayrılması ile polinükleotit yapının dış kısmındaki fosfat – şeker omurgası negatif yüklü ve hidrofilik karakter kazanır. Böylece polinükleotit zinciri asidik özellik kazanmış olur.

Nükleik asitlerin keşfi ilk olarak Johann Friedrich Miescher'in yapmış olduğu çalışmalar sonucu gerçekleşmiştir. Bu çalışmalarda protein ve yağların hücre stoplazmasının başlıca bileşenleri olduğunu göstermiş; bulunduğu zamanın elverdiği koşullarda bu moleküllerin özelliklerini belirlemeye ve sınıflandırmasını yapmaya çalışmıştır. Miescher, 1869 yılında hücre nükleusunda protein gibi organik bir bileşik olan ancak yapısında sülfür yerine bol miktarda fosfor içeren bir maddenin varlığını keşfetmiş ve bu maddenin nükleusta bulunmasından dolayı "nüklein" olarak isimlendirmiştir. Walther Flemming, 1882 yılında kromozomları tanımlamış ve ilk defa hücre bölünmesi esnasında kromozom davranışlarını incelemiştir. Oscar Hertwig ve

arkadaşları (1884-1885) nükleus içeriğinin kalıtımda temel role sahip olduğunu göstermişlerdir. Theodor Boveri ve Walter Sutton (1902) kalıtım birimlerinin kromozomlar üzerinde olabileceğini beyan etmişlerdir. Frederick Griffith (1928) *Streptococcus pneumoniae* suşları üzerinde yaptığı çalışmada transformasyonun varlığını keşfetmiştir. Phoebus Levene (1929) DNA'nın tetranükleotit yapılı olduğunu; adenin, guanin, sitozin ve timin bazlarının birbiri ardına sıralanmış olduğunu bildirmiştir. George Beadle ve Edward Tatum 1941 yılında, her genin bir enzim üretiminde sorumlu olduğunu göstermişlerdir. 1944 yılında Oswald T. Avery, Colin MacLeod ve Maclyn McCarty, transformasyon işlemi esnasında genetiksel aktarımın proteinler ile değil, DNA ile yapıldığını göstermişlerdir. Bu bulgu, Alfred Hershey ve Martha Chase (1952) T2 bakteriyofajında yaptıkları çalışmada kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, viral enfeksiyon esnasında sadece T2 fajı DNA'sının bakteri stoplazmasına aktarıldığı, bakteri hücrelerine viral protein girişinin olmadığı görülmüştür. Erwin Chargaff (1949-1950) DNA yapısında adenin sayısının timine, sitozin sayısının ise guanine eşit olduğunu saptamıştır. Rosalind Franklin ve Maurice Wilkins (1953) X ışınlarını kullanarak DNA'nın düzenli tekrarlı helikal yapıda olduğunu göstermişlerdir. James Watson ve Francis Crick 1953 yılında Nature dergisinde yayımlanan "The Double Helix" isimli çalışmada, DNA'nın çift sarmal yapıda olduğunu; Adenin bazına karşılık Timin bazının, Sitozin bazına karşılık ise Guanin'in geldiğini ileri sürmüşlerdir. Watson-Crick modeli günümüzde kabul edilen DNA modelidir. Arthur Kornberg'in (1956) DNA polimeraz enziminin DNA replikasyonundaki rolünü keşfetmesinden sonra Crick, Moleküler Biyoloji ve Genetik'de en temel mekanizmalardan biri olan Sentral Dogma'nın akışını açıklamıştır (Dahm vd., 2005).

Ökartotik hücrelerde, DNA materyali nükleus, mitokondri ve kloroplast'da bulunmaktadır. Bu hücre tipinde nükleus zar yapısıyla stoplazmadan izole olmuştur. Nükleus içerisinde DNA ve protein moleküllerinin birleşimiyle oluşmuş ve sayısı organizmadan organizmaya değişebilen kromatin denilen yapılar bulunmaktadır. Kromatinler, mitoz bölünmenin profaz safhasında kısalıp kalınlaşarak veya başka bir ifadeyle sıkı şekilde paketlenerek kromozomlara dönüşürler. Böylece kromatin yapısı yaklaşık olarak 10.000 kat küçülerek mitoz bölünme için organize bir yapı kazanmaktadır.

Mitoz bölünmenin sentez safhasında kromatini oluşturan DNA zinciri replikasyon ile kendini eşleyerek çift zincirli bir yapıya dönüşür. Yine bu safhada üretilen, yapısında pozitif yüklü arjinin ve lizin aminoasidi bol miktarda ihtiva eden histon proteinleri kromatin yapısında önemli rol oynamaktadır. DNA'nın fosfat-şeker omurgasındaki fosfatın negatif yüklü olduğu bilinmektedir. Histon proteinleri pozitif yüke sahip olduğundan fosfatlara bağlanırlar. Histon proteinlerinin dışında başka proteinler de bu yapıda geçici veya kalıcı şekilde bulunabilir. Kromatinin temel birimini oluşturan DNA ve histon proteini birlikteliğine nükleozom denir. Histon proteinleri H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olarak sınıflandırılır. İkişer adet H2A-H2B ve H3-H4 dimer yapıların birleşimi ile (H2A-H2B)₂ ve (H3-H4)₂ tetramerleri oluşturulur. Bu tetramerlerin birleşimi ile histon proteinlerinin oluşturduğu oktamer çekirdek yapısı meydana gelir. Bu çekirdeğin etrafında 146 bazın olduğu tahmin edilmektedir. Oktamer yapısındaki histon proteinleri ve birlikteliğin etrafında yaklaşık olarak 1,65 defa döngü yapan DNA, nükleozom çekirdek partikülünü (nucleosome core particle) oluşturur. Bu arada H1 tipi histon proteini ise etrafında dolanan DNA ipliğini bağlayıcı rol üstlenmektedir.

Kromatin yapısı izotonik ortamda gevşeyerek, 30 nm'lik fibril yapısına dönüşmektedir. 30 nm'lik fibril yapısı, DNA molekülü gibi çift iplikçikten oluşmaktadır. Yapıda bulunan nükleozomlar üst üste istiflenerek iplikçikleri oluştururlar. Oluşan sarmal DNA'nın aksine sol el sarmal yapısındadır. Son yıllarda interfaz hücrelerinde farklı floresan etiketli proplarla yapılan in situ hibridizasyon çalışmalarında, 30 nm'lik fibril yapısının histon olmayan proteinlerden oluşan iskeleler üzerinde büyük ilmekler oluşturarak organize olduklarını göstermektedir. Mitoz bölünmenin erken profaz aşamasında, kromatinlerin yoğunlaşp kromozomları oluşturdukları aşamada, 30 nm'lik fibril yapısının katlanarak kromonema fibrili denilen 100-130 nm'lik fibrillere dönüşür. Daha sonra da kromonema fibrili de katlanarak 200-250 nm'lik orta profaz kromatidini, metafaz aşamasında ise orta profaz kromatidi daha sıkı bir şekilde paketlenerek 500-750 nm çaplı metafaz kromatidini oluşturur. Metafaz kromozomları bu uygunluğu nedeniyle sitogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılır (Lodish vd., 2011).

Serbest DNA, kan dokusunda dolaşan serbest DNA parçacıklarıdır. Literatürde, "Free circulating DNA (FCDNA)", "Circulating Free DNA (CFDNA)", "Cell Free DNA" ve "non-encapsulated DNA" gibi terimler ile nitelendirilmektedir. Kan akışındaki bu DNA'nın olağan bir şekilde hücre senesensi, apoptosis ve nekroz gibi mekanizmalarla

yıkıma uğrayan hücrelerinden kalan DNA parçacıkları olduğu kabul edilmektedir. Yarılanma ömrü yaklaşık olarak iki saat olan ve makrofajlar tarafından yıkıma uğrayan bu parçacıkların, genel olarak kanser vakalarında miktarının arttığı varsayılmaktadır (Sorenson vd., 1994).

Kan plazmasında serbest DNA'nın varlığı ilk olarak Mandel ve Metais (1948) tarafından ortaya atılmıştır. Daha sonraki yıllarda serbest DNA'nın nasıl türediği ile ilgili araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bendich vd. (1965) serbest DNA'nın metaztaz sonucunda oluşmuş olabileceğini iddia etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada Tan vd. (1966) lupus hastalarında (sistemik lupus eritematozus, kelebek hastalığı) serbest DNA miktarının normal bireylere göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada da romatoid artrit, lösemi, kronik glomerülonefrit, lupus ve kanser gibi değişik hastalık tiplerinde serumda tek zincirli serbest DNA'nın miktarı belirlenmeye çalışılmıştır (Koffler vd., 1973). Radyoimmünolojik yöntemler kullanarak yapılan bir araştırmada, metastatik kanser hastalarının serumlarındaki serbest DNA'nın normal bireylere göre yüksek olduğu gösterilmiştir (Leon vd., 1977). Benzer bulgular kanser hastalarını konu alan başka çalışmalarda da görülmüştür (Stroun vd., 1987; 1989). Serbest DNA'nın kantifikasyonunu konu alan çalışmaların da yanında, izole edilen serbest DNA kullanılarak kanser belirteçlerinin de tarandığı çalışmalar mevcuttur. Vasioukhin vd. (1994) yılında yapmış oldukları çalışma bu konudaki öncü çalışmalardan birisidir. Bu çalışmada miyelodisplastik sendromu ve akut myelojenik lösemi hastalarında serbest DNA'yı izole ederek *N-RAS* geni nokta mutasyonu taranmıştır. Benzer bir çalışmada pankreatik karsinom ve kistik fibrosis hastalarında *K-RAS* geni mutasyonu taranmıştır (Sorenson vd., 1994). PCR (Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli mikrosatellit analiz yöntemi ile baş ve boyun skuamöz hücre karsinomlu hastaların plazma örneklerindeki serbest DNA taranarak mikrosatellit değişikliğinin varlığı belirlenmeye çalışılmıştır (Nawroz vd., 1996). Başka bir çalışmada ise küçük hücreli akciğer kanserli hastalarda mikrosatellit değişikliği araştırılmıştır. Mikrosatellit kararsızlığının birçok tümör tipinin karakteristiği olduğu göz önüne alındığında yapıldığı dönemde bu çalışmaların dikkat çekici olduğu görülmektedir (Chen vd., 1996).

Serbest DNA üzerinde yapılan en önemli çalışmalardan birisi Lo vd. (1997) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada fetal DNA'nın anneye ait serum ve plazmada serbest DNA

içerisinde var olup olmadığı araştırılmıştır. Erkek fetüse hamile kadınlardan elde edilen numunelerde Y kromozomuna spesifik sekanslar tarandığında fetal DNA'nın hem serum hem de plazmada varlığı keşfedilmiştir. Bu bulgu invazyon olmadan prenatal diagnoz için serbest DNA'nın kullanabileceğine işaret etmektedir. Günümüzde klinik düzeyde prenatal diagnozda serbest DNA'nın kullanımına rastlanmakta ve geçerliliği ile ilgili tartışma ve araştırmalar devam etmektedir.

Günümüzde invazyon yapılmadan serum veya plazmadan elde edilen serbest DNA'nın birçok kanser başta olmak üzere genetiksel birçok hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılmaya başlandığı ve bu konudaki araştırmaların süratle devam ettiği bilinmektedir. "Likit biyopsi" olarak adlandırılan yöntemle kan numunelerinin hastadan alındıktan hemen sonra kan hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla santrifüj işlemlerinden geçirilmesi, tümörlü dokudan apoptozis veya nekroz sonucu türeyen DNA'yı da içeren plazma veya serumdaki serbest DNA'nın izole edilmesi ve genetik tümör belirteçleri ile kliniğe tanı için bilgi ediniminin sağlanması amaçlanmaktadır (Volik vd., 2016).

Böbrekte yapılan idrar, üreter aracılığıyla düzensiz ve birbiriyle sıkı bir şekilde bağlanan kas dokularından oluşmuş ve esnek bir yapıya sahip depolama organı olan mesaneye taşınır. Boşaltım sisteminde en sık malignant tümör vakaları mesanede çıkmakta ve mesane kanseri prevalansı gün geçtikçe artmaktadır. Bu hastalık kadınlardan ziyade erkeklerde görülmektedir. 2010 yılında yayınlanan bir çalışmada dünyada yılda mesane kanseri teşhisi konulan kişi sayısının 380.000, bu hastalık nedeniyle hayatını kaybedenlerin ise 150.000 civarında olduğu belirtilmiştir (Ferlay vd., 2010). Mesane kanseri DNA hasarı oluşturan sigara başta olmak üzere, aromatik amin içeren boya, 4-nitrobenzil, 4-aminobenzil, benzidin gibi yakıt ürünleri, mineraller, doğrama, yağlama, asfalt, plastik, kaynak maddeleri, içme suyundaki inorganik arsenik, nitrat ve trihalometan gibi klorlama yan ürünleri gibi kimyasal maddelerin etkisiyle ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca N-nitrozo bileşikler, heterosiklik aminler, 4-aminobifenil MX gibi maddeleri içeren işlenmiş gıdalar, hayvansal yağlar, siklofosfamid ve fenasetin gibi ilaçlar da mesane kanseri için indükleyici olabildikleri bilinmektedir (Jankovic ve Radosavljevic, 2007).

Günümüzde mesane kanserinin teşhisinde en sıklıkla kullanılan yöntem invazif ve pahalı olan sistoskopidir. Bu yöntemde hekim tarafından sistoskop adı verilen optik bir

aletle mesanenin iç kısmı gözlem yoluyla taranır. İdrar sitolojisi ise özellikle düşük dereceli hastalıkta sınırlı bir değere sahiptir. Son yıllarda mesane kanserinin teşhisinde kullanılan birçok moleküler belirteç geliştirilmiştir. Bu belirteçler idrar sitolojisine göre daha iyi sonuçlar vermelerine rağmen halen daha klinik tanıda kullanılmamaktadır. Kompleman faktör H ilişkili protein, *NMP22* ve *BLCA-4* nükleus proteinleri, *C8*, *C18* ve *C19* sitoskelet proteinleri hedef alınarak seçilen yöntemler bu belirteçlerden bazılarıdır (Schmitz-Dräger vd., 2015). Oligonükleotit mikroassay yöntemi ile gen profillemeye, telomer uzunluğu ve mikrosatellit analizi mesane kanserinin diagnoz ve prognozunda yararlı bilgiler sağlayabilir (Mao vd., 1996; Sanchez-Carbayo vd., 2006; McGrath vd., 2007).

Mesane kanseri hastalarında *NRAS* (1p13), *PIK3CA* (3q26), *FGFR3* (4p16), *HRAS* (11p15), *KRAS* (12p12), *AKT1* (14q32), *ERBB3* (12q13) onkogenlerde nokta mutasyon, *RXRA* (9q34), *ERBB2* (17q12) onkogenlerinde mutasyon, *FGFR3* (4p16), *E2F3* (6p22), *EGFR* (7p12), *FGFR1* (8p12), *ERBB2* (17q12) onkogenlerde aşırı ekspresyon, *E2F3* (6p22), *FGFR1* (8p12), *CCND1* (11q13), *MDM2* (12q14-q15), *ERBB2* (17q12) onkogenlerde amplifikasyon görülebilmektedir. Ayrıca *RUNX3* (1p36), *ARID1A* (1p35), *TXNIP* (1q21), *ELF3* (1q32), *NFE2L2* (2q31), *CTNNB1* (3p21), *FBXW7* (4q31), *PIK3R1* (5q13), *APC* (5q21-q22), *CDKN1A* (6p21), *CDKN2A* (9p21), *PTCH1* (9q22), *TSC1* (9q34), *PTEN* (10q23), *ATM* (11q22-23), *MLL2* (12q13), *MDM2* (12q14-q15), *RBI* (13q14), *KLF5* (13q22), *TSC2* (16p13), *TP53* (17p13), *ERCC2* (19q13), *EP300* (22q13), *KDM6A* (Xp11), *STAG2* (Xq25) gibi tümör baskılayıcı olarak kabul edilen genlerde fonksiyon kaybı gerçekleşebilmektedir (Knowles ve Carolyn, 2015). Karsinogen-detoksifikasyon genlerindeki polimorfizm mesane kanseri riskini artırabilir. Örneğin *GSTM1* 0 (null) allel genotipli ve sigara içiciler arasında *NAT2* geni düşük asetilatör genotipli bireylerde kanser oluşum prevalansı yüksek çıkmıştır (García-Closas vd., 2005).

Anne ve babaya ait olan özellikler gametler aracılığıyla yavru bireye aktarılması ve bu özelliklerin incelenmesi kalıtım mekanizmasını oluşturmaktadır. Bu yeni biyolojik bilim dalı, Wilhelm Johannsen (1857-1927) tarafından kalıtsal faktör /element yerine “gen” terimini kullanmasından sonra, William Bateson (1861-1926) tarafından “Genetik” olarak isimlendirilmiştir. Gen dizileri sabit değildir; herhangi bir fiziksel, kimyasal veya biyolojik ajan veya rastgele oluşum sonucu DNA dizisinde değişim gözlenebilir.

Mutasyon olarak isimlendirilen bu olay canlı tarafından tolere edilebilir veya tamir mekanizmasını devreye sokarak hasarı giderebilir. Mekanizmaların hasarı gidermediği durumlarda ise programlı hücre ölümü yani apoptosis sonucu istenmeyen hücre ortadan kaldırılabılır. Ayrıca DNA dizisinde genetik varyasyon olarak tarif edebileceğimiz bireysel farklılıklar da gözlemlenebilir. Bu farklılıklara en iyi örneklerden birisi olarak her 500 baz çiftinde bir meydana gelen SNP (single-nucleotide polymorphism, tek nükleotit polimorfizmi) verilebilir (Passarge, 2013). Yakın akrabalık ilişkisi olmayan insanlarda 3×10^9 baz çiftinden oluşan genomda yaklaşık olarak % 1 gibi sembolik bir oranda farklılık bulunurken, bu farklılığın en temel sebeplerinden birisini SNP'ler oluşturmaktadır. Bireyde SNP'lerin çoğu intron bölgesinde olma, genler arasında yer alma ve kodlanan bölgelerde sinonim kodon oluşumu sonucu işlevsel olarak farklılık oluşturmamaktadır. Ancak bazen protein kodlayan bölgelerde yani genlerde gerçekleşen tek bir nükleotit değişimi aminoasit değişikliklerine yol açarak hedef üründen sapmış bir çıktıya neden olabilmektedir. Bazen de tek bir nükleotit değişimi transkripsiyon faktörlerinin bağlanması organize edildiği kontrol bölgelerinde bulunarak mRNA sentezini etkileyebilmektedir. Belki de SNP, DNA dizisi üzerinde protein oluşumuna katkıda bulunan bölgelerde bulunmasıyla bireyler arasında farklılık oluşturmaktadır (Lodish vd., 2011).

Her SNP'in kendine ait bir rs (reference SNP) numarası bulunmaktadır. Rs numarası "rs" ile başlayıp her SNP'ye özgü rakam dizisi ile sonlanmaktadır. Örnek vermek gerekirse "rs6983267" *CCAT2* geninde bulunan spesifik bir bölgenin tek nükleotit polimorfizmidir. SNP'ler paternal ve maternal kromozomlardaki karşılığını göstermek üzere çift nükleotit kısaltması ile gösterilirler. Örneğin G (Guanin) ve C (Sitozin) için oluşturulan ikili üç kombinasyon GG, GC ve CC şeklindedir (Passarge, 2013).

İnsan gen veritabanları incelendiğinde bugüne kadar birçok hastalık ve kanser türünde olduğu gibi mesane kanseri ile de ilişkilendirilen birçok SNP bulunmaktadır. Günümüzde halen daha ırk ve popülasyonlar da dikkate alınarak hastalıklarda en sık görülen SNP çeşitliliği araştırılmaktadır. *CCAT2* (Colon Cancer Associated Transcript 2) geni bir RNA geni olup kodlamayan RNA şifrelemektedir. *HRAS* (*HRAS* protoonkogeni, GTPaz) Costello sendromu ve epidermal nevüs ile ilişkilendirilen ve *RET* ile *EGFR* sinyal yollarında görev alan *RAS* protoonkogeni ailesine ait protein kodlayıcı bir genidir. postpartum depresyon ve koroner restenoz ile ilişkilendirilen bir

miRNA genidir. *RET* (*RET* protoonkogeni) geni ise ailesel medüller tiroit karsinomu ve multipl endokrin neoplazi tip 2a hastalıklarıyla ilişkilendirilen ve *RET* ve immün sistemdeki sitokin sinyal yollarında görev alan proteini üretmektedir. Çalışmamıza konu olan rs6983267 (G>T) numaralı SNP, *CCAT2* geninde olup genellikle kolon ve prostat kanserleriyle, rs12628 (T>C) numaralı SNP, *HRAS* protoonkogeninde olup genellikle mesane, kolon ve tiroit kanserleriyle, rs2910164 (G>C) numaralı SNP, *MIR146A* geninde olup meme, mide, yumurtalık ve kolon kanserlerinde, rs1799939 (G>A) numaralı SNP ise *RET* protoonkogeninde ve genellikle değişik tipteki tiroit neoplazmalarıyla ilişkilendirilmektedir (National Center for Biotechnology Information (NCBI), GeneCards®, GWAS catalog ve snpedia veritabanları).

Kaynak özetleri kısmında da geniş bir literatür taramasıyla sunduğumuz gibi, son yıllarda yoğun bir şekilde yapılan çalışmalarda serbest DNA'nın invazif yöntemlere kıyasla maliyet, uygulanabilirlik ve hızlı sonuç verebilme gibi sağladığı avantajlarla bir kanser biyobelirteci olabileceği tartışılmaktadır. Bu çalışmalarda DNA zincir bütünlüğü, mutasyon frekansı, mikrosatellit anomalileri ve gen mutasyonları gibi serbest DNA'nın tümöre has değişimlerin kanser hastalarında diagnostik, prognostik ve hastalığın takibinde önemli bir belirteç olacağı değerlendirilmiştir (Jung vd., 2010). Ayrıca artık klinik birer belirteç olan yeni nesil sekanslamada (next generation sequencing [NGS]) serbest DNA, günümüzde trizomi 13 (Patau sendromu), 18 (Edward sendromu) ve 21 (Down sendromu) taramaları için geliştirilen serbest fetal DNA test analizinde ise anne kanına karışan serbest fetal DNA kullanılmaktadır. Bu nedenle serbest DNA'nın plazma veya serumdan ekstraksiyonu ve miktar analizi son derecede önem taşımaktadır. Literatür incelendiğinde geçmişten günümüze serbest DNA ekstraksiyonu ve miktar analizinde kullanılan birçok ticari hazır kit veya prosedür bulunduğu, elde edilen sonuçların çok farklı seyrettiği görülebilir. İşte bu amaçla çalışmamızın birinci aşamasında güncel bir ticari kit kullanarak, mesane kanserli hastalarda üç farklı dönemde alınan plazma örneklerinden serbest DNA ekstraksiyonu ve miktar analizi için ise fotometrik ve florometrik ölçümler yapılacaktır. Bu ölçümler karşılaştırılarak kantifikasyon için en ideal metot belirlenmeye çalışılacaktır. Serbest DNA'nın SNP taramalarında kullanılacak yeterlilikte olduğunu ortaya koyan neredeyse hiçbir çalışma mevcut değildir. Çalışmamızın ikinci aşamasında ise serbest DNA numuneleri kullanarak dört farklı SNP taraması yapılacaktır. Bu aynı zamanda elde edilen DNA kalitesinin ortaya konulması açısından da önemlidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Mandel ve Metais (1948) plazmada serbest DNA'nın varlığıyla ilgili yapmış oldukları çalışmadan günümüze kadar serbest DNA'yı konu alan birçok çalışma yapılmıştır. İlk dönemlerde araştırmacılar serbest DNA miktarının tanı ve tedavide kullanılıp kullanılmayacağını araştırırken, günümüzde NGS (yeni nesil sekans) cihazının geliştirilmesi ile bu DNA kaynağının kullanımıyla ilgili perspektif genişlemiştir. Ayrıca son dönemde yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinde spesifik gen bölgelerinin taranması ve anne plazmasındaki serbest fetal DNA aracılığıyla erken cinsiyet tayini ve trizomi modellerinin varlığının saptanmasında yine serbest DNA kullanılmaktadır. Geçmişten günümüze serbest DNA'yı konu alan çalışmaların birçoğu kronolojik sıralamayla şu şekildedir:

Çeşitli hastalıklarda sinoviyal sıvıda serbest DNA'nın varlığıyla alakalı öncül çalışmalardan biri Hughes vd. (1971) tarafından yapılmıştır. Yüksek kortikosteroid seviyeli değişik hastalıklara sahip 15 bireyin 5'inde ve ekstrakorporeal sirkülasyon kullanılarak yapılan kalp ameliyatı geçiren 11 hastanın 7'sinin serumlarında serbest DNA bulunmuştur. Ayrıca sinoviyal sıvı örnekleri test edilen 63 bireyin 41'inde yine serbest DNA bulunmuş olup araştırmacılar tarafından bu bulguların hücre hasarının bir sonucu olarak ortaya çıktığı rapor edilmiştir.

Etiyolojik role sahip olduğu düşünülen sirküle serbest DNA sistemik lupus eritematozus nefriti veya kısaca lupus nefriti hastalığını da içeren birçok bozuklukla ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmada plazma ve serum örneklerinde DNA 4 farklı metot kullanılarak taranmıştır. Plazmadan izole edilen numune kullanılan bu farklı metodlarla tarandığında neredeyse hiç DNA ölçülmemiştir. Serumdan izole edilen DNA ise 16 hastanın 14'ünde değişik konsantrasyonlarda ve 1,9 mg/ml ortalamayla bulunmuştur. Araştırmacılar bu verilerin insan plazmasındaki serbest DNA'nın patolojik bir bulgu olduğuna işaret ettiğini iddia etmişlerdir (Stainman vd., 1975).

Leon vd. (1977) yapmış oldukları başka bir çalışmada 70 romatoid artrit hastasının serum serbest DNA ve diğer özelliklerini karşılaştırmışlardır. 26 hastanın (% 37) DNA seviyelerinin 100-540 ng/ml aralığında olduğu gözlenmiştir. Bu hastaların ortalama serbest DNA'sı ise 187 ng/ml olarak hesaplanmıştır. 7 hastada ortalama 257 ng/ml olarak bulunurken, 37 hastada (%53) DNA seviyesi 0-80 ng/ml seviyeleri arasında ve

39 ng/ml ortalamayla bulunmuştur. Çalışmada ayrıca kontrol grubu oluşturulmuş olup bu hastaların DNA seviyeleri 0-80 ng/ml düzeyinde ve 13 ng/ml ortalamadadır. Yüksek DNA seviyesine sahip hastalar şiddetli semptomlarla beraber 10 yıldan az süreyle bu hastalıktan müzdarip olduğu görülmüştür. 10 yılı aşkın bir süreden beri bu hastalıktan müzdarip olan bireylerde ise DNA seviyesi düşük seyretmiştir. Ayrıca yüksek DNA seviyelerine sahip olan hastalar romatoid faktör açısından seronegatif çıkmıştır.

Serbest DNA'nın bir marker olarak kullanıldığı öncü çalışmalardan ve dahi literatürü incelediğimizde ilk diyebileceğimiz çalışma Leon vd. (1977) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, radyoimmün test tekniğinin (Radioimmünassay, RAI) DNA miktarının ölçümünde kullanımından sonra, iyododeoksiüridin (125I) işaretlenmiş DNA antiye olarak, lupus eritromatusus hastaların serumları ise antikor olarak kabul edilmiştir. 173 değişik kanser hastası ile 55 sağlıklı, gönüllü bireyden elde edilen serumdaki serbest DNA miktarları bu test ile belirlenmiştir. Sağlıklı insanların kanlarındaki DNA miktarı 0-100 ng/ml arası ve 13 ± 3 ng/ml ortalama ile seyretmiştir. 0-50 ng/ml aralığı normal seviye olarak kabul edildiğinde ise kontrol grubundaki ölçümlerin %93'ü bu orana uymuştur. Kanser hastalarında ise DNA konsantrasyonu 0'dan μg (mikrogram) seviyelerine kadar değişik değerlerde seyretmiştir. Bu grubun ortalaması 180 ± 38 ng/ml olarak hesaplanmıştır. Hastaların yarısındaki serbest DNA seviyesi 0-50 ng/ml aralığındayken, diğer yarısında ise bu oran 50-5000 ng/ml arasında seyretmiştir. Çalışmada DNA seviyesi ile primer tümörün boyutu ve lokasyonu arasında herhangi bir bağlantı kurulamamıştır. Metastatik hastaların serbest DNA seviyeleri metastatik olmayan hastalıklara göre daha yüksek çıkmıştır. Ayrıca radyasyon terapisi uygulandığında lenfoma, akciğer, ovaryum, uterus ve servikal tümörlü hastalarda serbest DNA seviyesinin % 66-90 oranında azaldığı; glioma, meme, kolon ve rektal tümörlü hastalarda ise bu azalmanın % 16-33 olduğu görülmüştür. Tedavi sonrası tümör boyutunun küçülmesi gibi iyileşme halinin kısmen sağlandığı durumlarda ise DNA seviyesinin düşmesi, hastalara herhangi bir terapi uygulanmadığında ise serbest DNA seviyesinin ya sabit kalması ya da artması çalışmada başka bulgulardır. Ancak göz ardı edilmemesi gereken gerçek şu ki, çalışma grubundaki kanserli hastaların serbest DNA seviyesinin normal düzeylerde seyretmesi bu teste düşük bir diagnostik değer kazandırmaktadır.

Başka bir çalışmada gastrointestinal benign ve malign tümörlü hastaların serum sirküle DNA seviyeleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kontrol ile karşılaştırıldığında plazma DNA konsantrasyonunun malign tümörlü hastalarda yüksek seviyelerde olduğu; benign tümörlü hastalıklardaki DNA seviyesinin ise kontrol grubuna göre yüksek, malign tümörlü hastalara göre ise daha düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. Araştırmacılar serbest DNA'ya ait bu bulguların diagnostik ve prognostik değerinin olabileceğini iddia etmişlerdir (Shapiro vd., 1983).

Kanser ile serbest DNA arasında bağlantı kuran ilk çalışmalardan biri de Stroun vd. (1987) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, 37 malign hastanın 10'unun plazmasında yüksek miktarda serbest DNA bulunmuştur. 50 gönüllü ve sağlıklı bireyden elde edilen plazma örneklerinde ise herhangi bir DNA izine rastlanmamıştır. Araştırmacılar kanser hastalarının %27'sinde yüksek serbest DNA seviyesinin gözlenmesi, ayrıca kontrol grubunda DNA'ya rastlanılmaması bulgularına dayanarak, malignansi ile serbest DNA miktarı arasında bir korelasyonun olabileceğini rapor etmişlerdir.

Stroun vd. (1989) yapmış oldukları başka bir çalışmada, kontrol grubunda bulunmama ile birlikte, malign hastaların üçte birinin plazmasında ekstrakte edilebilecek düzeyde serbest DNA miktarı bulunmuştur. Burada çalışmanın gerçekleştiği zamanın koşullarını dikkate almak elzemdir. Araştırmacılar bu bulguyu kanser hücresine ait DNA'nın zincir stabilitesinin azalmasına bağlanmış ve serbest DNA'nın kanser hücrelerinden köken aldığını iddia etmişlerdir. Ancak günümüzde serbest DNA'nın sadece kanser hücrelerinden değil, normal hücre ölümlerinden veya hücre parçalanmalarından kaynaklandığı görüşü daha ağır basmaktadır.

Yapılan bir çalışmada 10 akut miyelojenik lösemi ve miyelodisplastik sendrom hastasında PCR kullanılarak *N-RAS* geninin nokta mutasyonları plazma DNA'sında, kan hücrelerinde ve kemik iliğinde incelenmiştir. Sonuçlara göre kemik iliği ya da periferal kan hücrelerinin DNA'sında bazen rastlanmayan farklı ras mutasyonlarının hemen hemen her zaman plazma DNA'da bulunduğu görülmüştür. Bu sonuçlar plazmanın veya başka bir deyişle plazma DNA'sının miyeloid bozukluklarının tanınmasında kolay elde edilebilir ve yararlı bir materyal olabileceğini göstermiştir (Vasioukhin vd., 1994).

Başka bir çalışmada PCR temelli mikrosatellit analiz yöntemi ile baş ve boyun skuamöz hücre karsinomlu 21 hastanın plazma örneklerindeki serbest DNA taranmıştır. Hastalar serumlarındaki yeni alellerin oluşumu ya da heterozigotluğun kaybı gibi parametrelerin çeşitliliğine göre sınıflandırılmış ve daha sonra primer tümör DNA'sı ile karşılaştırılmıştır. Hastaların 6'sında primer tümörle tam eşleşme göstererek 1 ya da daha fazla mikrosatellit değişikliği bulunmuş; bu hastaların 3.ya da 4. evre ilerlemiş karsinomlu hastalar olduğu görülmüştür. Bu 6 hastanın 5'inde nodal metastaz, 3'ünde ise sonradan gelişen uzak metastaz bulunurken 4'ü bu hastalıktan ölmüştür (Nawroz vd., 1996).

Küçük hücre akciğer kanserli hastaların plazmasındaki serbest DNA aracılığıyla mikrosatellit değişikliğinin incelendiği araştırmada; 16'sında mikrosatellit değişikliği bulunan 21 hastanın plazma örneklerinde serbest DNA'da değişikliğin olup olmadığı taranmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bu hasta grubunun 15'inde mikrosatellit değişikliği bulunmuştur. Araştırmacılar serbest DNA ile ilgili bu bulguların tümör aşamasının tespiti ve kanser tedavisi için yeni bir araç olabileceğini belirtmişlerdir (Chen vd., 1996).

Yapılan bir çalışmada kolorektal kanserli 14 hastanın plazmalarından izole edilen serbest DNA'da *K-RAS* mutasyonlarının varlığı PCR aracılığıyla sekansa özgü primerler kullanılarak araştırılmıştır. Veriler direkt sekanslama ve klonlama tekniklerinden sonra PCR yöntemiyle bir *K-RAS* mutasyonunda enzim restriksiyon bölgesi oluştuğunu göstermektedir. 7 (% 50) hastada primer tümör dokularında *K-RAS* 12. kodon mutasyonu çıkmış ve bu hastaların 6'sında (% 86) plazma DNA'sında özdeş mutasyonlar bulunmuştur. Geri kalan hastalarda ve sağlıklı bireylerde ise mutant DNA saptanmamıştır (Anker vd., 1997).

Birbirinden bağımsız iki çalışmada plazma serbest DNA'sında *K-RAS* mutasyonu taranmıştır. Vasioukhin vd. (1994) kolorektal kanserli 15 hastanın 6'sında *K-RAS* nokta mutasyonu bulunmuştur. Bu çalışmaya benzer bir çalışma ise Kopreski vd. (1997) tarafından yapılmıştır. Metastatik ya da rezekte olmayan kolorektal 31 hastanın kanından alınan plazma veya serum örneklerinin 12'sinde *K-RAS* mutasyonu bulunmuş ancak 28 normal gönüllünün serum veya plazma örneğinde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır.

Yapılan prospektif bir çalışmada pankreas kanseri olan hastaların plazmasındaki serbest DNA kullanılarak *K-RAS* mutasyonları araştırılmıştır. Bu amaçla 21 pankreas kanseri hastasının plazmasından DNA izole edilmiş; PCR işleminden sonra sekans analizi ile *K-RAS* değişiklikleri saptanmıştır. 17 hastada (% 81) *K-RAS* mutasyonları kaydedilmiştir. Hem doku hem de plazma alınan hastalarda benzer DNA mutasyonuna rastlanmıştır. Çalışmada 4 hastada klinik diagnozdan 5-14 ay önceki serbest DNA değişimlerinin olması dikkat çekicidir. Mutant DNA, kronik pankreatitli iki hastanın ve beş sağlıklı kontrolün plazmasında ise bulunmamıştır (Mulcahy vd., 1998).

Pankreas kanseri hastalarda izole edilen serbest DNA miktarı sağlıklı bireylerden elde edilen serbest DNA miktarına göre daha yüksektir. Yapılan bir çalışmada jel elektroforezi kullanılarak plazmadan izole edilen serbest DNA değerlendirilmiş; 3 hasta ve 3 sağlıklı bireyin plazmasında elektron mikroskobu aracılığıyla DNA fragmanlarının uzunluğunda görülen varyasyon ölçülmüştür. Sağlıklı bireylerden elde edilen plazmadan izole edilen DNA'nın elektroforezi nükleozomal DNA'nın (185-200 bp) tam sayı katlarına (1-5x) eşdeğer boyutlarda otoradyografik bantlar göstermesine rağmen, pankreas kanseri hastalardan elde edilen örneklerde ise güçlü DNA bantları görülmüştür. Ayrıca 2 gruptaki DNA'nın zincir uzunluğu dağılımları farklı olduğu görülmüş olup çalışmada en kısa DNA zincir uzunluğu yaklaşık 30 ng (0,34nm/bp'de 88 bp), en uzununu ise yaklaşık 28000 nm (>80000bp) olarak hesaplanmıştır. Tüm ölçülen değerlerin %50'si 100-900 nm arasında bir uzunluğa sahip olduğu kaydedilmiştir. Kanser hastaları (231 nm; ortalama, 185 nm) ile kontrol grubu (311 nm; ortalama, 273 nm) karşılaştırıldığında kontrol grubunda uzunluğun daha fazla olduğu; kanser hastalarının plazmalarındaki nükleozomlarla ilişkilendirilen ve küçük katsayılarına tekabül eden 63, 126, 189, 252 ve 315 nm uzunluğundaki küçük DNA parçaları ve fragmasyonlarının varlığı gözlenmiştir. Araştırmacılar elde edilen sonuçlara dayanarak plazma serbest DNA'ların kanser hastaları ile sağlıklı bireyler arasındaki farkın önemli düzeylerde olduğunu ve muhtemelen bu farkın neoplastik ve/veya normal hücrelerde gerçekleşen apoptozis sonucu oluştuğunu belirtmişlerdir (Giacona vd., 1998).

Esteller vd. (1999) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olan hastaların plazmasında anormal DNA metilasyonunun bulunup bulunmadığını incelemiştir. Metilasyon spesifik PCR aracılığıyla 22 hastanın DNA'larında *p16* tümör baskılayıcı geninin promotor hipermetilasyonu, varsayılan metastaz baskılayıcı gen olan Death-Associated

Protein Kinase 1, detoksifikasyon geni olan glutatyon S-transferaz P1 ve DNA tamir geni olan O6-metilguanin-DNA-metiltransferaz taranmıştır. Bu hastaların tümör dokusunda 15'inde (% 68) bu genlerden en az birinin anormal metilasyonu saptanmış, normal dokuda ise rastlanmamıştır. Bu 15 hastanın 11'inde (73%) anormal metilasyon ayrıca plazma örneklerinden izole edilen DNA'da da izlenmiştir. Metilasyon göstermeyen tümörlü hastalardan alınan serumların hiçbiri pozitif çıkmamıştır. Plazma DNA'da anormal promotor metilasyonu bütün tümör aşamalarında görülmüştür. Çalışma sonucunda plazma serbest DNA aracılığıyla kanserle ilişkili genlerin anormal promotor hipermetilasyonunun saptanması, kanser teşhisi veya nüksetmenin saptanması için yararlı olabileceği ileri sürülmüştür.

Yamada vd. (1999) *K-RAS* geninin 12. kodonundaki nokta mutasyonunu değerlendirmek amacıyla pankreatik adenokarsinomlu 21 hastanın cerrahi doku ve plazma örneklerinden izole edilen DNA kullanılarak mutant allel spesifik amplifikasyon metodu ile incelenmiştir. *K-RAS* gen mutasyonu, 21 (% 71) primer tümörün 15'inde tespit edilmiştir. Bu 15 hastanın 9'unun (% 60), plazma DNA'sında özdeş mutasyon tespit edilmiştir. Kronik pankreatitli 4 hasta ile 5 sağlıklı bireyin plazma örneklerinde ise mutasyona rastlanmamıştır. Serbest DNA'sı *K-RAS* gen mutasyonu açısından pozitif olan tümörler boyut olarak büyüktür. Tedavi sonucunda 9 hastanın 6'sında (% 67) plazmada serbest DNA varlığı izlenmemiştir. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası plazma örneklerinde kalıcı pozitif *K-RAS* gen mutasyonuna sahip üç hastada erken nüks görüleceği veya ilerleyici bir hastalığa sahip olabileceği düşünülmüştür.

Meme kanseri teşhisi konulan ve mastektomiden sonra tümör ve normal doku, normal kan hücreleri ve plazma örnekleri alınan 62 hastanın meme kanseri için birer belirteç olan *p53* gen mutasyonu ve *p16INK4a* geninin ilk ekzonundaki anormal metilasyon incelenmiştir. 56 (%90) hastanın tümör dokusunda en az bir anormal değişim izlenmiş ve bu hastaların 41'inde (66%) benzer değişimler plazma serbest DNA'da da gözlenmiştir (Silva vd., 1999).

Hem sağlıklı ve hem de hasta insanların serum ve plazmalarında küçük miktarlarda serbest DNA bulunmakla beraber kanser hastalarının plazmasında ise bu konsantrasyonun arttığı bilinmektedir. Araştırmacılara göre kanser hastalarının plazmasından çıkarılan genetik materyalde tümör DNA'sının bulunması karakteristiktir. Bu materyal azalan zincir kararlılığı, spesifik onkogen varlığı, tümör baskılayıcı gen ve

mikrosatellit kararsızlığı gibi birçok değişik durumu da içermektedir. Baş ve boyun, akciğer ve böbrek hücre kanseri hastaların serum ve plazma DNA'larında mikrosatellit kararsızlığı ya yeni bir alel ya da bir alelin kaybının oluşmasıyla baskılanması yapılan bu çalışmadan elde edilen önemli bir sonuçtur. Bu çalışmadan elde edilen veriler plazma serbest DNA'nın kanser için birer invazif olmayan diagnostik, prognostik ve takip testi olarak geliştirilebileceğini göstermektedir (Anker vd., 1999).

Yapılan çalışmalarda organ naklinden sonra alıcıların vücut dokularında periferik kan ve plazmasında mikrokimerizm bulunduğu belirtilmiştir. Zhang vd. (1999) donör DNA'sını alıcının idrarında taranabileceğini ve bu DNA miktarının doku reddinin bir belirteci olabileceğini iddia etmişlerdir. Bu amaçla böbrek nakli geçiren ve donörleri erkek bireyler olan 31 bayan hasta çalışma grubu olarak seçilmiştir. Bu hastalarda Y kromozomunda bulunan *SRY* geni (sex determining region Y) verici bireylerin DNA'sının bir işareti olarak kabul edilmiştir. Bu amaçla rt-PCR (Real Time PCR), İdrardaki bu DNA'dan *SRY* ve *β -globin* genlerinin taranmasında kullanılmıştır. Akut rejeksiyon atağı geçiren böbrek nakli alıcısı bir bayandan alınan seri idrar örnekleri de ayrıca toplanmış ve rt-PCR kullanılarak *β -globin* geni analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 17 bayan hastanın 14'ünün idrarında *SRY* dizisi taranmış, bayan donörlerden alınan böbreklerle organ nakli olan 14 hastada ise *SRY* sekansı taranmamıştır. Akut rejeksiyon atağından sonra idrarda *β -globin* geninin konsantrasyonu önemli derecede artmış olup rejeksiyona karşı tedavi uygulandığında ise hızla düşmüştür. Böylece bu çalışmada renal transplantasyondan sonra idrarda kimerizmin oluştuğu ve ayrıca q-PCR (quantitative PCR - kantitatif PCR) kullanılarak idrardaki serbest DNA'nın ölçülmesi ile bu DNA'nın doku reddinin diağnoz ve takibinde önemli bir materyal olabileceği gösterilmiştir.

240 hastanın dahil olduğu prospektif bir çalışmada kolonoskopi geçiren 135 hastada kolorektal biyopsi yapılmış, 232 hastadan risk faktörü bilgisi edinilmiştir. DNA plazma ve kolorektal dokudan izole edilmiş, PCR aracılığıyla da amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. 232 hastanın 64'ünün (% 28) plazmasında, doku örneği alınan 135 hastanın 35'inde dokudan alınan numunelerin analiziyle *K-RAS* mutasyonu kaydedilmiştir. Bu 35 hastanın plazma örneklerinden elde edilen serbest DNA'da mutasyon tarandığında, 29 bireyin ayrıca plazma serbest DNA'larında da aynı mutasyonu taşıdığı görülmüştür. Geri kalan 100 hastanın 93'ünde herhangi bir

mutasyon görülmemiş; biyopsileri alınmayan 105 hastadan 28'i kolonoskopik bulguların aksine serbest DNA'larında mutasyon taşırken, bu 28 hastanın 24'ünde kolorektal kanser için risk faktörü kaydedilmiştir (Kopreski vd., 2000).

Yapılan bir çalışmada maternal plazmada serbest fetal DNA konsantrasyonunun aynı düzeyde olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla 13 gebe olmayan ve 16 gebe olan sağlıklı kadınlardan 3 gün boyunca kan örnekleri alınmıştır. DNA plazmadan izole edilmiş ve rt-PCR kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. Gebe olmayan kontrollerde toplam serbest DNA miktarı ortalama 13,5 kat, gebe kadınlarda ise ortalama 21,5 kat dalgalanmıştır. 10 kadının erkek fetüse sahip olduğundan, bu vakalarda serbest fetal DNA konsantrasyonu Y kromozomu dikkate alınarak belirlenmiştir. Erkek fetüslerde serbest fetal DNA ifade düzeyi 2,2 kat olarak kaydedilmiştir (Zhong vd., 2000).

Sozzi vd. (2001) plazmadaki serbest DNA miktarının akciğer kanseri hastaları ile sağlıklı bireyler arasında ayırım yapıp yapamayacağını ve bu miktarın hastalık progresyonuna bağlı olup olmadığını araştırmak için bir çalışma yapmışlardır. Serbest DNA miktarı ölçümü ve mikrosatellit değişimlerinin analizi küçük hücreli akciğer kanseri olan 84 hastanın ardışık serisinde ve 43 sağlıklı kontrolde gerçekleştirilmiştir. Hastalarda plazma DNA konsantrasyonunun ortalama değerleri ia evresi hastaları dikkate alındığında bile kontrollere göre daha yüksek çıkmıştır. DNA seviyesi ve mikrosatellit değişimlerinde görülen varyasyonun takip edilen 38 hastanın klinik değerleri ile korelasyon göstermiştir. Araştırmacılar bu bulgulara dayanarak akciğer kanseri hastalarında plazma serbest DNA'sının kantifikasyon ve moleküler karakterizasyonunun, etkilenmemiş bireyleri ayırt etmek ve takip sırasında erken yinelenmesini saptamak için değerli invazif olmayan tanı araçları olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Hahn vd. (2001) yapmış oldukları literatür incelemesiyle preeklemsi, preterm doğum ve polihidroamniyoz gibi hamilelikle ilişkilendirilen bozukluklarda maternal plazmadaki serbest DNA konsantrasyonundaki yükselmelerin var olduğunu; başta trizomi 21 olmak üzere anöploid fetüs taşıyan gebelerde serbest DNA seviyesinin hemen hemen normal hamileliklerin iki katı kadar olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak maternal plazmadaki serbest DNA'nın kantitatif analizinin hamilelik ile ilişkili bozukluklar ya da belirli fetal kalıtsal hastalıklar için invazif olmayan prenatal bir diagnoz olabileceği hipotezini kurmuşlardır.

Zhong vd. (2001) yapmış oldukları çalışmada fetal DNA'nın maternal dolaşımdan hızla atılmasını göz önüne alarak, bu genetik materyalin böbrek yoluyla atılıp atılmadığını araştırmıştır. Bu amaçla erkek fetüslerle hamile olan 8 kadının idrarlarında Y kromozomuna spesifik DNA sekanslarının varlığı araştırılmış; idrarda maternal DNA sekansları taranmasına rağmen fetüsa ait Y kromozomuna spesifik DNA sekanslarına rastlanmamıştır. Burada ilgi çeken nokta şudur: serbest DNA, böbrekten mi yoksa başka bir doku veya organdan mı türemiştir? Bu sorunun cevabını bulmak için araştırmacılar erkek vericiler aracılığıyla böbrek nakli geçiren kadınların idrarını incelenmiştir. İdrarda Y kromozomuna spesifik DNA sekanslarının tarandığı ve doku reddinin gerçekleştiği aşamalarda bu sekansların yükseldiği görülmüştür. Araştırmacılar bu verilere dayanarak idrarda DNA'nın kaynağı açısından mikrokimerizm olduğu ve idrardaki vericiye ait DNA sekanslarının taranmasıyla doku nakli toleransı için yeni bir belirteç oluşturulabileceği sonucuna varmışlardır.

Yapılan birçok çalışmada kanser hastalarının kan plazmasındaki serbest DNA normal seviyeye göre yüksek oranda bulunmuştur. Yayımlanan veriler, kan plazmasındaki DNA'nın sadece bir kısmının kanser hücrelerinden türediğini öne sürmüştür. Bununla birlikte, dolaşan DNA'nın ne kadarının kanserli veya ne kadarının kanser dışı hücrelere ait olduğu bilinmemektedir. Bu amaçla *CDKN2A* tümör süpresör geninin promotor bölgesinin kantitatif metilasyona spesifik PCR'si ile, tümör hücrelerinden türetilen plazma DNA'nın miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Jahr vd. (2001) yapmış oldukları bu çalışmada 30 kanserli hastanın plazma örnekleri incelenmiş ve tümör hücrelerinden türeyen DNA'nın toplam serbest DNA'nın minimum % 3 ve maksimum % 93 oranına tekabül ettiği kaydedilmiştir. Ayrıca plazmada tümör hücrelerine ait olmayan serbest DNA'nın muhtemel kökenleri araştırılmış ve birkaç numunede T hücrelerine ait DNA'nın serbest DNA oluşumuna önemli düzeyde katkı verdiği görülmüştür. Plazma serbest DNA'nın apoptotik veya nekrotik hücrelerden türediği ihtimalini araştırmak için in vitro apoptotik (staurosporin) ve nekrotik (staurosporin + oligomisin) hücreler ile farelerde apoptotik (anti-CD95) veya nekrotik (asetaminofen) karaciğerin indüksiyonları gibi deney düzenekleri kurulmuştur. İşlem gören hayvanların kan plazması örneklerinde ve süpernatantlarında yüksek oranda serbest DNA miktarı bulunmuştur. Jel elektroforezi ile apoptotik ve nekrotik plazma DNA'larının ayrımı mümkün olduğundan, farklı kanser hastalarından elde edilen plazmada DNA parçalarının benzer karakteristik özellikleri tanımlanmıştır. Araştırmacılar bu verilerden

elde edilen sonuçlara göre, daha önceki literatür bilgisine paralel olarak kanser hastalarında apoptotik ve nekrotik hücre DNA'larının plazma serbest DNA'sının temel kaynağı olduğu sonucuna varmışlardır.

Günümüzde gebe kadınların da idrarlarında serbest DNA'nın tespiti için yeterli olanaklar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda preeklampsinin oluşumunun maternal plazmada serbest fetal DNA seviyesinin normal serbest maternal DNA gibi artması ile ilişkili olabileceği ve her iki seviyedeki artışın da hastalığın seyri ve şiddetine paralel olduğu kaydedilmiştir (Zhong vd., 2001a). Bu sonucun ortaya çıkmasında preeklampsi ile seyreden gebeliklerden alınan numuneler önemli rol oynamıştır. Yapılan başka bir çalışmada preeklampsi semptomlarının başlangıcından önce hem maternal plazmada hem serbest fetal DNA hem de serbest maternal DNA'nın seviyelerini ölçmüşlerdir. Elde edilen veriler, serbest maternal DNA'nın seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olmadığı, bunun aksine serbest fetal DNA seviyesindeki artışın önemli düzeyde olduğunu göstermektedir (Zhong vd., 2001b). Preeklampsi durumu yaşayacak olan hamile kadınların plazmalarındaki serbest fetal DNA seviyesindeki artış daha sonra yapılan bir başka çalışmayla daha pekiştirilmiştir (Zhong vd., 2002).

Yapılan bir çalışmada DNA saflaştırmak ve kantifikasyon tayini gerçekleştirmek için sıklıkla kullanılan 2 ticari kit (QIAamp blood kit, PicoGreen DNA kit) kullanılmış ve karsinom, lösemi ve lenfoma hastalarındaki DNA seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Hastalarda tümör markerleriyle paralel bir şekilde serbest DNA seviyesinin de yüksek çıktığı, elektroforez sonucunda ise bu hastalarda DNA fragmanlarının parçalanmış küçük boyutlarda olduğu ve normal bireylerde bu boyutlarda serbest DNA fragmanlarının bulunmadığı görülmüştür (Wu vd., 2002).

Yapılan birçok çalışma anne dolaşımında başta fetal eritroblastlar olmak üzere birçok hücre tipinin ve ayrıca serbest fetal DNA'nın bulunduğunu göstermektedir. Fetal genetik özelliklerin araştırılmasında hem bu hücrelerin hem de serbest fetal DNA'nın kullanılması amacıyla yapılan çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Anne dolaşımındaki bu serbest fetal DNA'nın kaynağı nedir? Bazı çalışmalarda bu kaynağın fetal eritroblastlar olabileceği öngörülmüştür. Bu hipotez, preeklampsi veya polihidramnioslardan etkilenen gebeliklerde fetal eritroblast ve hücre içermeyen fetal DNA konsantrasyonlarının arttığı raporlarıyla desteklenmektedir. Zhong vd. (2002) aynı maternal kan örneklerinde fetal eritroblast sayılarını ve serbest DNA

konsantrasyonlarını incelemişlerdir. Hem normal hem de patolojik olarak etkilenen gebelikler üzerinde yapılan çalışma, bu iki gruptaki fetal hücreler ve oluşan molekül türleri arasında bir korelasyon olmadığını ortaya koymuştur. Ayrıca erken doğum başlangıcından etkilenen gebelik durumunda fetal eritroblast sayılarında herhangi bir artış olmaksızın, serbest fetal DNA konsantrasyonlarında belirgin yükselmeler tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler alternatif bir hücre tipinin serbest fetal DNA'nın kaynağı olabileceğini göstermektedir. Dahası serbest fetal DNA'nın bu hücre tipinden türemesinin fetal hücrelerin anne dolaşımına aşırı geçişiyle bağlantılı bir artış olmadığını ve ayrıca serbest fetal DNA seviyesindeki artışın patolojik plasental koşullardan kaynaklandığı görülmüştür.

Tümör dokusunda gerçekleşen nekrozis sonucunda farklı boyutlarda DNA fragmanları oluşurken, normal dokulardan apoptosis sonucu salınan DNA fragmanları daha küçük boyutlarda ve büyük bir kısmı ise uniform yapıdadır. Bu hipotezin gerçekliğini ortaya koymak amacıyla yapılan bir çalışmada, rt-PCR aracılığıyla plazma serbest DNA'daki genomik DNA bütünlük indeksi araştırılmıştır. Jinekolojik ve meme kanseri olan 61 hastada ve neoplastik hastalığı olmayan 65 kadın hastada bir DNA bütünlük indeksi ve plazmadaki DNA konsantrasyonu belirlenmiştir. Bulgular, plazma serbest DNA'sındaki DNA bütünlüğünün artmasının kanserle ilişkili olduğunu ve DNA bütünlüğünün ölçülmesinin kanser tespiti için basit ve ucuz bir ölçüm sağlayabileceğini göstermiştir (Wang vd., 2003).

Yapılan bir çalışmada trizomi 21'den etkilenen erkek fetüsü taşıyan hamile kadınların serumunda serbest fetal ve toplam DNA düzeylerinin analizi ve bu düzeylerin normal bir erkek fetüsü taşıyan kadınlarla karşılaştırılması yapılmıştır. DNA, doğum öncesi tarama programının bir parçası olarak toplanan arşivlenmiş ikinci trimester maternal serum örneklerinden ekstrakte edilmiştir. Trizomi 21 erkek fetus taşıyan kadınlardan oluşan toplam 10 vaka, erkek fetüsü taşıyan 10 kontrol ile karşılaştırılmıştır. Sırasıyla *SRY* geni ile yapılan kantitatif rt-PCR ile serbest fetal DNA'nın, albumin geni ile de toplam DNA'nın miktarı belirlenmiştir. Trizomi 21'li 10 hamilenin ortalama serbest fetal DNA seviyesi mL başına 31,98 hücre eşdeğeri iken, bu oran kontrol grubunda 34.06 olarak kaydedilmiştir. Ortaya çıkan bu farklılık istatistik olarak anlamlı düzeyde değildir. Trizomi 21'li fetüsü taşıyan hamile kadınlarda ortalama toplam DNA seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı düzeyde yüksektir ($p = 0,029$). Bu

DNA seviyesi 21'li fetüs taşıyan hamile kadınlarda mL başına 36152,6 hücre eşdeğeri iken, kontrol grubunda ise bu değer 5832,81'dir. Çalışmanın sonuçları her ne kadar serbest fetal DNA düzeyinde anlamlı bir farklılığın varlığını ortaya koyamasa da, iki grup arasında toplam DNA seviyesinin farklılığı yansıtması açısından önemlidir (Spencer vd., 2003).

Li vd. (2003) 11 erkek fetüs taşıyan 18 hamile kadından idrar numuneleri toplamış, rt-PCR veya PCR kullanarak Y kromozomuna spesifik DNA sekanslarını taramışlardır. Ayrıca maternal plazmada yüksek serbest DNA bulunduğu bilinen HELPP sendromlu (hemoliz, yüksek karaciğer enzimleri ve düşük trombosit belirtili bir sendrom) iki hamile kadından da plazma örnekleri alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre araştırmacılar, maternal idrarda hiçbir şekilde fetal DNA'ya rastlanılmadığını, bunun aksine HELLP sendromlu gebelerin plazmasında yüksek oranda serbest fetal DNA bulunduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca her ne kadar serbest DNA'nın fragman uzunluğunun düşük olduğu ve böylece böbrekte permeabilitesinin yüksek olduğu bilinse de idrarda serbest fetal DNA'nın maternal idrarda saptanamayacağı araştırmacılar tarafından kaydedilmiştir.

Tümör ile ilişkili DNA, kolorektal kanser hastalarının plazmalarında sınırlı gen veya mutasyon kapsamına rağmen çeşitli teknikler kullanılarak tespit edilmektedir. Bir grup araştırmacı *K-RAS* ve *BRAF* genleri için özel mutasyonel skorlamanın yanında önemli genotipik heterojenitesi nedeniyle tipik olarak analitik bir sorun oluşturan *APC* ve *TP53* genlerindeki mutasyonları değerlendirmek için yüksek duyarlı tarama metodolojisini rapor etmişlerdir. Bu amaçla 20 hastadan izole edilen plazma serbest DNA hedef mutasyonlar için taranmış ve sporadik kolorektal kanser ile ilişkili olduğu bilinen somatik mutasyonlar için kapsamlı tarama sağlamak için mutasyon tarama teknolojisini ve bu moleküler hedefler seçilmiştir. Mutasyonlar, analiz edilen toplam DNA'nın % 0,1'ini temsil eden varyantların tespit edilmesini mümkün kılmak için, ayırma sonrası floresan teknolojisini kullanan yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi platformu ile tanımlanmıştır. Mutant allel spesifik amplifikasyon sonrasında aynı platformla tarama ile 12, 13 ve 61 *K-RAS* kodonları ve 599 *BRAF* kodonu düşük seviyeli hedef mutasyonları belirlemek için kullanılmıştır. Bu birleştirilmiş tarama ve skorlama yaklaşımıyla hastaların hepsinde en az bir mutasyon tespit edilmiştir. Böylece iyi bir şekilde dizayn edilmiş mutasyon tarama ve skorlama paneli kolorektal kanser

taraması, tedavi sırasında ve sonrasında hastalık izlemi için önemli olabileceği rapor edilmiştir (Lilleberg vd., 2004).

Farklı prostat kanseri (PCa) evreleri ve benign prostat hiperplazisi (BPH) olan ve sağlıklı kişilerdeki plazma DNA konsantrasyonlarının karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, kanser hastalarında plazma DNA seviyesi referans aralığında bulunmuştur. Lenf nodu ve uzak metastazlı hastalarda ve ayrıca BPH'de DNA seviyesinin arttığı görülmüştür. Plazma DNA'sı ile hayatta kalma süresi arasındaki ilişki prostata özgü antijende olduğu gibi benzer şekilde sonuçlar vermiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, PCa hastalarında plazma DNA'sının sınırlı bir geçerliliğe sahip olduğu, ancak plazma DNA'sının tümöre bağlı özelliklerinin araştırılması ile kombine edilen takip çalışmaları için makul olacağı sonucuna varılmıştır (Jung vd., 2004).

Yapılan bazı çalışmalarda DNA fragmanlarının da bütünlüğü veya boyut dağılımının da olası tanısal potansiyele sahip olabileceği değerlendirilmektedir. Boddy vd. (2006) prostat kanserinin klinik teşhisinde bu parametrenin rolünü araştırmak için bir çalışma yapmışlardır. Prostat kanseri için araştırılan 61 prostat kanserli ve 62 benign histolojili hastadan prospektif olarak toplanan plazma örneklerinden serbest DNA izole edilmiş, rt-PCR aracılığıyla konsantrasyon ve boyut dağılımı tayini yapılmıştır. Analiz sonucunda kanser ile serbest DNA seviyesi ve boyut dağılımı arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Araştırmacılar elde ettikleri verilere dayanarak serbest DNA'nın prostat kanserinin klinik tedavisinde tanısal değere sahip olmadığını rapor etmişlerdir.

Chui vd. (2006) yanık hastalarında serbest DNA'nın artabileceğini, yanık şiddetinin objektif bir göstergesi ve prognostik öneme sahip olduğu kadar prediktif olabileceği hipoteziyle, yaralanmadan sonraki 24 saat içerisinde 28 yanıklı hastadan ve kontrol grubu oluşturmak için 12 sağlıklı bireyden elde edilen plazma örneklerindeki serbest DNA miktarını kantitatif rt-PCR aracılığıyla β -globin geni tarayarak belirlemeye çalışmışlardır. Kan numunelerinin alınımının yanma eylemi gerçekleşikten 5 ila 7 saat sonra olduğu; hastaların 13'ünün alev/flaş yanığı, 15'inin ise haşlanma sonucu oluşan yanık olduğu kaydedilmiştir. Elde edilen ortalama DNA seviyeleri kontrol grubunda 287, haşlanma yanığı grubunda 648 ve ise alev/flaş yanığı grubunda 2685 kilogenome-equivalents/L olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar serbest DNA'nın yanık oluşumundan sonra arttığını, ayrıca hastanede kalış süresini de içeren bazı sonuç ölçütleriyle önemli ölçüde korelasyona sahip olduğunu göstermiştir. Haşlanma sonucu yaralanan hastalara

göre vücudunda alev/flaş yanığı oluşan hastalarda DNA düzeylerinin daha yüksek çıkması çalışmadan elde edilen başka bir sonuçtur.

Serbest DNA hücrel nekroz ve apoptozis yoluyla dolaşıma salınan normal ve tümör türevi DNA'nın bir yansımasıdır. Kamat vd. (2006) tümöre özgü plazma DNA'sı, ortotopik bir yumurtalık kanseri modelinde tümör yükü ve tedaviye yanıt için bir belirteç olup olamayacağını belirlemeye çalışmışlardır. Bu amaçla dişi farelere intraperitoneal olarak HeyA8 yumurtalık kanser hücreleri enjekte edilmiştir. Bu hayvanlara ayrıca ya docetaxel tek başına ya da antianjiyojenik ajanlarla beraber verilmiştir. Plazmadan DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, beta-actin primerleri aracılığıyla rt-PCR kullanılarak tümöre özgü DNA'nın kantifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar tümör yükünün artışıyla plazmadaki tümöre özgü DNA artışı arasında pozitif korelasyonun olduğuna işaret etmektedir.

Serum ve plazma numuneleri karşılaştırıldığında serbest DNA bakımından hangisinin daha zengin olduğu ile ilgili bazı araştırmalar yapılmış olup genel kanı serum lehine olmuştur. Bunun sebebi tam olarak bilinmemektedir. Ancak yine de santrifüjleme işleminin bu sonucun oluşumuna neden olduğu düşünülebilir. Umetani vd. (2006) yaptıkları bir çalışmada tümörlü 24 hastadan serum ve plazma numunesi toplamışlardır. Bu numuneler 0,1 pg/μL of DNA hassasiyetle ve ALU tekrar bölgelerini hedef alarak q-PCR aracılığıyla serbest DNA seviyelerini tespit etmeye çalışmışlardır. ALU tekrar bölgeleri ile yapılan q-PCR işlemi için numunelerden serbest DNA saflaştırılmasına gerek olmadığından DNA kayıpları minimize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre serumdaki serbest DNA seviyesi plazmadakinin neredeyse 5 katı kadar fazla çıkmıştır. Bu sonuçlar literatürdeki diğer sonuçlarla paraleldir ve plazmaya göre serumun serbest DNA çalışmaları için araştırmacıya daha fazla avantaj sağlayabileceğini göstermektedir.

Periferik kanda bulunan serbest DNA hücre ölümünden kaynaklanmaktadır. Antonatos vd. (2006) kalp krizi vakalarında serbest DNA'nın plazmadaki miktarını, miyokardiyal belirteçlerle aralarındaki korelasyonunu ve kalp krizinden sonra kantitatif açıdan seyrini belirlemek amacıyla kardiyoloji kliniğine 6 saatlik bir periyot içerisinde göğüs ağrısı şikayeti ile başvuran ve trombolitik etkisinden dolayı reteplaz uygulanan 13 hastanın (yaş 57 ± 16 yıl) kliniğe kabulü sırasında ve takip eden 5 gün boyunca periferik kan örnekleri alınmıştır. Karşılaştırma amacıyla 30 sağlıklı bireydeki serbest DNA düzeyleri de ölçülmüştür. Sonuçlar daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde kalp krizi

geçiren hastalardaki serbest DNA seviyelerinin normal bireylere göre yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca kliniğe kabul esnasında alınan plazma örneklerindeki DNA seviyeleri diğer günlere nazaran daha yüksek değerlerde çıkmıştır (Chang vd., 2003).

Gerovassili vd. (2007) prospektif olarak toplanan örneklerde fetal ve toplam serbest DNA düzeylerini ölçmek, diğer değişkenlerle olan korelasyonlarını anlamak ve teşhis değerlerini açıklığa kavuşturmayı amaçlamışlardır. Koryon villus örneklemeden önce 264 kontrol, 72 trizomi 21, 24 trizomi 18, 12 trizomi 13, 16 Turner sendromu ve hamileliğin ilk üç ayındaki 8 tritriploidi örneklerinde plazma DNA kantitatif rt-PCR ile izole edilmiştir. *β-globin* geni amplikasyonu aracılığıyla toplam serbest DNA'nın, *DYS14* ve *SRY* genlerinin amplikasyonu ile de fetal DNA'nın miktar tayini yapılmıştır. Fetal ve toplam serbest DNA miktarı ile ense kalınlığı arasında ter orantı bulunmuş; fetal DNA'nın hamileliğin ilk üç ayındaki kromozomal anormallikler için prognostik bir belirteç olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Boni vd. (2007) yaptıkları bir çalışmada, kolorektal kanser hastalarında potansiyel bir tümör markörü olarak serbest DNA'nın duyarlılığını ve özgüllüğünü değerlendirmişlerdir. Bu DNA kantitatif analizi için rt-PCR aracılığıyla *RNas P* geninin amplifikasyonu kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla primer kolorektal kanser ameliyatı geçiren ve hastalığın farklı evrelerindeki hastaları ile sağlıklı bireylerden alınan numuneler incelenmiştir. Hastalardan elde edilen DNA miktarının ortalama değeri 4771 ng / ml olup, kontrol grubunun ortalamasının neredeyse 50 katı kadar yüksek çıkmıştır. Bunun aksine hastaların CEA (karsinoembriyonik antijen) değeri vakaların sadece % 47'sinde değişmiştir. Araştırmacılar bu verilere dayanarak serbest DNA miktarının belirlenmesinin kolorektal kanser için invazif olmayan önemli bir belirteç olabileceğini belirtmişlerdir.

Zhong vd. (2007) benign ve malign meme lezyonları olan hastaların plazmasındaki serbest DNA miktarını gerçek zamanlı q-PCR ile analiz etmişlerdir. Elde edilen verilere göre malign meme kanserinde plazmada serbest DNA düzeylerinin yükseldiği ve tümör boyutu ile korelasyon gösterdiği görülmüştür. Böylece araştırmacılar serbest DNA kantifikasyonunun malign meme tümörleri için tanısal ve prognostik değere sahip olabileceğini iddia etmişlerdir.

Yoğun bakım ünitesi hastalarında plazma serbest DNA'nın konsantrasyonunun organ yetmezliği ve hastane mortalitesi ile ilişkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada üniversite hastanesinde tıbbi ve iki tıbbi cerrahi - yoğun bakım ünitesinde prospektif kohort çalışması yapılmıştır. Ocak 2004 - Temmuz 2005 arasında yoğun bakım ünitelerine başvuran 228 kritik hastadan 1. kan örnekleri kabul gerçekleştikten hemen sonra, 2. kan örnekleri ertesi sabah alınmıştır. 3. kan örnekleri ise 2. kan örneklerinin alınmasından 48 saat sonra toplanmış ve muhafaza altına alınmıştır. Serbest DNA'nın miktar tayini *β-globin* geni hedef seçilerek rt-PCR ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hastanede hayatını kaybedenlerin kanındaki serbest DNA miktarı hayatta kalan hastalara göre daha yüksek orandadır (Saukkonen vd., 2007).

Korabecna vd. (2008) bozuk böbrek fonksiyonlu hastalardaki serbest DNA düzeylerini, peritoneal diyaliz ve hemodiyaliz serbest DNA üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Serbest DNA düzeyi rt-PCR ile *GADPH* gen dizisi amplifikasyonu aracılığıyla belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda 20 sağlıklı bireydeki serbest DNA düzeyi ortalaması 20 kişiden oluşan kronik böbrek hastalığı, 18 kişiden oluşan peritoneal diyaliz ve 17 hemodiyaliz geçiren hastaların olduğu grupların ortalamaları ile karşılaştırıldığında önemli bir fark görülmemiştir. Hemodiyaliz hastalarındaki serbest DNA düzeyleri kronik böbrek hastaları ve peritoneal diyaliz hastaları ile karşılaştırıldığında ise oluşan fark istatistiksel açıdan önemlidir. Kronik böbrek, peritoneal diyaliz ve hemodiyaliz hastalarında farklı zamanlarda alınan serbest DNA seviyesi önemli düzeyde farklılık göstermemiştir. Araştırmacılar, bu sonuçlara dayanarak renal eliminasyonun serbest DNA'nın ortadan kaldırılmasında temel mekanizma olmayabileceğini iddia etmişlerdir.

Deligezer vd. (2008) meme kanseri hastalarında adjuvan kemoterapi uygulama esnasında plazma serbest DNA'nın seviyesini araştırmışlardır. Bulgular serbest DNA seviyesinin kemoterapi boyunca değişmediğini göstermiştir. Ancak yine de popülasyon içerisinde serbest DNA miktarı önemli derecede varyasyon göstermiştir. Başka bir deyişle hastaların % 43,8'inde DNA miktarında artış, % 56,2'sında azalma gözlenmiştir.

Benign ve malign ovaryum tümürlü hastalarda (epiteliyal over kanseri, benign epiteliyal over tümörü ya da endometriozis teşhisi konulan hastalar) serbest nükleer DNA ve serbest mitokondriyal DNA düzeylerindeki kantitatif değişimin hasta tedavisinde değer

taşıyıp taşımadığını araştırmak için 104 hastadan alınan serum ve plazma örnekleriyle yapılan başka bir çalışmada, epitelyal yumurtalık kanserli hastalarda sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında plazmada serbest nükleer DNA ve serbest mitokondriyal DNA'ların miktarını önemli derecede yüksek çıkmıştır. Bununla birlikte, epitelyal yumurtalık kanseri olan hastalarda dolaşımdaki serbest DNA seviyeleri ile CA 125 patolojik parametreler arasında bir ilişki kurulamamıştır. Ayrıca epitelyal yumurtalık kanseri ile Endometriozisli gruplar arasında serbest nükleer DNA'nın aksine serbest mitokondriyal DNA açısından önemli farklılık görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, epitelyal yumurtalık kanserinde serbest nükleer DNA ve serbest mitokondriyal DNA'nın birer potansiyel biyolojik belirteç olabileceği önerilmiştir (Zachariah vd., 2008).

Yapılan bir çalışmada rt-PCR kantifikasyon metodu ile 80 sağlıklı birey ile 175 meme kanserli hastanın plazmada serbest DNA miktarı karşılaştırılmış; meme kanserli hastalardan elde edilen DNA seviyesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca ameliyattan önce ve sonra alınan örneklerin karşılaştırılmasıyla DNA miktarının ameliyat sonrası önemli düzeyde düştüğü not edilmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak rt-PCR kullanılarak serbest DNA miktarının belirlenmesinin meme kanserinin tanı ve tedavisinde önemli bir belirteç olabileceğini iddia etmişlerdir (Catarino vd., 2008).

Tümör ve normal hücrelere ait serbest DNA, hücrel nekroz ve apoptoz ile kan dolaşımına salınır. Schwarzenbach vd. (2008) kolorektal kanserli hastalarda serbest DNA'nın tanı ve tedavi için bir marker olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmak için 55 hasta ve 20 sağlıklı bireyin kanındaki serbest DNA konsantrasyonunu ölçmüşlerdir. Elde edilen sonuçlara göre hastalara ait serumların serbest DNA miktarı ortalaması 1157 ng/mL, minimum ve maksimum değerler ise sırasıyla 22 and 3922 ng/mL olarak ölçülmüştür. Buna karşılık kontrol grubuna ait serumlardaki serbest DNA miktarı ise oldukça düşük düzeydedir (5-16 ng/mL). Tedavi esnasında serbest DNA seviyeleri kemoterapik ajanlardan bağımsız olarak dalgalanmalar göstermiş; 1000 ng/mL yüksek olan değerler daha az bir sağ kalıma sahiptir ($p = 0,02$). Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak, diğer belirteçlerin yanında serbest DNA'nın kantitatif analizinin kolorektal kanseri için bir marker olabileceğini iddia etmişlerdir.

NET (Nötrofil ekstraselüler tuzakların) salınması doğuştan gelen bağışıklık tipi olarak yeni bir bağışıklık yanıtı olarak tanımlanmış ve son yıllarda yapılan çalışmalarda ilgi odağı haline gelmiştir. NET'ler nötrofilden türemiş serbest DNA'dan ve proteazlar gibi nötrofil sitoplazmadan türetilen proteinlerden oluşmaktadır. Lögters vd. (2009) yaptıkları çalışmada, septik artrit tanısı için NET'den türeyen serbest DNA'nın bir belirleyici olup olmadığını araştırmak amacıyla artrosentez geçirmiş 42 eklem efüzyonu olan hastanın sinoviyal sıvılarındaki serbest DNA miktarını belirlemişler ve belirledikleri bu değerleri beyaz kan hücreleri, C-reaktif protein (CRP) ile sinoviyal sıvıdaki beyaz kan hücreleri, interlökin 1 beta, interlökin 6, TNF alfa ve miyeloperoksidaz değerleri ile karşılaştırmışlardır. Yapılan bu karşılaştırma NET'ten türeyen ve sinoviyal sıvı içerisinde bulunan serbest DNA'nın septik artrit veya periprostetik enfeksiyon tanısı için bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

BRAF protoonkogenini onkogene dönüştüren ve V600E aminoasitte missense (kayıp) mutasyonu oluşturan bir nokta mutasyonu birçok papiller troit kanserli hastada bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada ligaz zincir reaksiyonu yöntemiyle benign ve malign troit kanserli 28 hastadan alınan tümör dokusu ve serum örnekleri *BRAF* mutasyonu açısından değerlendirilmiştir. Benign adenomlu, foliküler neoplazma veya kanserli ve troit lenfomalı hastalardan alınan tümör dokusundan izole edilen DNA numunelerinde *BRAF* mutasyonuna rastlanmamıştır. 14 papiller troit kanserli hastanın 5'inde mutasyona rastlanırken; 14 hastanın 3'ünde hem tümör hem de serum dokusunda mutasyon varlığı bulunmuştur. Bu hastaların 2'sinde lenf nodu metastazı, 2'sinde ise Hashimoto tiroiditi vardı. Bu bulgular serbest DNA'dan *BRAF* mutasyonlarının taranmasının mümkün olabileceğini göstermektedir (Chuang vd., 2010).

Ye vd. (2010) OSAHS (obstrüktif uyku apne hipopne sendromlu) bireylerde serum DNA konsantrasyonlarının yükselip yükselmediğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda OSAHS hastalarında serum serbest DNA konsantrasyonu hastalığın şiddetiyle pozitif korelasyon göstermiş ve OSAHS şiddetinin ve tedavinin etkililiğinin izlenmesi için serbest DNA'nın önemli bir parametre olabileceği öngörülmüştür.

Gao vd. (2010) Akut lösemili 60 hastadan ve 30 sağlıklı bireyden elde edilen plazma örneklerindeki serbest DNA miktarını belirlemek amacıyla q-PCR ile β -*aktin* genini amplifikasyonu gerçekleştirmişler ve DNA bütünlük indeksi q-PCR sonuçlarının oranı olarak hesaplamışlardır. Sonuçlar hasta bireylerde hem DNA konsantrasyonu hem de

DNA bütünlüğünün normal bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek çıktığını göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada 109 Endometriyal kanseri hastasından oluşan popülasyonda (87 hasta Tip 1 ve 22 hasta ile Tip 2) serbest DNA, p53 antikoru (p53-Ab) ve *KRAS* geni mutasyonlarının kanser gelişimdeki önemi değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre Tip 2 tümör ve p53 aşırı ekspresyonu arasında önemli bir bağlantı olduğu; kandaki p53-Ab ve serbest DNA Tip 2 tümör tedavisinde birer diagnoz, prognoz olarak kullanılabileceği görülmektedir. Ayrıca araştırmacılar rezidüel tümörün saptanmasıyla serbest DNA'nın ameliyat da dahil başarılı bir tedavi sürecinin belirlenmesinde kullanılabileceğini iddia etmişlerdir (Dobrzycka vd., 2010).

Apoptotik ve kanser hücrelerinden salınan DNA'ların bütünlüğünün farklı olduğu göz önüne alınarak renal hücre karsinomu hastalarında yapılan bir çalışma sonucunda; araştırmacılar tarafınadan serum serbest DNA bütünlüğünün bu hastalığı teşhisinde önemli bir araç olabileceği öngörülmüştür (Gang vd., 2010).

Fetal serbest DNA, noninvazif prenatal tanı için kullanılabilecek bir genetik materyal kaynağıdır. Genellikle maternal plazmada toplam serbest DNA'nın % 10'undan azını oluşturur, çoğunluğu anne kökenlidir. Serbest fetal DNA'nın verimini artırmak için koşulları optimize etmek, testin etkili bir şekilde uygulanması için çok önemli olacaktır. Bu amaçla Barrett vd. (2011) yapmış oldukları çalışmada maternal kan örneklerinden elde edilen fetal DNA verimini etkileyen faktörleri araştırmıştır. Bunlar arasında hücre stabilize edici ajanları içeren toplama tüplerinin değerlendirilmesi, depolama sıcaklığı, numune işleme aralığı ve kullanılan DNA ekstraksiyon yöntemi yer almaktadır. Çalışma sonucunda K3EDTA tüpünde saklandığında toplam serbest DNA miktarının önemli derecede arttığı, hücre stabilize tüplerinde ise çok az miktarda bulunduğu görülmüştür. Bu artış tamamen uzun DNA fragmanlarından kaynaklanmış, fetal ve kısa parçalardan oluşan DNA miktarında bir değişiklik olmamıştır. Zamanla fetal serbest DNA yüzdesi düşmüştür. Numunelerin 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmesi bu durumu engelleyici bir etki göstermemiştir. Araştırmacılar K3EDTA kullanımıyla kan alımından sonra 8 saat içerisinde numunelerin işlenebileceğini, daha uzun süreler için hücre stabilize tüplerinin daha uygun olduğunu ve DNA saflaştırma kiti kullanımının dagnostik testler için önemli olabileceğini belirtmişlerdir.

Anne kanında serbest DNA'nın kromozom seçici sekansının klinik uygulamasını ve İkiz hamileliklerde trizomi riskinin değerlendirilmesinde iki fetüsün düşük fetal fraksiyon katkısına dayanan bir algoritmayı incelemek amacıyla Gil vd. (2011) 10-13. haftalarda tarama yapılan 68 ikiz gebelikten ve 207 tekiz gebelikten elde edilen plazma örneklerinde serbest DNA testi ile trizomi 13, 18 ve 21 risklerini tahmin etmişlerdir. Trizomi için risk skorları rezerv plazma için 192 (% 92,8) ve olası vaka için ise 63 (% 92,6) olarak kaydedilmiştir. Retrospektif çalışmada 11 trizomik gebeliğin 10'u, prospektif çalışmada ise 3 trizomik gebelik yanlış pozitif oranı kullanılmadan doğru olarak tanımlanmıştır. Sonuçlar ikiz gebeliklerde serbest DNA testinin yapılabirliğini, sonuçların raporlama oranının düşük fetal fraksiyona bağlı olarak tekizlere göre düşük olduğunu göstermektedir.

Swystun vd. (2011) Kemoterapi alan meme kanseri hastalarında trombozun yaygın bir komplikasyon olduğunu, ancak meme kanseri kemoterapötik ajanlarının bu riski artırdığı mekanizmaların büyük oranda karakterize edilmediğini, hasar görmüş hücreler tarafından salınan nükleik asitlerin pıhtılaşmayı arttırabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu hipotezin gerçekliğini test etmek amacıyla meme kanseri kemoterapi ajanlarının, serbest DNA'nın salınışı üzerindeki etkilerini ve in vivo, in vitro yöntemler kullanarak trombin oluşumu ile olan ilişkisini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, kemoterapi alan hastalarda 24 saat sonra alınan numunelerden gerçekleştirilen ölçümlerde ve kemoterapik ajan (doksorubisin, epirubisin ve 5-fluorourasil) uygulanan sağlıklı farelerde serbest DNA seviyesinin arttığı görülmüştür. Kemoterapötik ajanlarla inkübe edilen venöz tam kan ve nötrofiller, plazma veya hücre süpernatantlarında serbest DNA'yı yükseltmiştir. Buna ek olarak, kemoterapi ile venöz tam kanın inkübasyonu histon-DNA kompleks seviyelerini azaltmıştır. Epirubisinle muamele edilen tam kandan salınan serbest DNA, trombin oluşumunu doza bağımlı bir şekilde yükseltmiştir. Böylece araştırmacılar kemoterapi ile hasar görmüş hücrelerden serbest DNA'nın salınmasıyla kanser hastalarında trombozun tetiklendiği yeni bir mekanizma oluşturabileceğini öne sürmüşlerdir.

Macher vd. (2012) rt-PCR aracılığıyla 65 şiddetli hastanın travmatik beyin hasarı sonrası ve bunun akabinde yoğun bakım ünitesinde 96 saat boyunca DNA plazma konsantrasyonlarını araştırmışlardır. Çalışmada serbest DNA seviyesi kontrol gruplarına kıyasla travmatik beyin hasarı sonrası alınan hasta örneklerinde oldukça yüksek

çıkıştır. Takip eden dört gün sonra, DNA miktarında 24 saatte % 51'lik ve 48 saatte % 71'lik bir düşüş gözlemlenmiştir.

Anne kanından elde edilen serbest DNA kullanılarak fetal trizomi 21 ve trizomi 18 riskinin prenatal değerlendirilmesi için yeni bir biyokimyasal analiz ve algoritma geliştirmeye çalışan Sparks vd. (2012) 250 trizomi 18, 72 trizomi 21 ve 16 trizomi 18 fetüse gebe kadınlardan numuneler almışlardır. Geliştirilen bu “fetal-fraction optimized risk of trisomy evaluation” (FORTE) isimli bu algoritmik yöntemle noninvazif fetal anöploidi saptamasının yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Ashoor vd. (2012) yaptıkları çalışmada, maternal serbest DNA'nın kromozom seçici sekansı ile trizomi 21 ve trizomi 18'in prenatal tespit oranı ve yalancı pozitif oranını değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla 300 öploidi, 50 trizomi 18 ve 50 trizomi 21 fetüsüyle hamile olan kadınlardan numuneler toplanmış ve kromozom seçici sekansı ile trizomi 18 ve trizomi 21 gebeliklerini öploidi gebeliklerinden % 98 oranında ayrılabilirdiğini rapor etmişlerdir.

Fetal trizomi 21 ve trizomi 18'in değerlendirilmesi için anne kanındaki serbest DNA'nın seçici analizine dayanan yeni prenatal bir analiz geliştirmeyi amaçlayan Sparks vd. (2012) 39 trizomi 21 ve 7 trizomi 18 fetal anöploidi içeren 290 gebeliği seçilmiş bölgelerin dijital analizi (DANSR™) olarak adlandırılan, yeni ve yüksek derecede multipleksli bir analiz kullanılarak analiz etmişlerdir. Sonuç olarak seçilen bölgelerin dijital analizi, oldukça doğru, düşük maliyetli ve ölçeklenebilir bir noninvazif fetal anöploidi değerlendirmesi sağlamıştır.

Hedefe yönelik tedavi uygulanmadan önce metastatik kolorektal kanserli hastalarda *K-RAS* gen mutasyonlarının değerlendirilmesindeki zorunluluğu dikkate alan Thierry vd. (2014) rutin yöntemlerle tümör dokusundan izole edilen DNA ile ve plazma serbest DNA'yı *K-RAS* ve *BRAF* mutasyon varlığını karşılaştırmışlardır. Mutasyon varlığı 106 hasta numunesinden bu iki yöntem ile belirlenmiş; serbest DNA'nın analiziyle *BRAF* V600E mutasyonu % 100 özgüllük ve duyarlılık göstermiştir. Test edilen yedi *KRAS* nokta mutasyonu için, yöntem % 98 özgüllük ve % 96'lık uyum değerine % 92 hassasiyet göstermiştir. Araştırmacılar bu verilere dayanarak serbest DNA analizi ile sıvı biyopsinin, avantajlı bir şekilde tümör kesit analizinin yerini alabileceği ve kanser

hastaları için kişiselleştirilmiş ilacın kapsamını genişletebileceğini gösterebileceğini rapor etmişlerdir.

Akciğer kanserli hastaların serbest DNA'sında epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyon testi klinik bir araç olabileceği düşünülse de, dokulardan izole edilen DNA ile yapılan EGFR mutasyon karşılaştırıldığında, serbest DNA'da yüksek oranda bölünmüş yapısı, tümör DNA'sının düşük oranı ve mevcut tespit teknolojilerinin sınırlamaları nedeniyle plazma testinin duyarlılığı henüz tatmin edici değildir. Bu nedenle Zhu vd. (2015) plazma EGFR mutasyonu (19. ekzon delesyonları ve L858R) testi için oldukça hassas ve spesifik bir damlacık dijital PCR yöntemi geliştirmişlerdir. EGFR mutasyonu açısından 86 akciğer kanseri hastasından alınan plazma serbest DNA, tümör dokularından izole edilen DNA ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak EGFR mutasyon tespiti için oldukça hassas ve spesifik damlacık dijital PCR deneylerinin klinik kan testlerinde kullanım potansiyelinin olabileceği rapor edilmiştir.

Zill vd. (2015) pankreatik ve biliyer karsinomlu hastalarda biyopsilerin genellikle moleküler karakterizasyon için yetersiz olduğundan bu hastalarında kişiselleştirilmiş tedavi seçeneklerinden yoksun olduğunu, serbest DNA dizilemesinin bu açığı giderecek onkoloji yaklaşımı mümkün kılabileceğini hipoteze dayanarak, 26 hastada tümör ve serbest DNA'da 54 geni prospektif olarak analiz etmişlerdir. Araştırmacılar serbest DNA dizilemesinin, tümör genotipinin önceden bilinmesi veya dolaşımdaki tümör DNA'sının çokuluğuna gerek duyulmadan tümörden türeyen mutasyonların belirlenmesinde uygulanabilir, doğru ve duyarlı olduğunu göstermişlerdir.

Wyatt vd. (2016) enzimutamid ile tedavi edilen metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserli 65 hastadan seri olarak toplanan serbest DNA üzerinde entegre genomik profillemeye yapmışlar ve hem primer direnç hem de edinilmiş direnç ile ilişkili aberasyonlar belirlemişlerdir. Hemen hemen bütün metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserli hastalarda serbest DNA'nın klinik genomik profillemesi uygulanabilir olup enzimutamid direncinde önemli ipuçları verebilir.

Tümör genotipleme küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisine rehberlik etmek için güçlü bir belirteç olsa da geniş bir tarama gereksiz olabilmektedir. Paweletz vd. (2016) genotiplemeyi kolaylaştırmak amacıyla, plazma serbest DNA'da yapılabilen mutasyonları ve yeniden düzenlenmeleri saptamak üzere bir masaüstü sekanslayıcısı

kullanan yeni nesil sekanslama geliştirmişlerdir. Bu hastalıkla ilişkilendirilen 11 onkogen ile oluşturulan NGS paneli aracılığıyla, bu yaklaşımın yeniden düzenlenmeler ve EGFR C797S gibi beklenmedik direnç mutasyonları gibi karmaşık mutasyonlar da dahil olmak üzere yanlış pozitif oran olmaksızın küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hedeflenebilir genomik değişikliklerin geniş bir yelpazesi saptanmıştır.

Günümüzde serbest DNA kullanılarak geliştirilen test sisteminin, invazif olmaması ve bu yüzden de invazif testlerde var olan riskleri taşımaması, saatler içerisinde sonuç vermesi gibi avantajları bulunmaktadır. Kashyap vd. (2017) yapmış oldukları çalışmada, anöploidi etkeni dikkate alındığında, serbest DNA kullanılarak yapılan prenatal test sonuçlarının invazif testler ile hemen hemen aynı sonucu verdiğini göstermişlerdir.

Böbrek transplantasyonlarında allogreft biyopsi örneklerinin histolojik analizi, doku reddini diğer hasarlardan ayırt etmek için kullanılmaktadır. Bloom vd. (2017) allogreft reddi ve hasar durumunun değerlendirilmesinde dōnor kökenli serbest DNA seviyesinin yapılan testin histolojik analize göre daha hassas ve niceliksel olabileceğini hipotez etmişlerdir. Bu amaçla yapmış oldukları çalışma da, plazmadan elden edilen serbest DNA'nın allogreft reddi ve hasarının değerlendirilmesinde kullanılabileceğini; %1'den az serbest DNA seviyesinin aktif reddin olmadığına ve %1'den fazla serbest DNA seviyesinin ise muhtemelen aktif doku reddine işaret ettiğini belirtmişlerdir.

Akciğer kanseri dokuları heterojen olup, çeşitli somatik mutasyon ve somatik kopya sayısı değişiklikleri içerdiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, hedeflenen yeni nesil sekans paneli (next generation sequencing (NGS) panel) aracılığıyla metastatik akciğer kanserli kadınların serbest DNA'larında somatik mutasyonlar ve gen amplifikasyonu taranmıştır. Elde edilen sonuçlar, hedeflenen NGS aracılığıyla yapılan serbest DNA taramalarının dinamik tümör heterojenitesinin analizi hedefe yönelik terapinin tasnifi için hem mutasyonlar hem de gen amplifikasyonu yoluyla hedefe yönelik tedavilere yanıtının izlenmesinin mümkün olabileceğine işaret etmektedir (Page vd., 2017).

Onkolojide antianjiyogenik ilaçlar, metastatik kolorektal kanserli hastalarda sıklıkla kullanılmasına rağmen, bu hastaların çoğunda direnç oluşmakta ve literatür incelendiğinde direnci oluşturan etmenler tam olarak bilinmemektedir. Toledo vd. (2017) yaptıkları çalışmayla, basit bir şekilde metastatik kanser hastalarından alınan

kanla, NGA aracılığıyla serbest DNA'da tüm ekzom dizi analizinin (whole exome sequencing, WES) somatik mutasyonlarının izlenmesi için güçlü bir invazif olmayan gen platformu olabileceğini göstermişlerdir ve daha önce araştırılmamış olan VEGFR 2 mutantlarının onkogenik ve kanser terapi tedavisini hafifleten rolü yine bu çalışmada karakterize edilmiştir.

Yayımlanan bir derlemede, daha önce yapılmış olan ve akciğer kanserli hastaların serbest DNA'larını konu alan 17 çalışmanın sonuçları analiz edilmiş ve serbest DNA miktarının akciğer kanserinin önceden tahmini için önemli bir veri olabileceği ileri sürülmüştür (Cargnin vd., 2017).

Hampson vd. (2017) çalışmalarından elde ettikleri bulgulara dayanarak nötrofil fonksiyonu, immatür granülosit sayımı ve plazma serbest DNA seviyesinin yanık sonrası oluşan sepsisin erken diagnozu için potansiyel biyomarkerler olabileceğini iddia etmişlerdir.

Fiberoptik bronkoskopi ve transbronşiyal akciğer biyopsisi, insan akciğer transplantasyonundan sonra, akut doku reddinin belirlenmesinde kullanılan temel yöntemlerdir. Ancak bu yöntemler için prosedürler pahalı olmakla birlikte ve invazif girişimlere gerek duyulmaktadır. Zou vd. (2017) bu yöntemlere gerek duyulmadan, dijital PCR kullanılarak ölçülen serbest DNA'nın miktarının akut akciğer allograft doku reddi için önemli bir biyomarker olabileceğini bildirmişlerdir.

Hidroksimetilsitozin (Hydroxymethylcytosine, 5hmC), kanser patogenezi ve gen regülasyonu ile ilişkilendirilen bir epigenetik modifikasyondur. Yapılan bir çalışmada, değişik kanser tiplerine sahip bireylerde 5hmC'nin kanser tiplerinin diagnozunda kullanılabilmesini, hatta bazı kanser tiplerinde tümör aşamalarının takibinde önemli bir parametre olabileceği beyan edilmiştir (Song vd., 2017).

PARP (Poly ADP-ribose polymerase), çok sayıda endojen veya çevresel genotoksik ajana karşı proteinlerin translasyon sonrası yanıtından sorumlu olan bir enzimdir. ATM, DNA-PK ve p53 gibi moleküllerle benzer bir davranış sergileyerek, DNA'da oluşan hasara karşı tepki olarak aktifleşmekte; DNA tamiri ve genomik stabilitede, ayrıca programlı hücre ölümü yani apoptozis ve otofaji regülasyonlarında önemli görevler üstlenmektedir (Herceg ve Wang, 2001). Eşeyssel BRCA1 ya da BRCA2 mutasyona

sahip bireylerde platin bazlı kemoterapi ya da PARP inhibisyonuna direnç, BRCA1 ya da BRCA2 fonksiyonlarını restore eden somatik reversiyon mutasyonları veya intronlarda oluşan delesyonları oluşturabilir. Yapılan çalışmada, daha önce platin ve/veya PARP inhibitörü ile tedavi gören ovaryum veya meme kanserli hastalarında BRCA1 veya BRCA2 reversiyon mutasyonlarına sahip olup olmadıkları araştırılmış ve bu reversiyon mutasyonlar ovaryum kanseri hastalarda %21, meme kanseri hastalarında ise %40 oranında tanımlanmıştır. Daha önce herhangi bir tedavi almayan ve PARP inhibitörü almaya başlayan bireylerde, PARP inhibitörü almadan hemen önce serbest DNA'larında BRCA 2 reversiyon mutasyonları gözlenmiş, ancak PARP inhibitörü tedavisinden sonra bu mutasyonun sıklığı artmıştır. Elde edilen sonuçlar, ovaryum ve meme kanserli hastalarda beklenen BRCA1 veya BRCA2 mutasyonlarının serbest DNA sekans analizi ile taranabileceğini göstermektedir (Weigelt vd., 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma etiği

01.01.2017 - 31.12.2017 tarihleri arasında Erzincan Üniversitesi Rektörlüğü, Etik Kurulu Başkanlığı (Sayı: 44495147 / 52 - 7690) tarafından onaylanan “Mesane Neoplazili Hastalarda Kanda Serbest DNA (Free DNA) Çalışılması ve Histopatolojik Kolerasyonun Değerlendirilmesi” isimli çalışma kapsamında Erzincan Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesinin Üroloji kliniğine başvuran ve mesane kanseri teşhisi konulan hastalardan Öğretim Üyesi Dr. Aliseydi BOZKURT tarafından kan numuneleri alınarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Kan numuneleri alınan bütün hastaların bilgilendirilmesi ve rızası önemlidir. Bu nedenle kan numunesi alınmadan önce işlemin neden yapılacağı, hastaya herhangi bir zararının dokunmayacağı, mahremiyetin mutlaka sağlanacağına dair bilgiler hastaya anlatılmıştır.

3.1.2. Örneklerin elde edilmesi

Çalışmada 55 bireyden alınan numuneler analiz edilmiştir. Bu bireylerin 30’u kontrol grubunda olup yaş ortalamaları 67,03’tür. Mesane kanseri olan bireylerin sayısı ise 25 olup yaş ortalamaları 68,73’tür. Hastalardan 21’i erkek, 4’ü ise bayan olup en düşük yaş 37, en yüksek yaş ise 84 olarak kaydedilmiştir. Yine bu grupta hastalık düzeyi 13 hastada yüksek dereceli iken, 12 hastada düşük derecelidir. Hastalık 16 hastada invaziv, 9 hastada ise non-invaziv olarak seyretmiştir. Kontrol grubundan tek seferlik kan alımı yapılmıştır. Hasta grubunda ise ameliyattan önce (Pre-op), ameliyattan hemen sonra (Post-op 1) ve ameliyattan bir ay sonra (Post-op 2) olmak üzere üç defa kan alımı yapılmıştır.

Alınan periferik kan numuneleri zaman kaybetmeden (20 ml civarı) EDTA’lı jelsiz tüpte 2500 xg’de 10 dakika santrifüj işleminden geçirilmiştir. Süpernatant alınarak steril bir tüpe aktarılmış ve 16.000 xg’de 10 dakika daha santrifüjlenmiştir. Elde edilen yeni süpernatant yeni bir steril bir tüpe aktarılmış ve -80 C°’de muhafaza edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA izolasyonu

Çalışmamızda serbest DNA'nın izolasyonu için Norgen firmasından alınan Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mikro Kit (Cat. 55500) kullanılmıştır. Kitin standart prosedürü dikkate alınarak aşağıdaki işlem basamaklarına göre gerçekleştirilmiştir.

1. 200 µL plazma örneği 2 mL'lik ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 10 µL proteinaz K eklenerek 10 saniye boyunca vortekslenmiştir. Tüp akabinde 60 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyondan sonra 600 µL Binding Buffer B tüpe eklenmiş ve tüp 10 saniye boyunca vortekslenmiştir.
3. Elde edilen karışımdan 400 µL'lik sıvı kit içeriğinde verilen ve koleksiyon tüpü takılan mikro spin kolona aktarılmıştır. Spin kolon 3,300 xg'de (~6,000 RPM) santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atıldıktan sonra aynı koleksiyon tüpü yeniden spin kolona takılmıştır.
4. Bu işlem basamağında 2. işlem basamağında kalan karışım için 3. işlem basamağındaki prosedür yeniden uygulanmıştır.
5. Spin kolona 500 µL WN solüsyonu eklenmiş ve kolon 3,300 x g'de (~6,000 RPM) 1dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atıldıktan sonra aynı koleksiyon tüpü yeniden spin kolona takılmıştır.
6. Spin kolona 500 µL Wash Solution A (yıkama solüsyonu) eklenmiş ve kolon 3,300 x g'de (~6,000 RPM) 1dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atıldıktan sonra aynı koleksiyon tüpü yeniden spin kolona takılmıştır.
7. 6. işlem basamağı yeniden uygulanmıştır.
8. Boş kolona 13,000 x g'de (~14,000 RPM) 2 dakika santrifüj edilmiş ve bu işlemden sonra koleksiyon tüpü atılmıştır.
9. Spin kolona 1.7 mL'lik temiz bir elüsyon tüpü takılmış ve üzerine 50 µL Elution Buffer B eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra sırasıyla 400 x g'de (~2,000 RPM) 1 dakika ve 5,800 x g'de (~8,000 RPM) 2 dakika santrifüj edilmiştir.

10. Daha fazla DNA eldesi için elüsyon tüpündeki sıvı yeniden spin kolona aktarılarak 9. işlem basamağındaki prosedür yeniden uygulanmıştır.
11. Elde edilen DNA örnekleri miktar tayini ve akabinde rt-PCR uygulamaları için -20 C⁰'de muhafaza altına alınmıştır.

3.2.2. DNA miktarının hesaplanması

Örneklerdeki florometrik serbest DNA miktar tayinini gerçekleştirmek amacıyla tek zincirli DNA ölçümleri için Qubit™ ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher, Katalog no: Q10212), çift zincirli DNA ölçümleri için Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher, Katalog no: Q32851) kullanılmıştır. Florometrik ölçümler için Qubit 4 florometre (Thermo Fisher, Katalog no: Q33226), spektrofotometrik ölçümler için ise Multiskan GO (Thermo Fisher, Katalog no: N10588) cihazına entegre edilen µDrop™ Plate (Thermo Fisher, Katalog no: N12391) ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. SNP analizi

UV (Ultraviyole) fotometrisi örneklerdeki nükleik asitlerin miktarını ölçmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Hem DNA hem de RNA, UV ışığını kuvvetli bir şekilde absorbe etmektedir; böylelikle herhangi bir numunedeki kantifikasyonu kolay bir şekilde sağlar. Florometrik metot Lambert-Beer denklemini temel almaktadır ve nükleitlerdeki azotlu bazların 260 nm'de absorpsiyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir. Numunelerdeki kirlilik nükleik asit ve proteinlerin çok düşük absorpsiyon gösterdiği bir dalga boyu daha kullanılarak belirlenebilir. Bunun için 320 nm ideal bir dalga boyudur. Son yıllarda serbest DNA'nın saflaştırılmasında manyetik boncuklar kullanılmaktadır; böyle bir saflaştırmada 320 nm dalga boyunu kullanmak özellikle önerilmektedir. Çalışmamızda µDrop™ Plate ile yapılan DNA miktar tayininde hem 260 hem de 320 nm dalga boyları kullanılarak ideal sonuçlara ulaşılmaya çalışılmıştır. Ayrıca hem florometrik hem de fotometrik analizlerdeki değerler ng/µL cinsinden hesaplanmıştır.

TaqMan SNP genotipleme aracılığıyla üzerinde çalışılan gen isimleri ve polimorfizmin beklendiği lokasyonun referans numaraları şu şekildedir:

1. *CCAT2*, rs6983267
2. *HRAS*, rs12628

3. *MIR146A*, rs2910164

4. *RET*, rs1799939

Çalışmada kullanılan ve “Applied Biosystems™ TaqMan® SNP Genotyping Assays” ticari isimle satılan test sistemleri saflaştırılmış genomik DNA örneklerinde amplifikasyon ve spesifik polimorfizmlerin taranması için TaqMan® 5’ nucleaz kimyasalını kullanır. Her test bir SNP’nin genotiplenmesine olanak tanımaktadır. Bu test ilgilenilen polimorfik sekansın amplifikasyonu için tasarlanmış diziye özel ileri ve geri primerler ile floresan olmayan söndürücülü (nonfluorescent quenchers (NFQ)) allel 1 sekansını tarayan VIC™ işaretli ve allel 2 sekansını tarayan FAM™ işaretli iki tane TaqMan® ikincil oluk bağlayıcı prob (minor groove binder (MGB) probes) içermektedir. Detaylı bilgi Thermofisher firmasının web sitesinde yayımlanan TaqMan® SNP Genotyping Assays (Pub. No. MAN0009593, Rev. B.0) isimli kullanıcı rehberinde verilmiştir.

Tablo 3.1. Allel-boya etkileşim örneği.

Sekans Dizisi 5’→3’	SNP Alleleri	VIC™ ile İlişkilendirilen Allel	FAM™ ile İlişkilendirilen Allel
...CCCACCCTTC[G/A]ACACTATTAC...	[G/A]	G	A
...ATTAACCCAT[T/C]AGTGATGGGG...	[T/C]	T	C
...AAGCAACTAT[G/A]TTCATAACTT...	[G/A]	G	A
...AACCGTGTGA[T/C]GGCAGTGATT...	[T/C]	T	C

TaqMan® SNP Genotyping Assays, Pub. No. MAN0009593, Rev. B.0

Her test sistemi için hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği ve miktarı Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Reaksiyon bileşen ve miktarları.

Bileşen	Miktar (µl)
Master Mix 2x	10
Genotyping Assay 20x	1
dH ₂ O	7
Örnek	2

Test sistemleri için uygulanan termal koşulların sıcaklık, zaman ve döngü sayılarına ait bilgiler Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Uygulanan termal koşulların sıcaklık, zaman ve devir bilgileri.

Adım	Sıcaklık	Süre	Devir
Ön okuma	60 °C	30 saniye	Hold
İlk denatürasyon / Enzim aktivasyonu	95 °C	5 dakika	Hold
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	40
Primerlerin bağlanması / Uzama	60 °C	90 saniye	40
Son okuma	60 °C	30 saniye	Hold

Flüoresan sinyaller ve örnek sekans arasındaki korelasyona ait bilgiler Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Flüoresan sinyaller ve örnek sekans arasındaki korelasyon.

Flüoresan Sinyalleri	Örnek Genotip
VIC™ sinyali	1. allel için homozigot
FAM™	2. allel için homozigot
VIC™ ve FAM™ sinyalleri	1. allel ve 2. allel için heterozigot

TaqMan® SNP Genotyping Assays, Pub. No. MAN0009593, Rev. B.0

3.2.4. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi

Kategorik değişkenler n (%), sürekli değişkenler ile ilgili tanımlayıcı istatistikler ise ortalama \pm standart sapma, medyan (minimum – maksimum) değer şeklinde özetlenmiştir. Kategorik değişkenlerin analizinde uygun ki-kare testi kullanılmış ve hastalık riski için OR (odds ratio) hesaplanmıştır. Sürekli değişkenlerde normal dağılım varsayımı Shapiro-Wilks normallik testi ile kontrol edilmiştir. DNA miktarları normal dağılmadığı için, analizde Kruskal-Wallis ANOVA kullanılmış ve çoklu karşılaştırma olarak Dunn's test uygulanmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda düzeltilmiş p değerleri sunulmuştur. Değerlendirmelerde $p < 0,05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Verilerin analizinde IBM SPSS ver. 19 paket programı (IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.) kullanılmıştır.

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

4.1. Sonuç

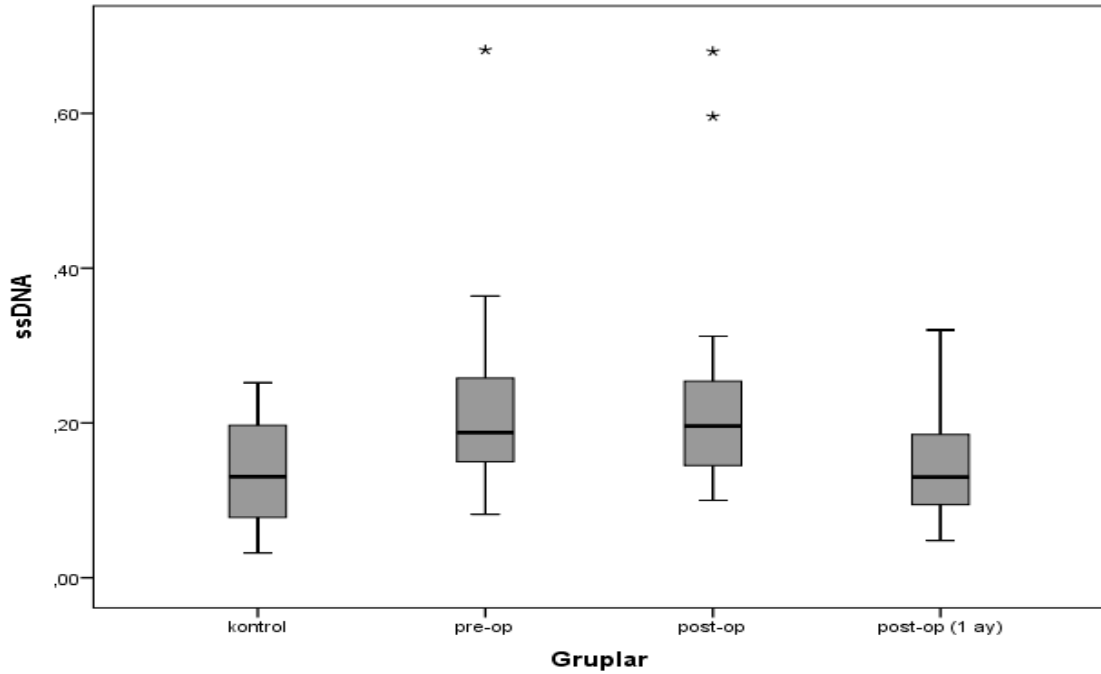
Çalışmanın ilk kısmında serbest DNA miktarları kontrol grubu ve hasta grubunun farklı zaman noktalarında analiz edilmiş ve miktarlarla ilgili tanımlayıcı istatistikler sunulmuştur. Tabloda ssDNA (single strand DNA, tek zincirli DNA), dsDNA (double strand DNA, çift zincirli DNA) ve bu iki DNA'nın toplamı olan tDNA (total DNA, toplam DNA) Qubit 4 ile yapılan florometrik ölçümleri göstermektedir. Serbest DNA düzeyleri bütün gruplar arasında yapılan karşılaştırmada ssDNA, dsDNA ve tDNA'da istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmektedir. μ Drop Plate ile yapılan toplam serbest DNA ölçümü karşılaştırmalarında diğer parametrelerde olduğu gibi normal dağılım varsayımı sağlanmadığından Kruskal-Wallis test kullanıldı; ancak Kruskal-Wallis test sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmadığı için ikili karşılaştırmalar yapılamamıştır (Tablo 4.1., Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4.).

Tablo 4.1. Kontrol, ameliyat öncesi ve sonrasında alınan numunelerdeki DNA miktarlarına ait tanımlayıcı istatistikler.

	Kontrol	Pre-op	Post-op 1	Post-op 2	p
ssDNA	0,137±0,064 0,130 (0,030-0,250)	0,224±0,125 0,188 (0,080-0,680)	0,236±0,147 0,196 (0,100-0,680)	0,144±0,081 0,130 (0,050-0,320)	0,002
dsDNA	0,092±0,094 0,053 (0,050-0,470)	0,072±0,035 0,051 (0,050-0,160)	0,057±0,020 0,050 (0,050-0,120)	0,046±0,017 0,050 (0,010-0,060)	0,002
tDNA	0,229±0,110 0,215 (0,080-0,620)	0,296±0,128 0,266 (0,130-0,730)	0,293±0,165 0,246 (0,150-0,800)	0,190±0,085 0,170 (0,100-0,370)	0,010
μDrop Plate ile yapılan toplam serbest DNA ölçümü	49,51±11,23 48,75 (30,25-73,50)	60,24±27,43 53,50 (37,50-146,30)	50,94±9,96 50,94 (36,50-70,50)	50,59±16,49 50,13 (35,50-109,50)	0,343

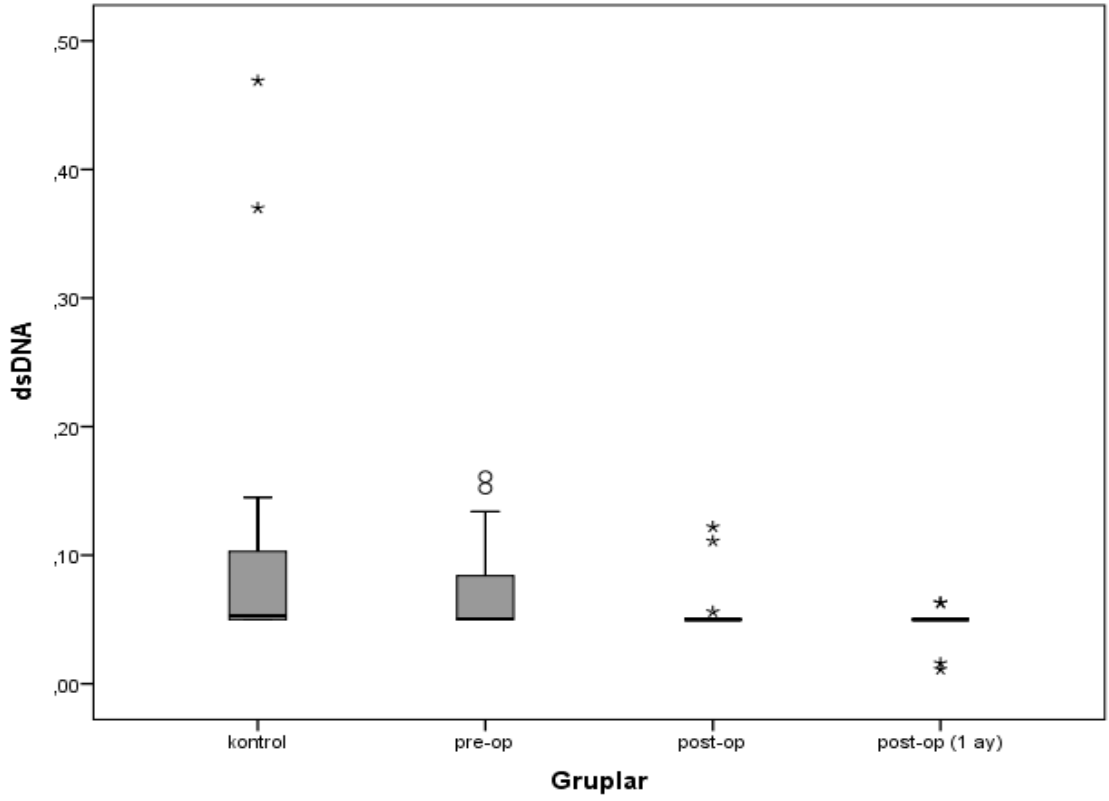
Tanımlayıcı istatistikler Ortalama±Standart Sapma, Medyan, (Minimum-Maksimum) şeklinde sunulmuştur.

ssDNA miktarları, kontrol, pre-op, post-op 1 ve post-op 2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir ($p=0,002$). İkili grup karşılaştırmaları incelendiğinde kontrol grubu ile pre-op arasında DNA miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,014$). Benzer şekilde kontrol grubu ile post-op 1 grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık varken ($p=0,019$), kontrol grubu ile post-op 2 grubu arasında ($p=1,000$), preop grubu ile post-op 1 grubu arasında ($p=1,000$), preop grubu ile post-op 2 grubu arasında ($p=0,140$) ve post-op 1 grubu ile post-op 2 grubu arasında ($p=0,161$) istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır (Şekil 4.1.).



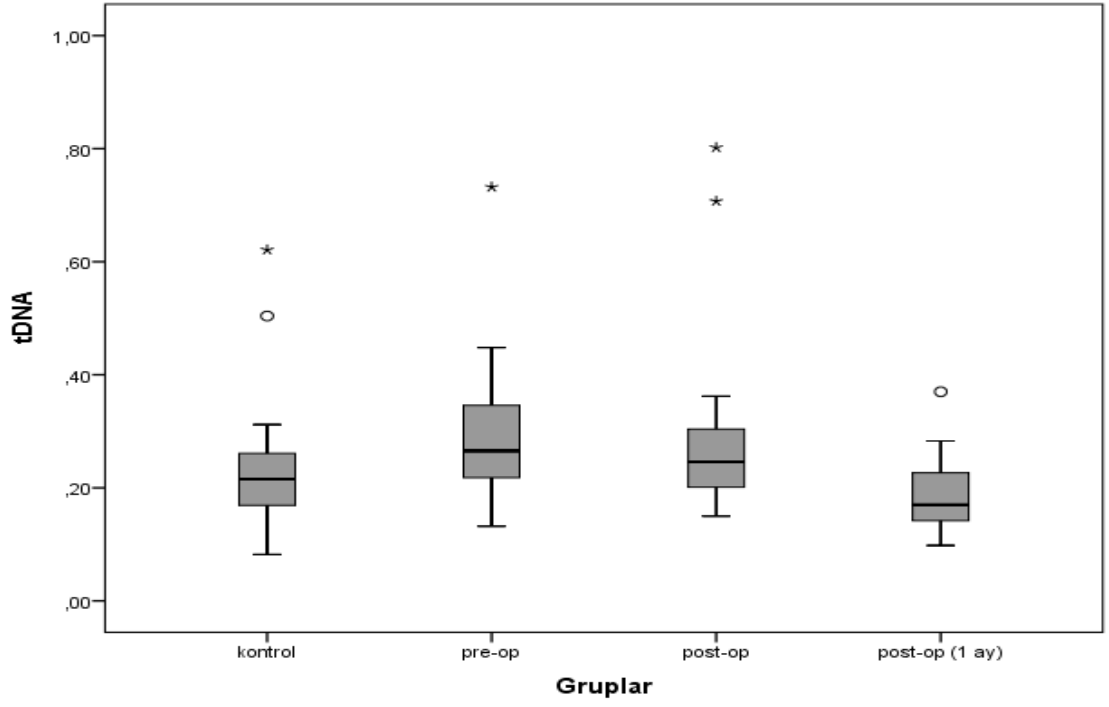
Şekil 4.1. Gruplara ait ssDNA miktarının grafiksel gösterimi

dsDNA miktarları kontrol, pre-op, post-op 1 ve post-op 2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir ($p=0,002$). İkili grup karşılaştırmaları incelendiğinde kontrol grubu ile pre-op arasında DNA miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=1,000$). Kontrol grubu ile post-op 1 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmıştır ($p=0,019$). Benzer şekilde kontrol grubu ile post-op 2 grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,019$). Preop grubu ile post-op 1 grubu arasında ($p=0,168$), preop grubu ile post-op 2 grubu arasında ($p=0,107$) ve post-op 1 grubu ile post-op 2 grubu arasında ($p=1,000$) istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır (Şekil 4.2.).

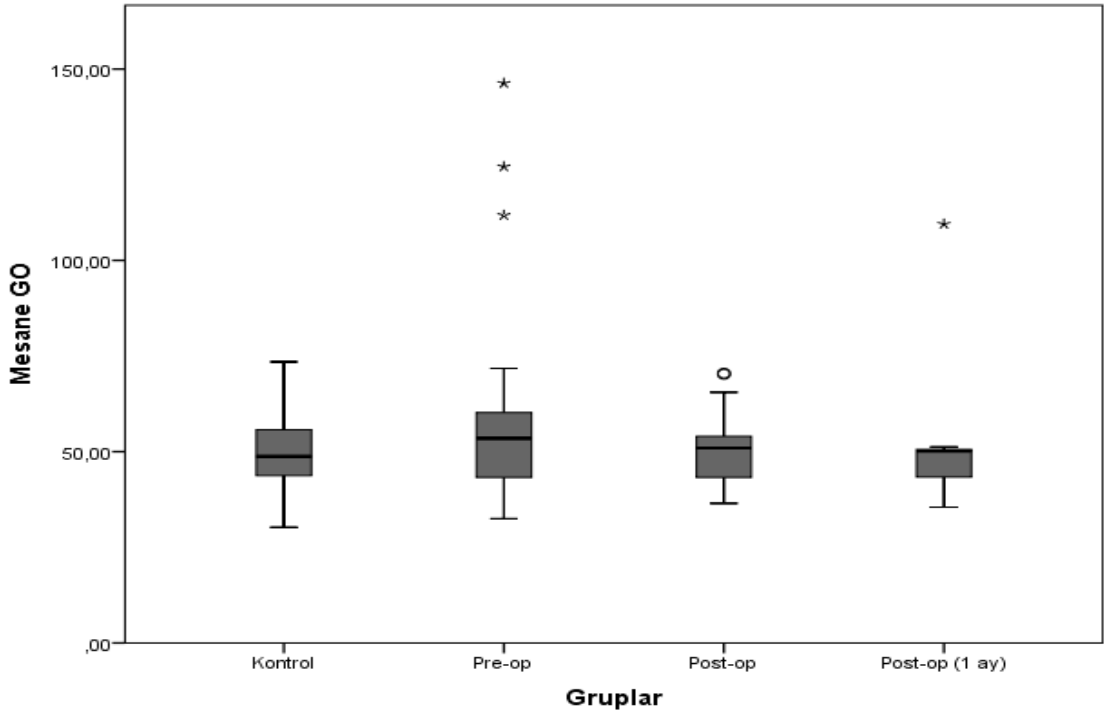


Şekil 4.2. Gruplara ait dsDNA miktarının grafiksel gösterimi

tDNA miktarları kontrol, pre-op, post-op 1 ve post-op 2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir ($p=0,010$). İkili grup karşılaştırmaları incelendiğinde kontrol grubu ile pre-op arasında DNA miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=0,120$). Benzer şekilde kontrol grubu ile post-op 1 grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır ($p=0,568$). Kontrol grubu ile post-op 2 grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=1,000$). Preop grubu ile post-op 1 grubu arasında ($p=1,000$) ve post-op 1 grubu ile post-op 2 grubu arasında ($p=0,105$) istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmazken, preop grubu ile post-op 2 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmıştır ($p=0,024$) (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Gruplara ait tDNA miktarının (ssDNA+dsDNA) grafiksel gösterimi



Şekil 4.4. Gruplara ait toplam fotometrik serbest DNA miktarının grafiksel gösterimi

CCAT2 genine ait allel frekansları sağlıklı bireyler ile mesane kanserli bireyler arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,205$). Mesane kanserli grupta T allelinin oranı %67,4 iken, kontrol grubunda bu oran %55,2 olarak kaydedilmiştir. *CCAT2* geninde T alleleline sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 1,68; %95 G.A.: 0,75-3,75). Benzer şekilde G alleleline sahip olmak da risk faktörü değildir (OR: 0,59; %95 G.A.: 0,26-1,33) (Tablo 4.2.).

CCAT2 genine ait genotip oranları sağlıklı bireyler ile mesane kanserli bireyler arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,154$). Mesane kanserli grupta TT genotipinin oranı %43,5 ve GT genotipinin oranı %47,8 iken, kontrol grubunda TT genotipinin oranı %31,0, GT genotipinin oranı %48,3 olarak kaydedilmiştir. *CCAT2* geninde GG genotipi referans alındığında TT genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 3,30; %95 G.A.: 0,50-20,90). Benzer şekilde GT genotipine sahip olmak da hastalık için risk faktörü değildir (OR: 2,40; %95 G.A.: 0,40-14,00). TT genotipi referans alındığında GG genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 0,30; %95 G.A.: 0,05-1,88). Benzer şekilde GT genotipine sahip olmak da hastalık için risk faktörü değildir (OR: 0,71; %95 G.A.: 0,21-2,34) (Tablo 4.2.).

CCAT2 genindeki TT ve GT genotip birleşimi mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,234$). Mesane kanserli grupta TT+GT genotip oranı %91,3, GG genotip oranı %8,7 iken, kontrol grubunda TT+GT genotip oranı %79,3, GG genotip oranı %20,7 olarak kaydedilmiştir. *CCAT2* geninde GG genotipi referans alındığında TT veya GT genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 2,74; %95 G.A.: 0,50-15,09) (Tablo 4.2.).

CCAT2 genindeki GG ve GT genotip birleşimi mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,355$). Mesane kanserli grupta GG+GT genotip oranı %56,5 ve TT genotip oranı %43,5 iken, kontrol grubunda GG+GT genotip oranı %69,0 ve TT genotip oranı %31,0 olarak kaydedilmiştir. *CCAT2* geninde TT genotipi referans alındığında GG veya GT genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 0,59; %95 G.A.: 0,19-1,83) (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. *CCAT2* (rs6983267) geninde kaydedilen tek nokta polimorfizmi.

<i>CCAT2</i> Geni			Grup		P Değeri
			Kontrol	Mesane	
Allel	T	n	32	31	0,205
		%	55,2	67,4	
	G	n	26	15	
		%	44,8	32,6	
Genotip	TT	n	9	10	0,154
		%	31,0	43,5	
	GT	n	14	11	
		%	48,3	47,8	
	GG	n	6	2	
		%	20,7	8,7	
Genotip	TT+GT	n	23	21	0,234
		%	79,3	91,3	
	GG	n	6	2	
		%	20,7	8,7	
Genotip	GG+GT	n	20	13	0,355
		%	69,0	56,5	
	TT	n	9	10	
		%	31,0	43,5	

HRAS genine ait allel frekansları mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,029$). Mesane kanserli grupta T alleli oranı %76,1 iken, kontrol grubunda bu oran %55,4 olarak kaydedilmiştir. *HRAS* geninde T alleleline sahip olmak hastalık riskini 2,6 kat arttırmaktadır (OR: 2,60; %95 G.A.: 1,10-6,10). C alleleline sahip olmak 2,6 kat koruyucu bir etki yaratmaktadır (OR: 0,39; %95 G.A.: 0,16-0,91) (Tablo 4.3.).

HRAS genine ait genotip oranları mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,022$). Mesane kanserli grupta TT genotipinin oranı %65,2 ve TC genotipinin oranı

%21,7 iken, kontrol grubunda TT genotipinin oranı %21,4 ve TC genotipinin oranı %67,9 olarak kaydedilmiştir. *HRAS* geninde CC genotipi referans alındığında TT genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 2,50; %95G.A.: 0,40-16,00). Benzer şekilde TC genotipine sahip olmak da hastalık için risk faktörü değildir (OR: 0,27; %95 G.A.: 0,04-1,70). TT genotipi referans alındığında CC genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 0,40; %95 G.A.: 0,06-2,60). TC genotipine sahip olmak 9,10 kat koruyucu bir etki yaratmaktadır (OR: 0,11; %95 G.A.: 0,03-0,41) (Tablo 4.3.).

HRAS genindeki TT ve TC genotip birleşimi mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,797). Mesane kanserli grupta TT+TC genotip oranı %87,0 ve CC genotip oranı %13,0 iken, kontrol grubunda TT+TC genotip oranı %89,3 ve CC genotip oranı %10,7 olarak kaydedilmiştir. *HRAS* geninde CC genotipi referans alındığında TT veya TC genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 0,80; %95 G.A.: 0,15-4,40) (Tablo 4.3.).

HRAS genindeki TC ve CC genotip birleşimi mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,002). Mesane kanserli grupta TC+CC genotip oranı %34,8 ve TT genotip oranı %65,2 iken, kontrol grubunda TC+CC genotip oranı %78,6 ve TT genotip oranı %21,4 olarak kaydedilmiştir. *HRAS* geninde TT genotipi referans alındığında TC veya CC genotipine sahip olmak hastalık için 6,66 kat koruyucu etki sağlamaktadır (OR: 0,15 ; %95 G.A.: 0,04-0,51) (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. *HRAS* (rs12628) geninde kaydedilen tek nokta polimorfizmi.

<i>HRAS</i> Geni			Grup		P Değeri	
Allel			Kontrol	Mesane		
T	n		31	35	0,029	
	%		55,4	76,1		
	C	n		25		11
		%		44,6		23,9

Tablo 4.3.'ün devamı.

Genotip	TT	n	6	15	0,022	
		%	21,4	65,2		
	TC	n	19	5		
		%	67,9	21,7		
	CC	n	3	3		
		%	10,7	13,0		
Genotip	TT+TC	n	25	20	0,797	
		%	89,3	87,0		
	CC	n	3	3		
		%	10,7	13,0		
Genotip	TC+CC	n	22	8		0,002
		%	78,6	34,8		
	TT	n	6	15		
		%	21,4	65,2		

MIR146A genine ait allel frekansları mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,759$). Mesane kanserli grupta G alelinin oranı %83,3 iken, kontrol grubunda bu oran %81,0 olarak kaydedilmiştir. *MIR146A* geninde G alleleline sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 1,17; %95 G.A.: 0,43-3,19). Benzer şekilde C alleleline sahip olmak da risk faktörü değildir (OR: 0,85; %95 G.A.: 0,31-2,33) (Tablo 4.4.).

MIR146A genine ait genotip oranları mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,480$). Mesane kanserli grupta GG genotipinin oranı %75,0 ve GC genotipinin oranı %16,7 iken, kontrol grubunda GG genotipi %62,1 ve GC genotipi %37,9 olarak kaydedilmiştir. Genotiplerdeki frekans sayılarının çok düşük olması sebebiyle genotip bazında OR sunulamamıştır (Tablo 4.4.).

MIR146A genindeki GC ve GG genotip birleşimi mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,113$). Mesane kanserli grupta GC+GG genotip oranı %91,7 ve CC genotip oranı %8,3 iken, kontrol grubunda GC+GG genotip oranı %100,0, CC genotip oranı %0,0 olarak kaydedilmiştir. Genotiplerdeki frekans sayılarının çok düşük olması sebebiyle genotip bazında OR sunulamamıştır (Tablo 4.4.).

MIR146A genindeki CC ve GC genotip birleşimi mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,315$). Mesane kanserli grupta CC+GC genotip oranı %25,0 ve GG genotip oranı %75,0 iken, kontrol grubunda CC+GC genotip oranı %37,9 ve GG genotip oranı %62,1 olarak kaydedilmiştir. *MIR146A* geninde GG genotipi referans alındığında CC veya GC genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 0,55; %95 G.A.: 0,17-1,79) (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. *MIR146A* (rs2910164) geninde kaydedilen tek nokta polimorfizmi.

<i>MIR146A</i> Geni			Grup		P Değeri
			Kontrol	Mesane	
Allel	G	n	47	40	0,759
		%	81,0	83,3	
	C	n	11	8	
		%	19,0	16,7	
Genotip	GG	n	18	18	0,480
		%	62,1	75,0	
	GC	n	11	4	
		%	37,9	16,7	
	CC	n	0	2	
		%	0,0	8,3	
Genotip	GC+GG	n	29	22	0,113
		%	100,0	91,7	
	CC	n	0	2	
		%	0,0	8,3	

Tablo 4.4.'ün devamı.

Genotip	CC+GC	n	11	6	0,315
		%	37,9	25,0	
GG	GG	n	18	18	0,315
		%	62,1	75,0	

RET genine ait allel frekansları mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,024$). Mesane kanserli grupta G allelinin oranı %80,4 iken, kontrol grubunda bu oran %60,0 olarak kaydedilmiştir. *RET* geninde G alleleline sahip olmak hastalık riskini 2,7 kat arttırmaktadır (OR: 2,70; %95 G.A.: 1,12-6,69). A alleleline sahip olmak 2,7 kat koruyucu etki yaratmaktadır (OR: 0,36; %95 G.A.: 0,15-0,89) (Tablo 4.5.).

RET genine ait genotip oranları mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,115$). Mesane kanserli grupta GG genotipinin oranı %65,2 ve GA genotipinin oranı %30,4 iken, kontrol grubunda GG genotipinin oranı %46,7 ve GA genotipinin oranı %26,7 olarak kaydedilmiştir. *RET* geninde AA genotipi referans alındığında GG genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 8,60; %95 G.A.: 0,95-77,60). Benzer şekilde GA genotipine sahip olmak da hastalık için risk faktörü değildir (OR: 7,00; %95 G.A.: 0,70-70,70). GG genotipi referans alındığında AA genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 0,12; %95 G.A.: 0,01-1,1). Benzer şekilde GA genotipine sahip olmak da hastalık için risk faktörü değildir (OR: 0,82; %95 G.A.: 0,23-2,85) (Tablo 4.5.).

RET genindeki GG ve GA genotip birleşimi mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,061$). Mesane kanserli grupta GG+GA genotip oranı %95,7 ve AA genotip oranı %4,3 iken, kontrol grubunda GG+GA genotip oranı %73,3 ve AA genotip oranı %26,7 olarak kaydedilmiştir. *RET* geninde AA genotipi referans alındığında GG veya GA genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 8,00; %95 G.A.: 0,92-69,45) (Tablo 4.5.).

RET genindeki GA ve AA genotip birleşimi mesane kanserli grup ve kontrol grubu arasında karşılaştırılmış ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,179$). Mesane kanseri olan grupta GA+AA genotip oranı %34,8 ve GG genotip oranı %65,2 iken, kontrol grubunda GA+AA genotip oranı %53,3 ve GG genotip oranı %46,7 olarak kaydedilmiştir. *RET* geninde GG genotipi referans alındığında GA veya AA genotipine sahip olmak hastalık için risk faktörü değildir (OR: 0,47; %95 G.A.: 0,15-1,43) (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. *RET* (rs1799939) geninde kaydedilen tek nokta polimorfizmi.

<i>RET</i> Geni			Grup		P Değeri	
			Kontrol	Mesane		
Allel	G	n	36	37	0,024	
		%	60,0	80,4		
	A	n	24	9		
		%	40,0	19,6		
Genotip	GG	n	14	15		0,115
		%	46,7	65,2		
	GA	n	8	7		
		%	26,7	30,4		
	AA	n	8	1		
		%	26,7	4,3		
Genotip	GG+GA	n	22	22	0,061	
		%	73,3	95,7		
	AA	n	8	1		
		%	26,7	4,3		
Genotip	GA+AA	n	16	8		0,179
		%	53,3	34,8		
	GG	n	14	15		
		%	46,7	65,2		

4.2. Tartışma

Literatür incelendiğinde serbest DNA çalışmalarının öncelikle kantitatif olarak tanısal bir değerinin olup olmadığı araştırılmış ve bu çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Hughes vd. (1971) kalp ameliyatı geçiren hastalarda serbest DNA'nın varlığını göstermesinin akabinde, Stainman vd. (1975) sistemik lupus eritematozus nefriti hastalarındaki serbest DNA miktarlarını belirlenmiş ve bunları sağlıklı bireylerin değerleriyle karşılaştırmışlardır. Leon vd. (1977a; 1977b) ise yapmış oldukları iki ayrı çalışmada Lupus Eritromatusus ve Romatoid artrit hastalarındaki serbest DNA miktarlarını belirlenmiş ve bunları sağlıklı bireylerin değerleriyle karşılaştırmışlardır. Elde edilen verilerde hasta gruplarıdaki serbest DNA miktarının yüksek olması nedeniyle; serbest DNA miktarının birçok hastalıkta bir tanı aracı olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmaya bağlanmıştır. Normal ve tümörlü hücrelerin gerçekleştirdikleri nekroz veya apoptozis sonucu kan dokusuna salınan serbest DNA, malign tümörlü hastalarda benzer sonuçlar vermiştir (Shapiro vd., 1983; Stroun vd., 1987, 1989). Sonraki yıllarda akciğer kanseri (Sozzi vd. 2001; Cargnin vd. 2017), kalp krizi (Chang vd. 2003; Antonatos vd. 2006), benign prostat hiperplazisi (BPH) (Jung vd. 2004), organ yetmezliği ve hastane mortalitesi (Saukkonen vd. 2007), meme kanseri (Zhong vd. 2007; Catarino vd. 2008), kolorektal kanseri (Boni vd. 2007, Schwarzenbach vd. 2008), Benign ve malign ovaryum tümörü (Zachariah vd. 2008), uyku apne hipopne sendromu (Ye vd. 2010), pankreatik ve biliyer karsinomu (Zill vd. 2015) ve yanık sonrası oluşan sepsis (Hampson vd. 2017) gibi değişik birçok durum veya hastalıkta serbest DNA kantifikasyonunun sağlıklı bireylere göre istatistiksel açıdan önemli bir artış gösterip göstermediği araştırılmıştır. Literatür incelendiğinde genel olarak sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında serbest DNA düzeyinin hastalıklarda artış gösterdiği görülmektedir. Ancak serbest DNA'nın istatistiksel olarak önemli düzeyde artış göstermediği çalışmalarda mevcuttur (Boddy vd., 2006; Deligezer vd., 2008). Bazı çalışmalarda sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında mesane kanserli hastaların idrarında serbest DNA miktarının önemli düzeyde yüksek olduğu görülmüştür (Goessl vd., 2002; Chang vd., 2007; Brisuda vd., 2016). Ancak yine de "GeneQuant Pro", "Quant-iTTM DNA high sensitivity assay kit", rt-PCR ve NanoDrop 1000 gibi metot veya geliştirilmiş spesifik kitler kullanılmasına rağmen anlamlı düzeyde artışın görülmediği çalışmalarda mevcuttur (Zancan vd., 2009).

Literatürde idrardan izole edilerek analiz edilen serbest DNA çalışmaları bulunmakla birlikte, bu DNA'nın serum veya plazmadan izole edilerek ele alındığı çalışma sayısı oldukça azdır (Ellinger vd., 2008). Bu çalışmada serbest DNA'nın izolasyonu bakımından seruma göre dezavantajlı olan plazma çalışılmış ve kantifikasyon hem fotometrik hem de florometrik olarak yapılmıştır. Florometrik analizde ssDNA, dsDNA ve ikisinin toplamından oluşan toplam DNA için yapılan bütün gruplar arası karşılaştırma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ssDNA, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, mesane kanseri teşhisi konulan bireylerde anlamlı düzeyde yüksek bulunmuş; pre-op ile karşılaştırıldığında ameliyattan hemen sonra serbest DNA düzeyi önemsenmeyecek düzeyde artmış, post-op 2 grubunda ise düşmüştür. Post-op 2 grubundaki DNA düzeyinin kontrol grubuyla istatistiksel açıdan farklılık göstermemesi ve yakın bir değerde olması ssDNA'nın hastalık iyileşme süreciyle paralel seyrettiğini göstermektedir. Çalışmada oluşturulan gruplandırma sistemine benzer bir sistem Macher vd. (2012) tarafından oluşturulmuş; travmatik beyin hasarlı bireylerde 96 saatin belirli periyotlarında serbest DNA'nın nasıl izlediği araştırılmıştır.

Benzer sonuçları dsDNA için söylemek pek mümkün değildir. Her ne kadar gruplar arası karşılaştırmada anlamlı sonuç bulunsa da, kontrol grubu ve pre-op ile pre-op, post-op 1 ve post-op 2 grupları arasındaki ikili karşılaştırmada farklılık istatistiksel açıdan anlamsızdır. Yine kontrol grubu ile post-op 1 ve post-op 2 arasındaki farklılık anlamlı olsa da, bütün mesane grupları kontrol grubuna göre düşük seviyelerde seyretmiştir. Ancak yine de mesane gruplarında serbest DNA düzeyinin sırasıyla pre-op, post-op 1 ve post-op 2 boyunca düşmesi, hastalığın iyileşme süreciyle paralelliği önemli görülebilir.

Toplam serbest DNA açısından bakıldığında ise, tek anlamlı sonuç pre-op grubu ile post-op 2 grubu arasında görülmüştür. Ancak yine de her ne kadar istatistiksel açıdan bir anlam ifade etmese de kontrol grubuna göre pre-op grubunda serbest DNA düzeyinin artması ve dahi hemen hemen aynı seviyede seyreden pre-op ve post-op 1 gruplarına nazaran post-op 2 grubunda serbest DNA seviyesinin düşüşü hastalığın iyileşme süreci dikkate alındığında önemlidir. Toplam serbest DNA değerlerindeki bu dengesizliği, her ne kadar kontrollü deney koşulları titizlikle sağlansa da, kontrol grubunda ölçülen dsDNA'ya bağlamak mümkündür.

Çalışmada ayrıca fotometrik kantitatif tayini yapılmış; elde edilen toplam serbest DNA değerlerinin florometrik ölçümlere göre çok yüksek değerlerde olduğu görülmüştür.

Kontrol ile karşılaştırıldığında pre-op grubunda serbest DNA seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür. DNA seviyesi ameliyat sonrası gruplarında yani post-op 1 ve post-op 2 gruplarında kontrol seviyesine kadar düşmüştür. Bu yükseliş ve düşüş hipotetik olarak beklenen bir sonuç olsa da, gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel açıdan bir anlam ifade etmemekte ve ikili karşılaştırma imkanı sağlayamamaktadır.

Sonuçlar doğrultusunda florometrik değerlere nazaran fotometrik sonuçların çok yüksek seyretmesi dikkat çekicidir. Fotometrik ölçümlerdeki bu yükseliş 260/230, 260/280 oranları da göz önüne alındığında numunelerdeki protein, RNA ve diğer kirleticilerin ölçüm değerlerini önemli düzeyde etkilediğini, fotometrik ve florometrik ölçümler arasındaki makasın numune kalitesinin bir belirteci olduğunu göstermektedir. Çalışmanın gerçekleştiği esnada, bu sonuçlara benzer bir çalışma Ponti vd. (2018) tarafından yapılmıştır. Günümüz teknolojisinde özellikle serbest DNA izolasyonlarında manyetik boncuğun kullanıldığı bilinmektedir. Çalışmada kullandığımız izolasyon kiti ticari olarak ucuz, manyetik boncuk yerine özel bir filtre sistemiyle izolasyonu gerçekleştirmektedir. Çalışmada kullanılan kitin izolasyonda başarılı olduğu da farklı bir sonuçtur.

CCAT2 geninin transkripsiyonu sonucu kolon kanserinde ve intrahepatik intrahepatik kolanjiokarsinom ve hücreli böbrek karsinomu gibi bazı kanser türlerinde upregüle olan uzun bir kodlanmayan RNA oluşmaktadır. Bu transkript aracılığıyla hücre bölünmesi teşvik edilirken apoptosis baskılanmakta; microRNA 145 biyogenezi üzerinde negatif bir düzenleyici olarak rol oynamaktadır. Mesane kanserinde *CCAT2* gen ekspresyonu çalışılmış; bu genin mesane kanserinde bir onkogen olabileceği ve terapötik amaçla kullanılabilmesi ileri sürülmüştür (Li vd., 2016). Farklı bir yaklaşımla; in vitro koşullarda *CCAT2* gen ekspresyonunun engellenmesiyle gliom hücre gelişimi, hücre göçü ve invazyonunun baskımlandığı ve gliom hücrelerinin erken apoptozisinin uyarıldığı görülmüştür (Zeng vd., 2017). rs6983267 numaralı tek nükleotit polimorfizmi 8q24 pozisyonundaki *CCAT2* geninde bulunan ve TT genotipi referans alındığında GG genotipinin özellikle prostat kanseri olmak üzere kolon, böbrek, tiroit ve larinks kanserlerinde bir risk faktörü olabileceği rapor edilmiş ve çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde bu SNP'in mesane kanseri hastaları için istatistiksel anlamda bir risk taşımadığı rapor edilmiştir (Park vd., 2008; Wokołorczyk vd., 2008). Ancak mesane kanserinde bu SNP'ye ait yeterli çalışma mevcut değildir.

RAS gen ailesinin en bilinen üç üyesi 11p15.5 lokasyonunda 3 kb uzunluğundaki *HRAS*, 1p13 lokasyonunda 35 kb uzunluğundaki *KRAS* ve 12p12.1 lokasyonunda 7 kb uzunluğundaki *NRAS*'tir. Memelilerde birbiriyle yakın ilişkili olan *HRAS*, *KRAS* ve *NRAS* olarak isimlendirilen en az üç *RAS* proteini ekspresyonunu gerçekleştirilmektedir ve bu genlerin ürünlerindeki 12, 13 veya 61. kodonda herhangi bir mutasyon olması durumunda hücre onkogeneze sürüklenmektedir. Bu üç izoform içerisinde *KRAS* mutasyonunun herhangi bir kanser türünde sıklıkla görüldüğü ve ayrıca her izoformun farklı kanser türüne spesifik olduğu da bilinmektedir. Küçük GTP bağlayıcı proteinler veya GTPaz proteinleri olarak bilinen bu proteinler hücre yaşamı ve bölünmesinde rol oynayan hücresel sinyal transdüksiyonunda görev almaktadır. Bu üç *RAS* proteini genel olarak, ilk 85 aminoasitte %100, 85-165 aminoasitte %90 ve karboksil-terminal bölgedeki 25 aminoasitte ise %15 oranında homoloji göstermektedir. *HRAS* tümörlerinin %50'si 12. kodondan, %40'ı ise 61. kodon mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. *KRAS* tümörlerinin %80'i 12. kodondaki mutasyondan kaynaklı oluşmaktayken, 61. kodondan kaynaklı mutasyonlar çok nadirdir. *NRAS* tümörlerinin %60'a yakını 61. kodondan, %35'i ise 12. kodondan kaynaklanmaktadır. *HRAS* genindeki birinci ekzona karşılık gelen 12 ve 13. kodon ile ikinci ekzona karşılık gelen 61. kodon mutasyonlar kanser oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Bos, 1989; Macaluso vd., 2002; Prior vd., 2012).

rs12628 SNP'si *HRAS* geninde 27. kodon, 81 T→C pozisyonunda bulunmaktadır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre *HRAS* geninde T alleleline sahip olmak hastalık riskini 2,6 kat arttırmaktadır. Mesane kanserli hastalar ile kontrol grubundaki bireyler arasındaki genotip oranındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *HRAS* geninde CC genotipi referans alındığında TT genotipi, her ne kadar mesane kanserli hastalarda %65,2 oranında olsa da, istatistiksel olarak bir risk oluşturmamaktadır. Ayrıca TT genotipi referans alındığında TC genotipine sahip olmak 9,10 kat koruyucu etki oluşturmaktadır. *HRAS* geninde TT genotipi referans alındığında TC veya CC genotipine sahip olmak hastalık için 6,66 kat koruyucu etki sağlamaktadır. Elde edilen bu verilere göre mesane kanseri için *HRAS* geninde rs12628 kodlu SNP'de T allelinin ve TT genotipinin risk faktörü olduğu söylenebilir (Traczyk vd., 2012). Pandith vd. (2013) ise Keşmir popülasyonlarında yapmış oldukları çalışmalarda sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında mesane kanserli bireylerde CC varyantının daha sık bulunduğunu rapor etmişlerdir. Yine benzer sonuçlar Johne vd. (2003) tarafından da rapor edilmiştir.

Ancak bu çalışmada mesane kanserli hastalarda *RAS* proteininin yapısını değiştiren 12, 13 ve 61. kodonlarında mutasyona rastlanılmamıştır. Bu nedenle 27. kodonda polimorfizmin görülmesi bu kodonun mesane kanseri oluşumu için bir belirteç olabileceği konusunda araştırmacılarda şüphe uyandırmıştır. Sanyal vd. (2004) yapmış oldukları çalışmada ise her ne kadar istatistiksel açıdan farklılık önemli olmasa da kontrol grubunda C allelinin bulunma yüzdesi 30 olarak kaydedilirken, mesane kanserli bireylerde bu oranın %25'e düştüğü görülmüştür. Ayrıca yine T alleli %70'ten %75'e, TT genotipinin %45'ten %51'e yükseldiği, aksine TC genotipi %50'den %49'a, CC genotipi ise %5'den %1'e düşmüştür. CC genotipindeki p değeri 0,006 olup, 0,004 baraj değerini referans alan 'Bonferroni doğrulaması' uygulandığında istatistik anlamsız olmuştur. Bu veriler elde ettiğimiz sonuçlara benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda kontrol grubunda TT+TC genotip oranı %89,3 ve CC genotip oranı %10,7, mesane kanserli grupta TT+TC genotip oranı %87 ve CC genotip oranı %13 olarak kaydedilmiş ve bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu verilere dayanarak T alleli ve TT genotipinin yabancıl tip olduğu göz önüne alındığında, mesane kanseri hastalar ve sağlıklı bireylerden oluşan popülasyonun genel olarak (~ %90) en az 1 T alleli taşıdığı görülmektedir. Her ne kadar mesane kanserli hastalarda CC genotipi oranının yüzdesel olarak arttığı görülse de genel popülasyonda her iki alleldeki 81 T→C pozisyonundaki polimorfizmin mesane kanseri için bir belirteç olamayacağı sonucu çıkarılabilir.

MikroRNA'lar kodlanmayan küçük RNA'lar olup, mRNA'nın 3' translyasyona uğramayan bölgesiyle (untranslated region, *UTR*) eşleşerek, hedef enzim veya proteinin translyasyonunu engeller. Hücrede yüzlerce gen kopyasının olduğu bilinen mRNA'ların hücre poliferasyonu, hücre gelişimi, hematopoezide düzenleyici rolü olduğu, miRNA'ların hatalı bir şekilde regülasyona uğramasının birçok hastalığın başlangıcı olabileceği tahmin edilmektedir (Ambros, 2004; Lin and Hannon, 2004). Son yıllarda kullanılan moleküler tekniklerle miRNA'nın akciğer, beyin, karaciğer, kolon ve meme kanseri ve hatta lösemi ile ilişkili olduğunu, bazı miRNA'ların onkogen veya tümör supresör davranışı sergilediği rapor edilmiştir (Zhang vd., 2007). Yapılan çalışmalarda *MIR146A* ve *MIR146B* genlerinin çeşitli mikrobiyal birleşenler ve pro-inflamatuar sitokinlere yanıt oluşturmada bir indüksiyon modeli olduğu görülmüştür. Bu açıdan bakıldığında *MIR146A* *NF-kappa B*'ye (*NF-κB*, Nuclear Factor kappa B) bağlı bir

gendir. *MIR146A* ve *miR-146b* genlerinin lokasyonu sırasıyla 5q33 ve 10q24'tür (Taganov vd., 2006). rs2910164 numaralı G>C polimorfizmi *MIR146A* geninde oluşmaktadır. Böylelikle *MIR146A* öncülünün kök bölgesinde G:U çifti, C:U şeklindeki uyumsuz baz çiftine dönüşecektir (Guo vd., 2010).

Yapılan bir çalışmada mesane kanseri hastalarında C allelinin önemli düzeyde düştüğü görülmüştür. Ayrıca GC/CC kombinasyonunun GG genotipine göre yine önemli derecede düştüğü rapor edilmiştir. Araştırmacılar mesane kanseri hastalarında C allelinin hücre proliferasyonunu ve *IRAK1* ve *TRAF6* proteinlerinin ekspresyonunu önemli düzeyde düşürdüğü, yine bu hastalarda G alleli ile karşılaştırıldığında C allelinin taşınması durumunda *MIR146A* ekspresyon düzeyinin önemli düzeyde arttırdığı sonucuna varmışlardır (Wang vd., 2012). Farklı bir çalışmada kuzey Hindistan'da rs2910164'deki polimorfizmin mesane kanserlerinde belirgin düzeyde değişmediği bildirilmiştir (Srivastava vd., 2010). Kuzey Hindistan'da mesane kanserli hastalarda yapılan başka bir çalışmada ise C alleli kontrol grubunda %24,4 oranında iken, mesane kanserli bireylerde bu allelin görülme oranı %21,5 olarak belirlenmiştir. CC genotipi hem sağlıklı hem de hasta popülasyonda %2,8 oranında olup, GG genotipi ise kontrol grubunda %54, hasta grubunda ise %59,9 olarak kaydedilmiştir. GC+CC kombinasyonu ise kontrol grubunda %46 iken, hasta grubunda %40,1'dir. Ancak yine de elde edilen bu sonuçlar istatistiksel açıdan anlamsızdır (Mittal vd., 2011).

Elde ettiğimiz verilere göre *MIR146A* genine ait allel frekansları mesane kanserli grup ile kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kontrol grubunda C allelinin görülme sıklığı % 19 iken, mesane kanseri hastalarında bu oran % 16,7 olarak kaydedilmiştir. Ayrıca kontrol grubunda GC+CC genotip oranı %37,9 ve GG genotip oranı %62,1 iken, mesane kanserli grupta GC+CC genotip oranı %25 ve GG genotip oranı %75 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen bu veriler istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mesane kanserli hastalarda C allelinin ve GC+CC genotipinin düştüğünü göstermektedir. Literatürdeki veriler bu bulguları desteklemektedir.

RET proteini transmembran trozin kinaz reseptörü bir protein olup endokrin, enterik sinir ve boşaltım sisteminde önemli roller üstlenmektedir (Pandey vd., 1995). Bu protein 10q11.2 lokusundaki *RET* protoonkogeni tarafından kodlanmaktadır. Bu gende gerçekleşen germ hattı mutasyonları Hirschsprung hastalığı ve multipl endokrin

neoplazi tip 2 gibi birbiriyle ilişkili olmayan iki nöral krest hastalığına neden olduğu, somatik hatta gende gerçekleşen mutasyonlarla da papiller tiroid karsinomu ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (Manié vd., 2001). Literatür incelendiğinde bu hastalıklarla ilişkilendirilen ve *RET* protoonkogeninde bulunan bazı polimorfizmler mevcuttur. 11. ekzonda bulunan rs1799939 (G691S) numaralı SNP bunlardan birisidir. Bu polimorfizmde G→A değişimi gerçekleşebilmektedir. Gendeki şifre dizisinin tek nükleotit değişimi ile 5'-GGT-3' → 5'-AGT-3' şeklindeki dönüşümü, mRNA kodon diziliminin 3'CCA-5' → 3'-UCA-5' değişimine uğramasına neden olmaktadır. Sırasıyla DNA ve mRNA dizilerindeki değişime paralel olarak tRNA antikodonunda da değişim gözlenecektir; 5'-GGU-3' (Glisin (G) aminoasitini taşıyan tRNA'nın antikodonu) yerine 5'-AGU-3' (Serin (S) aminoasitini taşıyan tRNA'nın antikodonu) antikodonu oluşacaktır. Polipeptit dizisine Glisin aminoasitinin yerine Serin aminoasitinin gelmesiyle mutant bir *RET* proteini oluşacaktır.

Yapılan çalışmalarda G691S polimorfizminin kalıtsal ve sporadik medüller tiroid karsinom (Elisei vd. 2004; Baumgartner-Parzer vd. 2005), multipl endokrin neoplazi tip 2A (MEN 2A) (Robledo vd. 2003), pankreas kanseri (Sawai vd. 2005), cilt malign melanoma (Wohllk vd. 2005) gibi farklı hastalık tiplerinde varlığı rapor edilmiştir. Yine yapılan başka bir çalışmada ise Çin - Shanxi popülasyonunda Hirschsprung hastalarında *RET* protoonkogeninde A45A polimorfizminin varlığı görülürken, bu hastalarda G691S polimorfizminin istatistiksel açıdan herhangi bir anlam taşımadığı sonucuna varılmıştır (Zhao vd., 2012).

G691S polimorfizminin bu hastalıkların dışında araştırıldığı çok az çalışma mevcuttur. Bu nadir çalışmalardan birisi Fransız kökenli bireylerden oluşan bir popülasyona sahip olan Kanada'nın Quebec şehrinde vezikoüreteral reflü hastalarında G691S polimorfizmi ile hastalık arasında anlamlı bir korelasyonun varlığı gözlenmiştir ve bu mutasyonun hastalığın oluşumuna neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Yang vd., 2008). Bu çalışmanın hemen akabinde, başka araştırmacılar tarafından İrlanda popülasyonunda aynı polimorfizmin vezikoüreteral reflü hastalarında herhangi bir anlamlı değişim göstermediği bildirilmiştir (Darlow vd., 2009). Literatürde bu polimorfizmin mesane kanseri hastalarındaki seyri hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar oldukça çarpıcıdır. Yabanıl tip allelin (G), kontrol grubunda % 60 oranında bulunduğu, kanserli grupta ise bu oranın % 80,4'e çıktığı

görülmektedir. Yine mutant allel (A) kontrol grubunda % 40 oranında iken, kanserli grupta % 19,6'ya düşmüştür. GG+GA genotiplerinin kombinasyonu kontrol grubunda % 73,3 iken, kanserli grupta % 95,7'ye çıkmıştır. Buna karşılık AA genotipi kontrol grubunda % 26,7 oranında iken, kanserli grupta bu oran % 4,3'e düşmüştür. Allel düzeyindeki değişim istatistiksel açıdan anlamlı olsa da, genotip düzeyindeki değişim anlamsızdır. Çalışmadan önce kurulan hipotezde, mesane kanserli bireylerden oluşan popülasyondaki A alleli ve AA genotipi oranlarının kontrol grubuyla aynı düzeyde olması veya oranın yüksek çıkması beklenmekteydi. Ancak beklenmeyen bu sonuçların oluşmasında en büyük etkenin kontrol grubunda AA genotipinin % 26,7 gibi yüksek bir oranda çıkması olarak görülebilir. Bu nedenle herhangi bir hastalık ile polimorfizm arasında ilişkinin tam bir şekilde kurulabilmesi ve dahi objektif verilerin eldesi için kontrol ve hasta gruplarındaki birey sayısının daha büyük ölçeklerde olması büyük önem arz etmektedir.

Kontrol grubunda genotipi belirlenemeyen birey sayısı *CCAT2* geni için 1, *HRAS* geni için 2 ve *MIR146A* geni için 1'dir. Hasta grubunda primer amplifikasyonunun gerçekleşmediği birey sayısı *CCAT2* geni için 2, *HRAS* geni için 2, *MIR146A* geni için ve *RET* geni için 2'dir.

Özet olarak bu çalışmada elde edilen sonuçlar, serbest DNA ölçümlerinin hassasiyeti dikkate alındığında florometrik ölçümlerin daha avantajlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca serbest DNA'nın hızla muameleye tabi tutulduğunda SNP çalışmasına bile olanak tanıyacak yeterlilikte olduğu ve bunun serbest DNA'nın kalitesinin gösterilmesi açısından önemli bir veri olabileceği sonucu da çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

- Ambros, V. (2004) "The functions of animal microRNAs", *Nature*, 431, 350.
- Anker, P., Mulcahy, H., Chen, X., Q. and Stroun, M. (1999) "Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients", *Cancer and Metastasis Reviews*, 18(1), 65-73.
- Antonatos, D., Patsilinakos, S., Spanodimos, S., Korkonikitas, P. and Tsigas, D. (2006) "Cell-Free DNA Levels as a Prognostic Marker in Acute Myocardial Infarction", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075(1), 278-281.
- Ashoor, G., Syngelaki, A., Wanger, M., Birdir, C. and Nicolaidis, K., H. (2012) "Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18", *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 206(4), 322.e1-322.e5
- Baumgartner-Parzer, S., M., Lang, R., Wagner, L., Heinze, G., Niederle, B., Kaserer, K., Waldhausl, W. and Vierhapper, H. (2005) "Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the RET protooncogene: genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma?", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(11), 6232-6236.
- Barrett, N., A., Zimmermann, B., G., Wang, D., Holloway, A. and Chitty, L., S. (2011) "Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield", *Plos one*, 6(10), e25202.
- Bendich A, Wilczok T. and Borenfreund, E. (1965) "Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis", *Science*, 148(3668), 374-376.
- Bloom, R., D., Bromberg, J., S., Poggio, E., D., Bunnapradist, S., Langone, A., J., Sood, P., Matas, A., J., Mehta, S., Mannon, R., B., Sharfuddin, A., Fischbach, B., Narayanan, M., Jordan, S., C., Cohen, D., Weir, M., R., Hiller, D., Prasad, P., Woodward, R., Grskovic, M., Sninsky, J., J., Yee, J., P. and Brennan, D., C. (2017) "Cell-free DNA and active rejection in kidney allografts", *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(7), 2221-2232.
- Boddy, J., L., Gal, S., Malone, P., R., Shaida, N., Wainscoat, J., S., Harris, L. and Adrian, L. (2006) "The role of cell-free DNA size distribution in the management of prostate cancer", *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 16(1), 35-41.
- Boni, L., Cassinotti, E., Canziani, M., Dionigi, G., Rovera, F. and Dionigi, R. (2007) "Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer", *Surgical oncology*, 16, 29-31.
- Bos, J., L. (1989) "Ras oncogenes in human cancer: a review", *Cancer research*, 49(17), 4682-4689.

- Brisuda, A., Pazourkova, E., Soukup, V., Horinek, A., Hrbáček, J., Capoun, O., and Hanuš, T. (2016) “Urinary cell-free DNA quantification as non-invasive biomarker in patients with bladder cancer”, *Urologia internationalis*, 96(1), 25-31.
- Cargnin, S., Canonico, P., L., Genazzani, A., A. and Terrazzino, S. (2017) “Quantitative analysis of circulating cell-free DNA for correlation with lung cancer survival: a systematic review and meta-analysis”, *Journal of Thoracic Oncology*, 12(1), 43-53.
- Catarino, R., Ferreira, M., M., Rodrigues, H., Coelho, A., Nogal, A., Sousa, A. and Medeiros, R. (2008) “Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer”, *DNA and cell biology*, 27(8), 415-421.
- Chang, C., P., Y., Chia, R., H., Wu, T., L., Tsao, K., C., Sun, C., F. and Wu, J., T. (2003) “Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction”, *Clinica chimica acta*, 327(1-2), 95-101.
- Chang, H., W., Tsui, K., H., Shen, L., C., Huang, H., W., Wang, S., N., and Chang, P., L. (2007) “Urinary cell-free DNA as a potential tumor marker for bladder cancer”, *The International journal of biological markers*, 22(4), 287-294.
- Chen, X., Q., Stroun, M., Magnenat, J., L., Nicod, L., P., Kurt, A., M., Lyautey, J., Lederrey, P. and Anker, P. (1996) “Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients”, *Nature medicine*, 2(9), 1033-1035.
- Chiu, T., W., Young, R., Chan, L., Y., S., Burd, A. and Lo, D., Y., M. (2006) “Plasma cell-free DNA as an indicator of severity of injury in burn patients”, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 44(1), 13-17.
- Chuang, T., C., Y., Chuang, A., Y., C., Poeta, L., Koch, W., M., Califano, J., A. and Tufano, R., P. (2010) “Detectable *BRAF* mutation in serum DNA samples from patients with papillary thyroid carcinomas”, *Head & neck*, 32(2), 229-234.
- Dahm, R. (2005) “Friedrich Miescher and the discovery of DNA”, *Developmental Biology*, 278, 274–288.
- Darlow, J., M., Molloy, N., H., Green, A., J., Puri, P. and Barton, D., E. (2009) “The increased incidence of the RET p. Gly691Ser variant in French-Canadian vesicoureteric reflux patients is not replicated by a larger study in Ireland”, *Human mutation*, 30(5), 612-617.
- Deligezer, U., Eralp, Y., Akisik, E., E., Akisik, E., Z., Saip, P., Topuz, E. and Dalay, N. (2008) “Size distribution of circulating cell-free DNA in sera of breast cancer patients in the course of adjuvant chemotherapy”, *Clinical Chemical Laboratory Medicine*, 46(3), 311-317.
- Dobrzycka, B., Terlikowski, S., J., Mazurek, A., Kowalczyk, O., Niklinska, W., Chyczewski, L. and Kulikowski, M. (2010) “Circulating free DNA, p53 antibody and mutations of KRAS gene in endometrial cancer”, *International journal of cancer*, 127(3), 612-621.

- Eberhard, P. (2015) Color Atlas of Genetics 4nd ed., Alper, Ö., Laleci, G. ve Sakızlı, M. *Palme Yayıncılık*, Ankara, 789-802.
- Elisei, R., Cosci, B., Romei, C., Bottici, V., Sculli, M., Lari, R., Barale, R., Pacini, F. and Pinchera, A. (2004) “RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population”, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(7), 3579-3584.
- Ellinger, J., Bastian, P., J., Ellinger, N., Kahl, P., Perabo, F., G., Büttner, R., and Von Ruecker, A. (2008) “Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: a prognostic entity”, *Cancer letters*, 264(2), 274-280.
- Esteller, M., Cespedes, M., S., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S., B., and Herman, J., G. (1999) “Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients”, *Cancer research*, 59(1), 67-70.
- Ferlay, J., Shin, H., R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D., M. (2010) “Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008”, *International journal of cancer*, 127, 2893–2917.
- Gang, F., Guorong, L., An, Z., Anne, G., P., Christian, G. and Jacques, T. (2010) “Prediction of clear cell renal cell carcinoma by integrity of cell-free DNA in serum”, *Urology*, 75(2), 262-265.
- Gao, Y., J., He, Y., J., Yang, Z., L., Shao, H., Y., Zuo, Y., Bai, Y., Chen, H., Chen, X., C., Qin, F., X., Tan, S., Wang, J., Wang, J. and Zhang, L. (2010) “Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia”, *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 48(11), 1651-1656.
- García-Closas, M., Malats, N., Silverman, D., Dosemeci, M., Kogevinas, M., Hein, D., W., Tardon, A., Serra, C., Carrato, A., Lloreta, J., Castano-Vinyals, G., Yeager, M., Welch, R., Chanock, S., Chatterjee, N., Wacholder, S., Samanic, C., Tora, M., Fernandez, F., Real, F., X. and Rothman, N. (2005) “NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses”, *The Lancet*, 366(9486), 649-659.
- Gerovassili, A., Garner, C., Nicolaidis, K., H., Thein, S., L. and Rees, D., C. (2007) “Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities”, *Prenatal diagnosis*, 27(2), 104-110.
- Giacona, M., B., Ruben, G., C., Iczkowski, K., A., Roos, T., B., Porter, D., M. and Sorenson, G., D. (1998) “Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls”, *Pancreas*, 17(1), 89-97.

- Gil, M., M., Quezada, M., S., Bregant, B., Syngelaki, A. and Nicolaides, K., H. (2014) “Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first-trimester twin pregnancies”, *Fetal diagnosis and therapy*, 35(3), 204-211.
- Goessl, C., Müller, M., Straub, B., and Miller, K. (2002) “DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies”, *European urology*, 41(6), 668–676.
- Guo, H., Wang, K., Xiong, G., Hu, H., Wang, D., Xu, X., Guan, X., Yang, K. and Bai, Y. (2010) “A functional variant in microRNA-146a is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han”, *Familial cancer*, 9(4), 599-603.
- Hahn, S., Zhong, X., Y., Bürk, M., R., Troeger, C., Kang, A. and Holzgreve, W. (2001) “Both Maternal and Fetal Cell-Free DNA in Plasma Fluctuate”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945(1), 141-144.
- Hampson, P., Dinsdale, R., J., Wearn, C., M., Bamford, A., L., Bishop, J., R., Hazeldine, J., Moiemmen, N., S., Harrison, P. and Lord, J., M. (2017) “Neutrophil dysfunction, immature granulocytes, and cell-free DNA are early biomarkers of sepsis in burn-injured patients: a prospective observational cohort study”, *Annals of surgery*, 265(6), 1241-1249.
- He, L. and Gregory, J., H. (2004) “MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation”, *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522.
- Herceg, Z. and Wang, Z., Q. (2001) “Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477(1), 97-110.
- Hughes, G., R., V., Cohen, S., A., Lightfoot, R., W., Meltzer, J., I. and Christian, C., L. (1971) “The release of DNA into serum and synovial fluid”, *Arthritis & Rheumatology*, 14(2), 259-266.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F., O., Hesch, R., D. and Knippers, R. (2001) “DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells”, *Cancer research*, 61(4) , 1659-1665.
- Jankovic, S. and Vladan, R. (2007) “Risk factors for bladder cancer”, *Tumori Journal*, 93(1), 4-12
- Johne, A., Roots, I., and Brockmüller, J. (2003) “A single nucleotide polymorphism in the human H-ras proto-oncogene determines the risk of urinary bladder cancer”, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 12(1), 68-70.
- Jung, K., Stephan, C., Lewandowski, M., Klotzek, S., Jung, M., Kristiansen, G., Lein, M., Loening, S., A. and Schnorr, D. (2004) “Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer”, *Cancer letters*, 205(2), 173-180.

- Jung, K., Michael F. And Rabien, A. (2010) “Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature”, *Clinica Chimica Acta*, 411(21), 1611-1624.
- Kamat, A., A., Bischoff, F., Z., Dang, D., Baldwin, M., Han, L., Y., Lin, Y., G., Merritt, W., M., Landen, C., N., Lu, C., Gershenson, D., M., Simpson, J., L. and Sood, A., K. (2006) “Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma”, *Cancer biology & therapy*, 5(10), 1369-1374.
- Kashyap, N., Pradhan, M., Kumar, P. and Singh, N. (2017) “Acceptance of non-invasive prenatal testing by cell free foetal DNA for foetal aneuploidy in a developing country: experience at a tertiary care centre in India”, *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, 5(3), 705-710.
- Knowles, M., A. and Hurst, C., D. (2015) “Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity”, *Nature Reviews Cancer*, 15(1), 25.
- Koffler, D., Agnello, V., Winchester, R. And Kunkel, H., G. (1973) “The occurrence of single-strandedDNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases”, *The Journal of Clinical Investigation*, 52(1), 198–204.
- Kopreski, M., S., Benko, F., A., Kwee, C., Leitzel, K., E., Eskander, E., Lipton, A. and Gocke, C., D. (1997) “Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer”, *British journal of cancer*, 76(10), 1293-1299.
- Kopreski, M., S., Benko, F., A., Borys, D., J., Khan, A., McGarrity, T., J. and Gocke, C., D. (2000) “Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA”, *Journal of the National Cancer Institute*, 92(11), 918-923.
- Korabecna, M., Opatrna, S., Wierh, J., Rulcova, K., Eiselt, J., Sefrna, F. and Horinek, A. (2008) “Cell-Free Plasma DNA during Peritoneal Dialysis and Hemodialysis and in Patients with Chronic Kidney Disease”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137(1), 296-301.
- Leon, S., A., Ehrlich, G., E., Shapiro, B. and Labbate, V., A. (1977a) “Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients”, *The Journal of rheumatology*, 4(2), 139-143.
- Leon, S., A., Shapiro, B., Sklaroff, D., M. and Yaros, M., J. (1977b) “Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy”, *Cancer research*, 37(3), 646-650.
- Li, Y., Zhong, X., Y., Kang, A., Troeger, C., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2003) “Inability to detect cell free fetal DNA in the urine of normal pregnant women nor in those affected by preeclampsia associated HELLP syndrome”, *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 10(8), 503-508.

- Li, J., Zhuang, C., Liu, Y., Chen, M., Zhou, Q., Chen, Z., and Cai, Z. (2016) “shRNA targeting long non-coding RNA CCAT2 controlled by tetracycline-inducible system inhibits progression of bladder cancer cells”, *Oncotarget*, 7(20), 28989.
- Lilleberg, S., L., Durocher, J., Sanders, C., Walters, K. and Culver, K. (2004) “High Sensitivity Scanning of Colorectal Tumors and Matched Plasma DNA for Mutations in APC, TP53, K-RAS, and BRAF Genes with a Novel DHPLC Fluorescence Detection Platform”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1022(1), 250-256.
- Lo, Y., M., Corbetta N., Chamberlain, P., F., Rai, V., Sargent, I., L., Redman, C., W. and Wainscoat, J., S. (1997) “Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum”, *Lancet*, 350, 485–487.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., A., Krieger, M., Scott, M., P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P. (2011) *Molecular Cell Biology* 6nd ed., Geçkil, H., Özmen, M. ve Yeşilada, Ö. *Palme Yayıncılık*, Ankara, 574-589.
- Lögters, T., Paunel, A., Zilkens, C., Altrichter, J., Scholz, M., Thelen, S., Krauspe, R., Margraf, S., Jeri, T., Windolf, J. and Jager, M. (2009) “Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis”, *Journal of Orthopaedic Research*, 27(11), 1401-1407.
- Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N., and Russo, A. (2002) “Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer”, *Journal of cellular physiology*, 192(2), 125-130.
- Macher, H., Egea-Guerrero, J., J., Revuelto-Rey, J., Gordillo-Escobar, E., Enamorado, J., Boza, A., Rodriguez, A., Molinero, P., Guerrero, J., M., Dominguez-Roldan, J., M., Murillo-Cabezas, F. and Rubio, A. (2012) “Role of early cell-free DNA levels decrease as a predictive marker of fatal outcome after severe traumatic brain injury”, *Clinica chimica acta*, 414, 12-17.
- Mandel, P. and Metais, P. (1948) “Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme”, *Comptes Rendus Academy Sciences*, 142, 241-243.
- Manié, S., Santoro, M., Fusco, A. and Billaud, M. (2001) “The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation”, *Trends in genetics*, 17(10), 580-589.
- Mao, L., Schoenberg, M., P., Scicchitano, M., Erozan, Y., S., Merlo, A., Schwab, D. and Sidransky, D. (1996) “Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis”, *Science*, 271, 659-662.
- McGrath, M., Wong, J., Y., Michaud, D., Hunter, D., J. and De Vivo, I. (2007) “Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women”, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 16(4), 815-819.
- Mittal, R., D., Gangwar, R., George, G., P., Mittal, T. and Kapoor, R. (2011) “Investigative role of pre-microRNAs in bladder cancer patients: a case-control study in North India”, *DNA and cell biology*, 30(6), 401-406.

- Mulcahy, H., E., Lyautey, J., Lederrey, C., Qi, X., Chen, P., Anker, E., Alstead, M., Ballinger, M., Farthing, J. and Stroun, M. (1998) "A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients", *Clinical cancer research*, 4(2), 271-275.
- Nawroz, H., Koch, W., Anker, P., Stroun, M. and Sidransky, D. (1996) "Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients", *Nature medicine*, 2(9), 1035-1037.
- Page, K., Guttery, D., S., Fernandez Garcia, D., Hills, A., Hastings, R., K., Luo, J., Goddard, K., Shahin, V., Woodley Barker, L., Rosales, B., M., Coombes, R., C., Stebbing, J. and Shaw, J., A. (2017) "Next generation sequencing of circulating cell-free DNA for evaluating mutations and gene amplification in metastatic breast cancer", *Clinical chemistry*, 63(2), 532-541.
- Pandey, A., Duan, H., Di-Fiore, P., P., and Dixit, V., M. (1995) "The Ret receptor protein tyrosine kinase associates with the SH2-containing adapter protein Grb10", *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21461-21463.
- Pandith, A., A., Shah, Z., A., Khan, N., P., Baba, K., M., Wani, M., S. and Siddiqi, M., A. (2013) "HRAS T81C polymorphism modulates risk of urinary bladder cancer and predicts advanced tumors in ethnic Kashmiri population", *In Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 31(4), 487-492.
- Park, S. L., Chang, S., C., Cai, L., Cordon-Cardo, C., Ding, B., G., Greenland, S., and Mao, J., T. (2008) "Associations between variants of the 8q24 chromosome and nine smoking-related cancer sites", *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 17(11), 3193-3202.
- Pawelcz, C., P., Sacher, G., S., Raymond, K., Alden, R., S., Oconnell, A., Mach, S., L., Kuang, Y., Gandhi, L., Kirschmeier, P., English, J., M., Lim, L., P., Janne, P., A. and Oxnard, G., R. (2016) "Bias-corrected targeted next-generation sequencing for rapid, multiplexed detection of actionable alterations in cell-free DNA from advanced lung cancer patients", *Clinical Cancer Research*, 22(4), 915-922.
- Ponti, G., Maccaferri, M., Manfredini, M., Kaleci, S., Mandrioli, M., Pellacani, G., Ozben, T., Depenni, R. and Tomasi, A. (2018) "The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients", *Clinica Chimica Acta*, 479, 14-19.
- Prior, I., A., Paul D. Lewis, and Carla Mattos. (2012) "A comprehensive survey of Ras mutations in cancer", *Cancer research*, 72(10), 2457-2467.
- Robledo, M., Gil, L., Pollán, M., Cebrián, A., Ruíz, S., Azañedo, M., Benitez, J., Menarguez, J. and Rojas, J., M. (2003) "Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A", *Cancer Research*, 63(8), 1814-1817.
- Sanchez Carbayo, M., Socci, N., D., Lozano, J., Saint, F. and Cordon Cardo, C. (2006) "Defining molecular profiles of poor outcome in patients with invasive bladder

- cancer using oligonucleotide microarrays”, *Journal of clinical oncology*, 24(5), 778-789.
- Saukkonen, K., Lakkisto, P., Varpula, M., Varpula, T., Voipio Pulkki, L., M., Pettilä, V. and Pulkki, K. (2007) “Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients”, *Intensive care medicine*, 33(9), 1624-1627.
- Sawai, H., Okada, Y., Kazanjian, K., Kim, J., Hasan, S., Hines, O., J., Reber, H., A., Hoon, D., S., B. and Eibl, G. (2005) “The G691S RET polymorphism increases glial cell line-derived neurotrophic factor-induced pancreatic cancer cell invasion by amplifying mitogen-activated protein kinase signaling”, *Cancer research*, 65(24), 11536-11544.
- Schmitz-Dräger, B., J., Droller, M., Lokeshwar, V., B., Lotan, Y., Hudson, M., A., Van Rhijn, B., W., Marberger, M., J., Fradet, Y., Hemstreet, G., P., Malmstrom, P., U., Ogawa, O., Karakiewicz, P., I. and Shariat, S., F. (2015) “Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus”, *Urologia internationalis*, 94(1), 1-24.
- Schwarzenbach, H., Stoehlmacher, J., Pantel, K. and Goekkurt, E. (2008) “Detection and Monitoring of Cell-Free DNA in Blood of Patients with Colorectal Cancer”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137(1), 190-196.
- Shapiro, B., Chakrabarty, M., Cohn, E., M. and Leon, S., A. (1983) “Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease”, *Cancer*, 51(11), 2116-2120.
- Silva, J., M., Dominguez, G., Garcia, J., M., Gonzalez, R., Villanueva, M., J., Navarro, F., Provencio, M., Martin, S., S., Espana, P. and Bonilla, F. (1999) “Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations”, *Cancer research*, 59(13), 3251-3256.
- Song, C. X., Yin, S., Ma, L., Wheeler, A., Chen, Y., Zhang, Y., Liu, B., Xiong, J., Hu, J., Zhou, Z., Dong, B., Tian, Z., Jeffrey, S., S., Chua, M., S., So, S., Li, W., Wei, Y., Diao, J., Xie, D. and Quake, S., R. (2017) “5-Hydroxymethylcytosine signatures in cell-free DNA provide information about tumor types and stages”, *Cell research*, 27(10), 1231-1242.
- Sorenson, G., D., Pribish, D., M., Valone, F., H., Memoli, V., A., Bzik, D., J. and Yao, S., L. (1994) “Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood”, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 3(1), 67-71.
- Sozzi, G., Conte, D., Mariani, L., Lo-Vullo, S., Lombardo, C., Pierotti, M., A. and Tavecchio, L. (2001) “Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients”, *Cancer research*, 61(12), 4675-4678.
- Sparks, A., B., Wang, E., T., Syruble, C., A., Barrett, W., Stokowski, R., Mc-Bride, C., Zahn, J., Lee, K., Shen, N., Doshi, J., Sun, M., Garrison, J., Sandleri J.,

- Hollemon, D., Pattee, P., Tomita-Mitchell, A., Mitchell, M., Stuelpnagel, J., Song, K. and Oliphant, A. (2012a) "Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy", *Prenatal diagnosis*, 32(1), 3-9.
- Sparks, A., B., Struble, C., A., Wang, E., T. Song, K. and Oliphant, A. (2012b) "Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18", *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 206(4), 319.
- Spencer, K., De-Kok, J., B. and Swinkels, D., W. (2003) "Increased total cell-free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected by trisomy 21", *Prenatal diagnosis*, 23(7), 580-583.
- Srivastava, K., Srivastava, A. and Mittal, B. (2010) "Common genetic variants in pre-microRNAs and risk of gallbladder cancer in North Indian population", *Journal of human genetics*, 55(8), 495.
- Steinman, C. R. (1975) "Free DNA in serum and plasma from normal adults", *Journal of Clinical Investigation*, 56(2), 512.
- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P. A. Lyautey, J., Lederrey, C. and Beljanski, M. (1989) "Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients", *Oncology*, 46, 318-322.
- Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Maurice, P., A. (1987) "Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients", *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 23(6), 707-712.
- Swystun, L., L., Mukherjee, S. and Liaw, P., C. (2011) "Breast cancer chemotherapy induces the release of cell-free DNA, a novel procoagulant stimulus", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(11), 2313-2321.
- Taganov, K., D., Boldin, M., P., Chang, K., J., and Baltimore, D. (2006) "NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12481-12486.
- Tan, E., M., Schur, P., H., Carr, R., I. and Kunkel, H., G. (1966) "Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus", *The Journal of Clinical Investigation*, 45(11), 1732-1740.
- Thierry, A., R., Mouliere, F., El-Messaoudi, S., Mollevi, C., Lopez-Crapez, E., Rolet, F., Gillet, B., Gongora, C., Dechelotte, P., Robert, B., Del-Rio, M., Lamy, P., J., Bibeau, F., Nouaille, M., Lorient, V., Jarrousse, A., S., Molina, F., Mathonnet, M., Pezet, D. and Ychou, M. (2014) "Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA", *Nature medicine*, 20(4), 430.
- Toledo, R., A., Garralda, E., Pons, T., Monsech, J., Vega, E., Alvarez, R., Cubillo, A., Blanco-Aparicio, C., Dominguez, O., Martinez, J., L. and Hidalgo, M. (2017) "565P Whole-exome sequencing of matched germline and plasma cell-free

DNA portrays the somatic mutation landscape of refractory metastatic colorectal cancer and identifies mutated KDR/VEGFR2 as new cause of therapy resistance”, *Annals of Oncology*, 28, 5.

- Traczyk, M., Borkowska, E., Roźniecki, M., Purpurowicz, R., Jędrzejczyk, A., Marks, P., and Kałużewski, B. (2012) “Polymorphic variants of H-RAS protooncogene and their possible role in bladder cancer etiology”, *Central European journal of urology*, 65(2), 84.
- Umetani, N., Hiramatsu, S. and Hoon, D., S., B. (2006) “Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075(1), 299-307.
- Vasioukhin, V., Stroun, M., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Anker, P. (1994) “K-ras point mutations in the blood plasma DNA of patients with colorectal tumors”, *Biotechnology Today, Challenges of Modern Medicine*, 5, 141-150.
- Vasioukhin, V., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Stroun, M. (1994) “Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia”, *British journal of haematology*, 86(4), 774-779.
- Volik, S., Alcaide, M., Morin, R., D. and Collins, C. (2016) “Cell-free DNA (cfDNA): clinical significance and utility in cancer shaped by emerging Technologies”, *Molecular Cancer Research*, 14(10), 898-908.
- Wang, B., G., Huang, H., Y., Chen, Y., C., Bristow, R., E., Kassauei, K., Cheng, C., C., Roden, R., Sokoll, L., J., Chan, D., W. and Shih, I., M. (2003) “Increased plasma DNA integrity in cancer patients”, *Cancer research*, 63(14), 3966-3968.
- Wang, M., Chu, H., Li, P., Yuan, L., Fu, G., Ma, L., Shi, D., Zhong, D., Tong, N., Qin, C., Yin, C. and Zhang, Z. (2012) “Genetic variants in miRNAs predict bladder cancer risk and recurrence”, *Cancer research*, 72(23), 1-10.
- Weigelt, B., Comino Méndez, I., De Bruijn, I., Tian, L., Meisel, J., L., Garcia Murillas, I., Fribbens, C., Cutts, R., Martelotto, L., G., Lim, R., S., Selenica, P., Piscuoglio, S., Aghajanian, C., Norton, L., Murali, R., Hyman, D., M., Borsu, L., Arcila, M., E., Konner, J., Reis Filho, J., S., Greenberg, R., A., Robson, M., E. and Turner, N., C. (2017) “Diverse BRCA1 and BRCA2 reversion mutations in circulating cell-free DNA of therapy-resistant breast or ovarian cancer”, *Clinical Cancer Research*, clincanres-0544.
- Wohlk, N., G., Soto, E., C., Bravo, M., A. and Becker, P., C. (2005) “G691S, L769L and S836S ret proto-oncogene polymorphisms are not associated with higher risk to sporadic medullary thyroid carcinoma in Chilean patients”, *Revista medica de Chile*, 133(4), 397-402.

- Wokolorczyk, D., Gliniewicz, B., Sikorski, A., Złowocka, E., Masojć, B., Dębniak, T., and Suchy, J. (2008) “A range of cancers is associated with the rs6983267 marker on chromosome 8”, *Cancer research*, 68(23), 9982-9986.
- Wu, T., L., Zhang, D., Chia, J., H., Tsao, K., Sun, C., F. and Wu, J., T. (2002) “Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range”, *Clinica Chimica Acta*, 321(2), 77-87.
- Wyatt, A., W., Azad, A., A., Volik, S., V., Annala, M., Beja, K., McConeghy, B., Haegert, A., Warner, E., W., Brahmabhatt, S., Shukin, R., Bihan, S., L., Gleave, M., E., Nykter, M., Collins, C., C. and Chi, K., N. (2016) “Genomic alterations in cell-free DNA and enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer”, *JAMA oncology*, 2(12), 1598-1606.
- Yamada, T., Nakamori, S., Ohzato, H., Aoki, T., Higaki, N., Sugimoto, K., Akagi, K., Fujiwara, Y., Nishisho, I., Sakon, M., Gotoh, M. and Monden, M. (1998) “Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features”, *Clinical Cancer Research*, 4(6), 1527-1532.
- Yang, Y., Houle, A., M., Letendre, J. and Richter, A. (2008) “RET Gly691Ser mutation is associated with primary vesicoureteral reflux in the French-Canadian population from Quebec”, *Human mutation*, 29(5), 695-702.
- Ye, L., Ma, G., H., Chen, L., Liu, J., L., Yang, K., Li, Q., Y., Li, N. and Wan, H., Y. (2010) “Quantification of Circulating Cell-Free DNA in the Serum of Patients with Obstructive Sleep Apnea–Hypopnea Syndrome”, *Lung*, 188(6), 469-474.
- Zachariah, R., Schmid, S., Buerki, N., Radpour, R., Holzgreve, W. and Zhong, X., Y. (2008) “Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors”, *Obstetrics & gynecology*, 112(4), 843-850.
- Zancan, M., Galdi, F., Di Tonno, F., Mazzariol, C., Orlando, C., Malentacchi, F., and Murer, B. (2009) “Evaluation of cell-free DNA in urine as a marker for bladder cancer diagnosis”, *The International journal of biological markers*, 24(3), 147-155.
- Zeng, J., Du, T., Song, Y., Gao, Y., Li, F., Wu, R., and Pei, Z. (2017) “Knockdown of Long Noncoding RNA CCAT2 Inhibits Cellular Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition in Glioma Cells”, *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 25(6), 913-921.
- Zhang, J., Tong, K., L., Li, P., K., T., Chan, A., Y., W., Yeung, C., K., Pang, C., C., P., Wong, T., Y., H., Lee, K., C. and Lo, Y., M., D. (1999) “Presence of donor-and recipient-derived DNA in cell-free urine samples of renal transplantation recipients: urinary DNA chimerism”, *Clinical chemistry*, 45(10), 1741-1746.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G., P. and Anderson, T., A. (2007) “microRNAs as oncogenes and tumor suppressors”, *Developmental biology*, 302(1), 1-12.

- Zhao, W., Y., Li, X., J., Zhang, Q., B., Ma, Y., X. and Zhou, Y., A. (2012) “Detection of RET Protooncogene DNA polymorphism in patients with Hirschsprung’s disease by high resolution melting”, *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 11, 17-19.
- Zhong, X., Y., Bürk, M., R., Troeger, C., Kang, A., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2000) “Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma”, *Obstetrics & Gynecology*, 96(6), 991-996.
- Zhong, X., Y., Hahn, D., Troeger, C., Klemm, A., Stein, G., Thomson, P., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2001a) “Cell-Free DNA in Urine”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945(1), 250-257.
- Zhong, X., Y., Laivuori, H., Livingston, J., C., Ylikorkala, O., Sibai, B., M., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2001b) “Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia”, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 184(3), 414-419.
- Zhong, X., Y., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2001c) “Circulatory fetal and maternal DNA in pregnancies at risk and those affected by preeclampsia”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945(1), 138-140.
- Zhong, X., Y., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2002a) “The levels of circulatory fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia”, *Hypertension in pregnancy*, 21(1), 77-83.
- Zhong, X., Y., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2002b) “Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts”, *Molecular human reproduction*, 8(9), 864-870.
- Zhong, X., Y., Ladewig, A., Schmid, S., Wight, E., Hahn, S. and Holzgreve, W. (2007) “Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer” *Archives of gynecology and obstetrics*, 276(4), 327-331.
- Zhu, G., Ye, X., Dong, Z., Lu, Y., C., Sun, Y., Liu, Y., McCormack, R., Gu, Y. and Liu, X. (2015) “Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer”, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(3), 265-272.
- Zill, O., A., Greene, C., Sebisano, D., Siew, L., M., Leng, J., Vu, M., Hendifar, A., E., Wang, Z., Atreya, C., E., Kelley, R., K., Loon, K., V., Ko, A., H., Tempero, M., A., Bivona, T., G., Munster, P., N., Talasiz, A., A. and Collisson, E., A. (2015) “Cell-free DNA next-generation sequencing in pancreaticobiliary carcinomas”, *Cancer discovery*, 5(10), 1040-1048.
- Zou, J., Duffy, B., Slade, M., Young, A., L., Steward, N., Hachem, R. and Mohanakumar, T. (2017) “Rapid detection of donor cell free DNA in lung transplant recipients with rejections using donor-recipient HLA mismatch”, *Human Immunology*, 78(4), 342-349.

EKLER

Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

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

1. Baydeniz, S., Gürbüz, M., Sayar, İ., Bozkurt, A. (2018) “Screening of Single Nucleotide Polymorphisms in Certain Genes In Plasma Cell Free DNA in Bladder Cancer Patients”, *4th International Congress on Applied Biological Sciences Congress (ICABS) 03-05 May 2018*, pages 234-234, Eskişehir.
2. Bozkurt, A., Gürbüz, M., Sayar, İ., Baydeniz, S. (2018) “Determination of single nucleotide polymorphisms (SNP) in several genes through the plasma cell free DNA of benign prostatic hyperplasia (BPH) patients”, *4th International Congress on Applied Biological Sciences Congress (ICABS) 03-05 May 2018*, pages 124-124, Eskişehir.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Konya'nın Ereğli ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ereğli'de tamamladı. 2000 yılında girdiği Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Amasya Eğitim Fakültesi, Fen ve Teknoloji Öğretmenliği Bölümünden 2005 yılında mezun oldu. 2006 yılında Erzincan ilinde Fen ve Teknoloji öğretmeni olarak göreve başladı. 2014 yılında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.

