



**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MİKRO RNA'LARIN PROSTAT KANSERİ İLE İLİŞKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Abdullah KARADAĞ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Selda KABADERE**

**2019**





**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MİKRO RNA'LARIN PROSTAT KANSERİ İLE İLİŞKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Abdullah KARADAĞ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Selda KABADERE**

**2019**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Abdullah KARADAĞ 'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "MİKRO RNA'LARIN PROSTAT KANSERİ İLE İLİŞKİSİ" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih

11 / 09 / 2019

Üye: Prof. Dr. Selda KABADERE



Üye: Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP



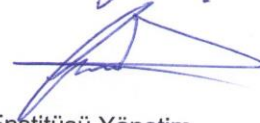
Üye: Prof. Dr. Cavit CAN



Üye: Prof. Dr. Miriş DİKMEN



Üye: Doç. Dr. Gökhan KUŞ



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ... / ... / ... tarih ve ... / ... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Özkan ALATAŞ  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

**Başlık:** mikroRNA'ların Prostat Kanseri ile İlişkisi

**Amaç:** Benign prostat hiperplazili (BPH, 18) ve radikal prostatektomi ameliyatı öncesi/sonrası prostat kanserli (PK, 19+19) toplam 56 hasta plazmasında, seçtiğimiz 9 tane miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi, ardından bu miRNA'ların hücre kültüründe etkilerinin incelenmesi ve hastalardan elde ettiğimiz veriler ile kültür ortamında elde ettiğimiz veriler arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Kapsam:** PK erkeklerde kanserden ölümlerin en sık ikinci nedenidir. Erken teşhis durumunda, tedavi radikal prostatektomi gibi lokal uygulamalardır ve yaşam süresi uzundur. Ancak teşhiste kullanılan prostata özgü antijen seviyeleri (PSA), birçok nedenden dolayı yüksek çıkabilmekte ve yanlış sonuç verebilmektedir. Bunun sonucu olarak birçok hastada gereksiz girişimsel işlemler yapılmaktadır. Dolayısıyla PK'nin teşhisinde yeni belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Mikro RNA'lar (miRNA) 18-25 nükleotit uzunluğunda protein kodlamayan RNA parçacıklarıdır. Protein sentezinin düzenlenmesinde görev alırlar. Birçok kanser türünde ekspresyon düzeylerinde meydana gelen farklılıklar nedeniyle, tümör baskılayıcı veya onkogen olarak kanser gelişiminde rol oynadıkları bilinmektedir. miRNA'ların prostat kanserindeki düzeylerinin belirlenmesi ve etki mekanizmalarının açığa çıkarılmasının kanser tanı ve tedavisi açısından yararlı olabileceği düşünülmektedir.

**Yöntem:** Çalışmamızda, nicel eş zamanlı polimer zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile PK'li ve BPH'li hasta plazmalarında dokuz adet miRNA'nın ekspresyon düzeyleri ölçüldü. PK'li hastalarda, radikal prostatektomi ameliyatından önce ve sonra olmak üzere iki kez ölçüm yapıldı. Böylelikle miRNA'ların tedaviden sonra ekspresyon düzeylerinde bir değişim olup olmadığı da karşılaştırılabildi. Deneylerimizin hücre kültürü aşamasında, DU 145 hücrelerine, anlamlı farklılık bulunan üç miRNA (miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-221-3p) agonistinin (mimik) transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfekte hücrelerin 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

bromide (MTT) yöntemiyle canlılık oranları ölçüldü. Ayrıca ELISA yöntemiyle apoptoz (kaspaz 3-8-9) ile migrasyon ve anjiogenez için gösterge olan matriks metalloproteinaz (MMP) 2-9 düzeyleri ölçüldü. Daha sonra hücreler Hematoksilen Eosin boyama, Bax/ Bcl-2 immünohistokimya boyama ve migrasyon testi (yara iyileşme testi) yapılarak incelendi. Böylelikle bu miRNA'ların tedavi edici etkinliği de araştırıldı

**Bulgular:** Elde ettiğimiz bulgulara göre, PK hastalarında miRNA'lardan dört tanesinin (miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-221-3p, miR-130b-3p) ekspresyon düzeyleri BPH'li hastalara göre anlamlı düzeyde düşük bulundu. miR-125b-5p, miR-145-5p ve miR-221-3p'nin DU 145 insan PK hücrelerinin çoğalmasında üçüncü günde sırasıyla % 37, % 28 ve % 18 (p=0,0001, p=0,0051, p=0,276) oranında baskıladığı gözlemlendi. Mimiklerin tamamının kaspaz 3 düzeyini arttırdığı gözlemlendi. Kaspaz 8 düzeyini ise miR-125b-5p ve miR-221-3p'nin arttırdığı bulundu. Bax/Bcl-2 boyama yapılan hücrelerde mimiklerimizin hepsinin apoptozu arttırdığı sonucu elde edildi. Migrasyon testinde mimik uygulanan üç grupta da yara alanının daha yavaş kapandığı gözlemlendi. Ayrıca, sadece miR-221-3p'nin MMP-9 düzeyini anlamlı düzeyde düşürdüğü tespit edildi.

**Sonuç:** miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-221-3p ve miR-130b-3p'nin PK'li hastalarda düzeyleri düşük bulundu. Belirlenen miRNA'lar hücrelere transfekte edildiğinde hücre çoğalmasında baskıladıkları, apoptozu arttırdıkları, migrasyon ve metastazı azalttıkları görüldü. Bu veriler ışığında bu miRNA'ların PK'nin tanı ve tedavisine katkı sağlayabilecekleri düşünülmektedir. Özellikle daha geniş hasta popülasyonlarında bu miRNA'ların araştırılması sonucu, hazırlanacak biyobelirteç panellerinde kendilerine yer bulabileceklerine inanılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** mikroRNA, Prostat Kanseri, PCR, Hücre Kültürü

## SUMMARY

**Title:** The effect of micro RNA in prostate cancer

**Aim:** We aimed to determine the expression levels of 9 selected miRNAs in plasmas of 56 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH, 18) and with prostate cancer (PK, 19 + 19) before / after radical prostatectomy surgery. Then, it was aimed to investigate the effects of these miRNAs on cell culture and to investigate the relationship between the data obtained from the patients and the data obtained from the culture media.

**Content:** PK is the second leading cause of cancer death in men. In the case of early diagnosis, treatment of PK includes local applications such as radical prostatectomy and the survivals of the patients are quite long. However, The prostate-specific antigen levels used in the diagnosis could be high and false for many reasons. As a result, unnecessary invasive procedures are applied in many patients. Thus, new markers are needed in the diagnosis of PK. Micro RNAs (miRNAs) are 18-25 nucleotides long, non-coding RNA fragments. Due to differences in expression levels of miRNAs in many cancer types, they are known to play a role in cancer development as a tumor suppressor or oncogen. It is thought that determining the levels of miRNAs in prostate cancer and revealing the mechanisms of their affects, could be useful for cancer diagnosis and treatment.

**Material method:** In our study, the expression levels of nine miRNAs were measured by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) method in plasmas of PK and BPH patients. Two measurements were performed before and after radical prostatectomy in patients with PK. Thus, expression levels of miRNAs were compared before and after surgery. Then, three of the miRNAs (miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-221-3p) agonists (mimics), which found to be different, were transfected to DU 145 cells. The viability of the transfected cells was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method. Matrix metalloproteinase 2-9 levels which are an indicator for migration and angiogenesis and the levels of apoptosis (caspase 3-8-9) was also measured by ELISA. Then cells were examined by

Hematoxylin Eosin staining, Bax / Bcl-2 immunocytochemistry staining and wound healing test. Thus, the therapeutic efficacy of these miRNAs was also investigated.

**Result:** According to our findings, expression levels of four miRNAs (miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-221-3p, miR-130b-3p) were significantly lower in patients with PK compared to patients with BPH. It was observed that miR-125b-5p, miR-145-5p and miR-221-3p repressed growth of DU 145 human PK cells respectively at 37 %, 28% and 18% rate on the third day ( $p = 0.0001$ ,  $p = 0.0051$ ,  $p = 0.276$ ). It was observed that all mimics increased the caspase 3 levels. Caspase 8 levels were found to increase by miR-125b-5p and miR-221-3p. It was found that all mimics increased apoptosis in Bax / Bcl-2 staining cells. The wound healing test showed that the wound area closed more slowly in all three mimics groups. In addition, miR-221-3p was found to significantly reduce MMP-9 levels.

**Conclusion:** The expression levels of miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-221-3p and miR-130b-3p were found to be low in patients with PK. It was seen that when miRNA mimics were transfected to the cells, they suppressed cell proliferation, increased apoptosis, and reduced migration and metastasis. In the light of these data, these miRNAs are thought to contribute to the diagnosis and treatment of PC. It is believed that these miRNAs can be found in biomarker panels to be prepared. Investigation of these miRNAs, especially in larger patient populations are needed for further studies.

**Key Words:** microRNA, Prostate cancer, PCR, Cell Culture



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Prostat Bezi .....	3
2.2. Prostat Kanseri .....	6
2.2.1. Prostat kanserinin tanı ve tedavisi.....	8
2.3. Mikro RNA'lar .....	9
2.3.1. miRNA'ların sentezi ve biyolojik önemi .....	9
2.3.2. miRNA hedef ilişkisi .....	13
2.3.3. miRNA ve kanser .....	15
2.3.4. Belirteç olarak miRNA'lar .....	16
2.3.5. Tedavi ajanı olarak miRNA'lar .....	17
3. APOPTOZ .....	19
4. Matriks Metalloproteinazlar .....	21
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	23
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	23
5.2. Kullanılan Cihazlar .....	24
5.3. Kullanılan Çözeltiler .....	25
5.4. Kullanılan Sarf Malzemeler .....	25
5.5. Kullanılan Materyal .....	25
5.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Aşaması.....	26
5.6.1. miRNA izolasyonu .....	26
5.6.2. cDNA sentezi .....	27
5.6.3. qRT-PCR miRNA ekspresyon analizi.....	28
5.7. Hücre Kültürü Aşaması .....	28
5.7.1. Hücrelerin ekimi ve yaşatılması .....	28
5.7.2. Hücre sayımı .....	29
5.7.3. Mimik transfeksiyonu .....	29
5.7.4. MTT yöntemi ile hücre canlılığının ölçülmesi .....	30

5.7.5. ELISA yöntemi .....	31
5.7.6. H-E boyama.....	32
5.7.7. Bax/ Bcl-2 immünositokimya boyama ile apoptoz tayini .....	33
5.7.8. Migrasyon testi .....	34
5.8. İstatistiksel Analiz.....	34
6. BULGULAR .....	35
6.1. qRT-PCR miRNA Ekspresyon Analizi Sonuçları .....	35
6.2. Hücre Kültürü Sonuçları .....	41
6.2.1. MTT sonuçları .....	41
6.2.2. ELISA sonuçları .....	44
6.2.3. H-E boyama ile hücrelerin morfolojik değerlendirilmesi .....	47
6.2.4. Migrasyon testi sonuçları.....	49
6.2.5. Bax-Bcl immünositokimya boyama ile apoptozun değerlendirilmesi .....	53
7. TARTIŞMA .....	58
8. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	66
9. KAYNAKLAR .....	68

<b>Tablo Dizini</b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 2.1.1</b> Prostat içeriğindeki bileşenler .....	5
<b>Tablo 2.3.1.1</b> miRNA nakavt farelerde oluşan değişimler.....	13
<b>Tablo 2.3.5.1</b> Deneme aşamasında olan miRNA'lar .....	18
<b>Tablo 6.1</b> Grupların yaş, PSA ve gleason dağılımı .....	35
<b>Tablo 6.2.1.1.</b> Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde MTT yöntemi ile 48. Ve 72. saatte elde edilen canlılık oranları.....	42
<b>Tablo 6.2.4.1</b> Migrasyon testi .....	50



<b>Şekiller Dizini</b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Şekil 2.1.1</b> Prostat apeksinden bütün bir kesit .....	4
<b>Şekil 2.1.2</b> Prostat epiteli hücreleri .....	4
<b>Şekil 2.2.1</b> Kansere insidansları .....	6
<b>Şekil 2.2.2</b> PK risk faktörleri .....	7
<b>Şekil 2.2.3</b> PK'nin patogenezi içindeki karşılaştırmalı moleküler aşamalar ....	8
<b>Şekil 2.3.1.1</b> Aynı intron bölgesinde oluşan farklı miRNA'lar .....	10
<b>Şekil 2.3.1.2</b> miRNA'ların sentezi, aktivasyonu ve etki mekanizması ....	12
<b>Şekil 3.1</b> Apoptotik olayların şematik gösterimi .....	20
<b>Şekil 6.1</b> BPH'li ve PK'li hastaların PSA dağılımı.....	35
<b>Şekil 6.2</b> BPH'li ve PK'li hastaların yaşlarının kendi grup ortalamalarına göre dağılımı.....	36
<b>Şekil 6.1.1</b> BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-125b-5p ekspresyon düzeylerinin analizi.....	37
<b>Şekil 6.1.2</b> BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-145-5p ekspresyon düzeylerinin analizi.....	38
<b>Şekil 6.1.3</b> BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-221-3p ekspresyon düzeylerinin analizi.....	38
<b>Şekil 6.1.4</b> BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-486-5p ekspresyon düzeylerinin analizi.....	39
<b>Şekil 6.1.5</b> BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-130b-3p ekspresyon düzeylerinin analizi.....	40
<b>Şekil 6.1.6</b> BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-301a-3p ekspresyon düzeylerinin analizi.....	40
<b>Şekil 6.2.1</b> Mikroskopta DU 145 hücrelerinin genel görüntüsü .....	41
<b>Şekil 6.2.1.1</b> Hücre ortamına MTT eklenmesi sonucu hücrelerde oluşan formazan kristallerinin genel görüntüsü.....	42
<b>Şekil 6.2.1.2</b> Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde 48. saatte MTT yöntemi ile elde edilen absorbans değerleri .....	43
<b>Şekil 6.2.1.3</b> Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde 48. saatte MTT yöntemi ile elde edilen absorbans değerleri .....	43
<b>Şekil 6.2.2.1</b> Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde	

kaspaz 3 düzeylerinin değerlendirilmesi .....	44
<b>Şekil 6.2.2.2</b> Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde	
kaspaz 8 düzeylerinin değerlendirilmesi .....	45
<b>Şekil 6.2.2.3</b> Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde	
kaspaz 9 düzeylerinin değerlendirilmesi .....	45
<b>Şekil 6.2.2.4</b> Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde MMP 2	
düzeylerinin değerlendirilmesi .....	46
<b>Şekil 6.2.2.5</b> Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde MMP 9	
düzeylerinin değerlendirilmesi .....	47
<b>Şekil 6.2.3.1</b> Transfeksiyondan 48 saat sonra DU 145 hücrelerinin H-E	
boyama görüntüleri.....	48
<b>Şekil 6.2.3.2</b> Transfeksiyondan 72 saat sonra DU 145 hücrelerinin H-E	
boyama görüntüleri.....	49
<b>Şekil 6.2.4.1</b> Migrasyon testi .....	50
<b>Şekil 6.2.4.2</b> Migrasyon testi başlangıç görüntüleri.....	51
<b>Şekil 6.2.4.3</b> Migrasyon testi 9 ½ .saatteki görüntüleri .....	51
<b>Şekil 6.2.4.4</b> Migrasyon testi 24. saat görüntüleri .....	52
<b>Şekil 6.2.4.5</b> Migrasyon testi 48. saatteki görüntüleri .....	53
<b>Şekil 6.2.5.1</b> miR-125b-5p transfeksiyonu yapılmış DU 145 hücrelerinde	
Bax antikoru ile boyama görüntüleri.....	54
<b>Şekil 6.2.5.2</b> miR-145-5p ve miR-221-3p transfekte DU 145 hücrelerinin	
Bax antikoru ile boyama görüntüleri .....	55
<b>Şekil 6.2.5.3</b> Normal ve mir-125b-5p transfekte DU 145 hücrelerin	
Bcl-2 antikoru ile boyama görüntüleri .....	56
<b>Şekil 6.2.5.4</b> miR-145-5p ve miR-221-3p transfekte DU 145 hücrelerinin	
Bcl-2 antikoru ile boyama görüntüleri. ....	57

## Simge ve Kısaltmalar Dizini

miRNA	: mikroRNA
PK	: Prostat Kanseri
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
AÖ	: Radikal Prostatektomi Ameliyatı Öncesi
AS	: Radikal Prostatektomi Ameliyatı Sonrası
DU 145	: Prostat kanseri hücre hattı
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
ELISA	: Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
Bax	: Bcl-2 ilişkili protein X
PBS	: Phosphate Buffered Saline
H-E	: Hematoksilen Eozin
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florid
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
UTR	: Genin kodlanmayan bölgesi (Untranslated region)

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri (PK) erkeklerde en sık görülen kanserlerden biridir ve uzun süren tedavilere rağmen tekrarlama olasılığı yüksektir (Siegel, Miller, & Jemal, 2019). Bu hastalığın tanısında prostat spesifik antijen (PSA) ölçümü hala altın standart olmasına rağmen bazı kanserli hastalarda düşük veya normal çıkmasının yanısıra benign prostat hiperplazili (BPH) hastalarda yüksek çıkabilmektedir. Kesin tanı, biyopsi yapılarak konmaktadır. Bunun sonucu olarak çok sayıda hastaya yanlışlıkla biyopsi yapılmaktadır (Szeliski, Adamowicz, Gastecka, Drewa, & Pokrywczynska, 2018). Ayrıca hastalar girişimsel yöntemlerin uygulanmasından rahatsızlık duydukları için hastalık belirtileri ortaya çıkana kadar hastaneye başvurmamaktadırlar. Bunun sonucunda PK ileri evrede teşhis almakta, tedavi şansı azalmakta ve tekrarlama olasılığı artmaktadır. Oysa PK erken teşhis edildiğinde tedaviye iyi cevap veren bir kanser türüdür ve sağkalım yüksektir. Bundan dolayı PK tanısında daha spesifik ve daha az invaziv belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (Board, 2002)

Mikro RNA'lar (miRNA) protein sentezini düzenleyen RNA parçacıklarıdır. Dokuda ve vücut sıvılarında stabil olarak bulunmaktadırlar. Bu özellikleri onları ideal tanı ve tedavi ajanı haline getirmektedir (Mitchell vd., 2008). İnsan mikroRNA genlerinin, genellikle kırılğan ve kanser ile ilişkili olan genomik bölgelerde yerleştiği bulunmuştur. Bu bölgelerde oluşan hasarların kanser oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Calin vd., 2004). miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler sonucu, tümör baskılayıcı veya onkogen olarak kanser oluşumuna katkıda buldukları bulunmuştur (Cowland, Hother, & Gronbaek, 2007). Çoğu tümörde, miRNA'ların ekspresyon düzeyleri düşük bulunmuştur. miRNA'ların hücre farklılaşmasındaki rollerine bağlı olarak, tümör diferansiasyonu azaldığında düzeylerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir (Lu vd., 2005). Yapılan bir inceleme çalışmasında elliden fazla miRNA'nın PK ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kanwal, Plaga, Liu, Shukla, & Gupta, 2017).

Yaptığımız literatür taramalarında PK'li hastaların dokularında ve hücre dizilerinde miRNA'lar ile ilgili çok sayıda makale olmasına rağmen, plazmalarındaki miRNA düzeyleri konusunda çok az veriye rastlanmıştır. Dolayısıyla şu an sayıları iki binin üzerinde olan miRNA'lardan hangilerinin PK'li hastalarda miktarlarının değiştiğinin bulunması, PK tanısında biyobelirteç (biyomarker) olarak kullanılabilmesine ve farklı tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesine olanak tanıyabilecektir. Çalışmamızda geçmişte sunulan verilerin ışığında, PK olgularında miktarının değiştiği gösterilen miRNA'ların, PK'li hastaların plazmalarında ekspresyon düzeyleri ölçülecektir. Ardından düzeylerinde farklılık gözlenen miRNA'ların hücre kültür ortamında etkinliği araştırılacaktır. Böylece araştırdığımız miRNA'ların PK'deki etkisi araştırılıp teşhis ve tedavide yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.



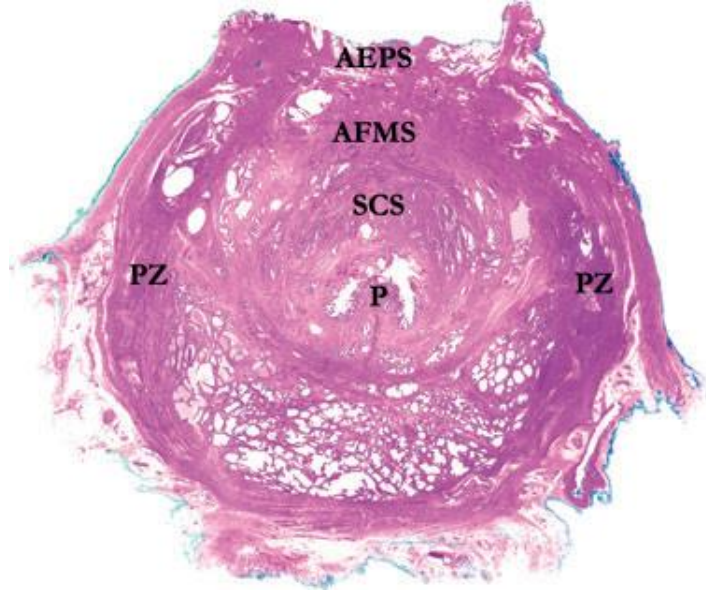
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Prostat Bezi

Prostat mesane boynunda, üretranın etrafını çevreleyen en büyük aksesuar bezdir. Aksial düzlemde yuvarlak, eliptik veya triangular görünümündedir. Doğumda sadece birkaç gr ağırlığındadır ve yirmili yaşlarda yaklaşık yirmi gr ağırlığına ulaşmaktadır. Sonraki yirmi beş yılda ağırlığı ve histolojisi sabit halde kalır (Kumar & Majumder, 1995).

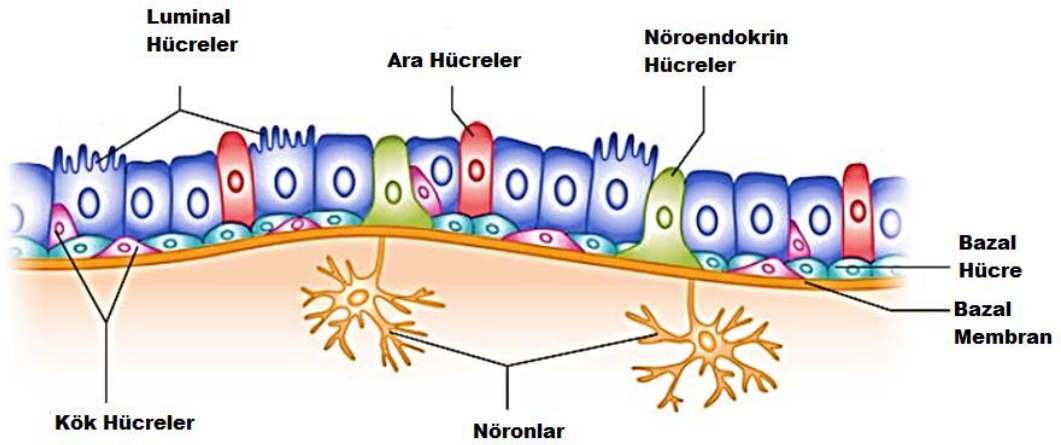
Fibroelastik ince bir doku tabakası ile çevrili olduğundan, yapısal olarak lobül içermeyen görünümündedir. Ancak fibroelastik kapsül altta septalara yol açarak anterior, posterior, medial ve iki lateral olmak üzere prostatı beş lobüle ayırır. Normal prostat loblara ayrılmaz, prostatın loblara ayrılması Benign Prostat Hiperplazisi'ne (BPH) eğilimin göstergesidir (Singh, W. Strandhoy, & G. Assimos, 2012).

Histolojik olarak prostat periferik bölge (PB) ve merkezi bölge (CB) olmak üzere iki ana bölgeye ayrılır. PB normal glandüler prostatın yaklaşık % 65'ini oluşturur ve kanalları, verumontanumdan prostat apeksine kadar prostatın her iki tarafında üretral duvardan posterolateral olarak çıkmaktadır. CB, glandular prostat kütesinin yaklaşık % 30'unu oluşturur, verumontanum üzerinde oluşan kanallar ve ejakülatör kanal başlangıç noktalarını çevrelemek için tabana doğru yayılır. Bunun yanısıra glandüler prostatın %5'ini oluşturan geçiş (transition) bölgesi adlı bir kısmı daha bulunmaktadır (Şekil 2.1.1). Bu bölge, kanalları üretral duvarın posterolateral girintilerini terk eden iki küçük lob tarafından oluşturulur. Prostatın ana glandüler olmayan dokusu anteromedial prostatta üretrayı örten anterior fibromusküler stromadır (Fine & Reuter, 2012).



**Şekil 2.1.1** Prostat apeksinden bütün bir kesit. Üretra ve promontory (P) merkezdedir ve öne doğru ; semisirküler sfinkter (SCS) ve anterior fibromuscular stroma (AFMS) görülmektedir. Apeksin arka, lateral ve anterolateral kısımları periferik zon (PZ) dokusundan oluşur. anterior ekstraprostatik boşluk (AEPS) dorsal vasküler kompleksin vasküler ve adipoz kalıntılarını içerir (Fine & Reuter, 2012).

Bez epitelinde, sekretuar (luminal) hücreler, bazal hücreler, çoğaltıcı veya ara hücreler, kök hücreler ve nöroendokrin hücreler bulunmaktadır (şekil 2.1.2). Fibromuskular tabaka ise düz kas hücrelerinden oluşmaktadır. En fazla miktarda bulunan hücre tipi olan sekretuar hücreler, nükleer androjen reseptörü, sitokeratinler 8 ve 18'in yanı sıra hücre-yüzey belirteci CD57'yi ekspres eder. Ayrıca bu hücreler androjene bağımlı hücrelerdir ve glandüler lümenine sıvı, PSA ve prostat asit fosfataz (PAP) salgırlar (Schalken, 2005).



**Şekil 2.1.2** Prostat epiteli hücreleri (Sharma, 2017)

Prostat sekresyonu homojen, seröz, hafifçe asidik (pH:6,6), protein içeriği düşük (<1) sütümsü bir sıvıdır. Normal insan ejakulatında (3-3,5 ml), ortalama 0,5 ml kadar bulunur. İçeriğinde bulunan enzimler, iyonlar, lipidler aminler tablo 2.1.1’ de gösterilmiştir (Kumar & Majumder, 1995).

**Tablo 2.1.1** Prostat içeriğindeki bileşenler (Kumar & Majumder, 1995)

Asit fosfataz	Fibronolitik enzimler
Albümin	İnozitol
Alfa amilaz	Magnezyum, bakır, sodyum
Beta glukorinidaz	Plazminojen aktivatör
Cephalin	Fosfolipidler
Kolesterol	Seminin
Kolin	Proteolitik enzimler
Sitric asid	Spermine
Dermatan	Spermidin
Diastaz	

Prostat bezinin birçok fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlar aşağıdaki gibi maddeler halinde sayılabilir.

1-) Kütlesi ve kas sistemi aracılığıyla fiziksel olarak mesaneden idrar çıkışının kontrolüne katılır ve ejakulasyon süresince semenin iletiminde rol oynar (Williams & Chisholm, 1976).

2-) Ekzokrin bez olarak, birçok küçük molekül ve fibronilizin gibi enzimler ile koagülaz ve fertilitiyi kolaylaştırıcı, pıhtılaşmada rol oynayan başka pıhtı eritici enzimler salgılayarak seminal sıvı plazmasına katkıda bulunur (McDougal vd., 2011).

3-) Prostat sıvısı, üretranın asiditesini azaltarak sperm canlılığını korur. Seminal plazmaya albumin gibi faktörlerle katkı sağlayarak sperm hareketini arttırır (McDougal vd., 2011).

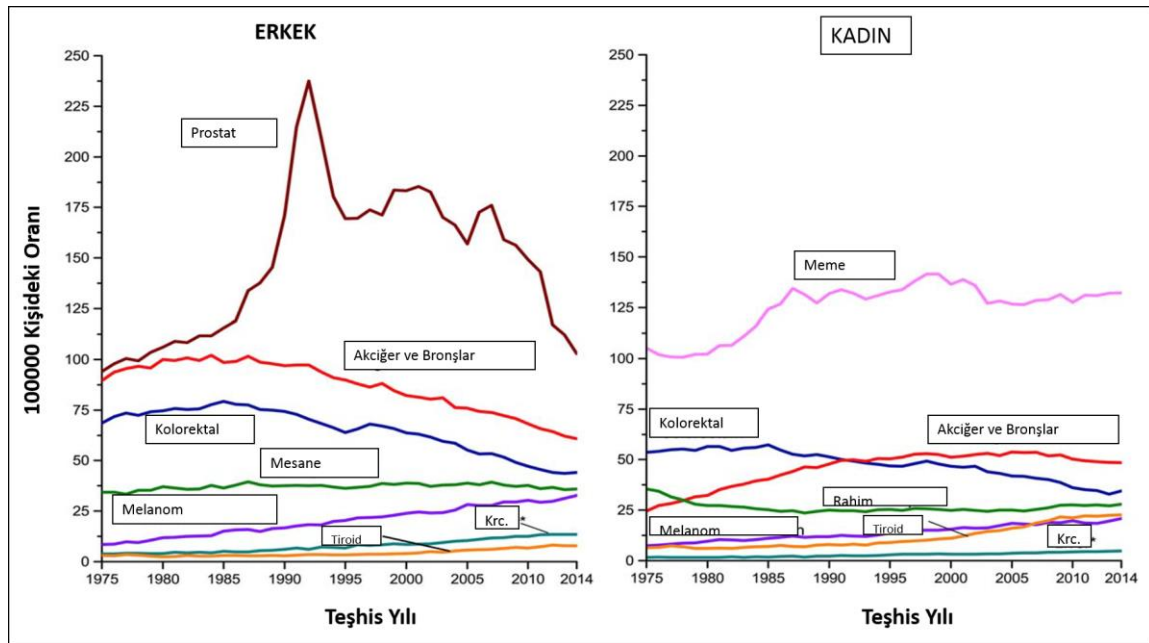
4-) PAP fosforilkolini koline hidrolizleyerek, spermin beslenmesine direk katkıda bulunur (McDougal vd., 2011).

5-) Endokrin bir organ olarak testosteronu daha güçlü olan dehidrotestosterona çevirerek metabolizmayı hızlandırır böylelikle hipotalamik ve hipofizyal fonksiyonları etkiler (Williams & Chisholm, 1976).

6-) Seminal plazmada antimikrobiyal ajan gibi etkide bulunan yüksek miktarda bakırın, prostat sıvısından kaynaklandığı düşünülmektedir (Fair & Wehner, 1976).

## 2.2. Prostat Kanseri

Kanser bütün dünyada büyük bir sağlık sorunudur ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) ikinci en sık ölüm nedenidir. ABD'de 1975-2014 yılları arasında erkeklerde görülme sıklığı en yüksek kanser türü PK'dir (Şekil 2.2.1). Ayrıca 2019 yılında 174590 yeni PK'î vakası beklenmekte ve 31620 kişinin öleceği tahmin edilmektedir. Böylece erkeklerde akciğer kanserinden sonra ölüm sebebinin en sık PK'de olacağı beklenmektedir (Siegel vd., 2019).

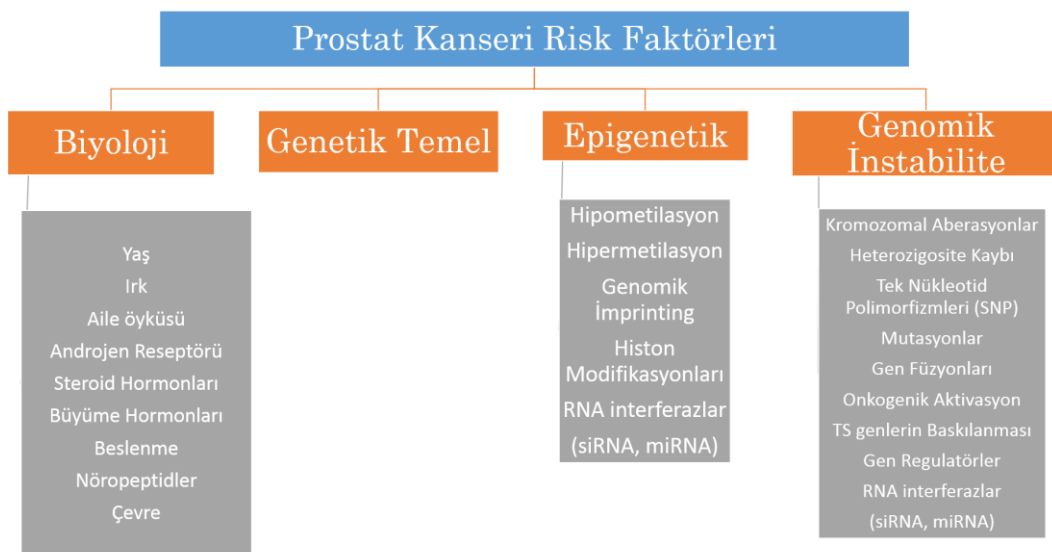


**Şekil 2.2.1** Kanser insidansları. 1975 – 2014 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde cinsiyete Göre Seçilmiş Kanser İnsidans Oranlarındaki Eğilimler. Oranlar 2000 kişilik standart ABD popülasyonuna göre ve raporlamadaki gecikmelere göre ayarlanmıştır. \* İntrahepatik safra kanalı dahildir (Siegel vd., 2019).

PK Afrika kökenli Amerikalılarda en yüksek oranda görülmektedir. Daha sonra beyazlar, İspanyol kökenliler, Asyalılar ve Pasifik adaları kökenlilerde görülmektedir. En az Amerikan ve Alaska yerlilerinde görülmektedir. Mortalitede de en yüksek oran yine siyahlardadır (<https://gis.cdc.gov/Cancer/USCS/DataViz.html>) .

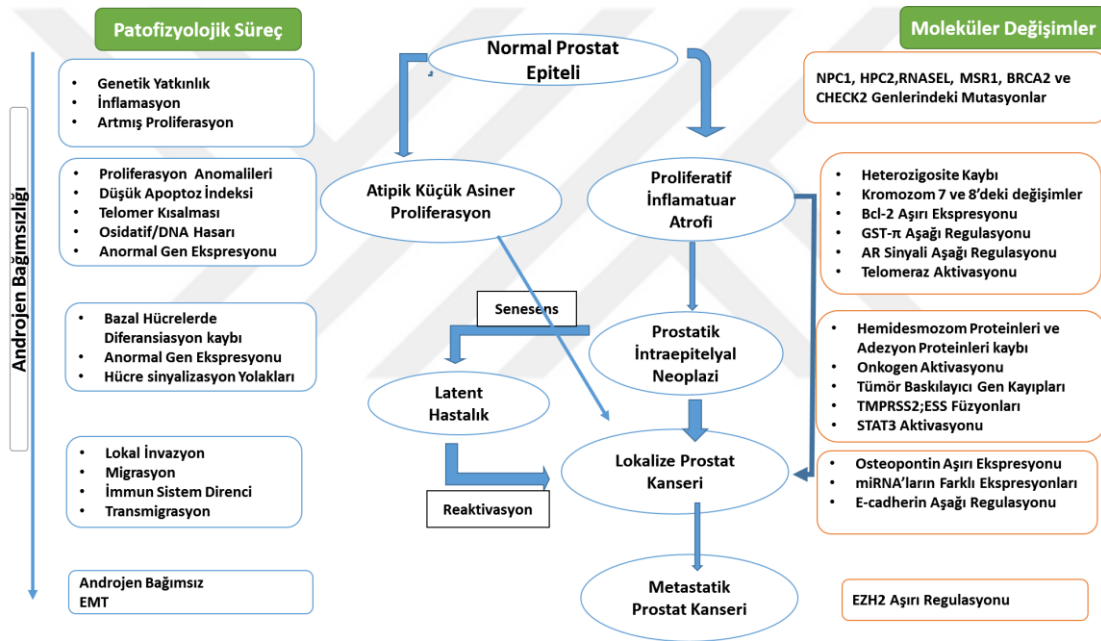
PK yaşlanma ile ilgili bir hastalıktır ve 50 (elli) yaşın altında nadiren tanı alır. Günümüzde halen geçerliliğini koruyan Franks'ın yaptığı çalışmada 50'li 60'lı yaşlarda kişilerin üçte birinde, 70'li yaşlarda kişilerin yarısında, 80'li yaşlardakilerin üçte ikisinde latent olarak PK odakları bulunur (Franks, 1954). Genellikle rastlantısal olarak tanı konan 50 yaşın altındaki hastalar “erken başlangıçlı (early onset)” ve “genç (young age)” şeklinde 2 (iki) gruba ayrılır. İleri yaştaki PK'lerine göre farklı biyolojik ve genetik özelliklere sahip olan genç gruptaki PK'lilerde sağkalım iyiysen, erken başlangıçlı grupta prognoz kötü ve sağkalım daha düşüktür (H. T. Ozen, L. Beduk, Y. Çal, C. Eskicorapci, S. Narter, F., 2017).

PK'nin oluşmasında etkili faktörlerin mekanizmaları tam anlaşılmasa da, Şekil 2.2.2'de belirtildiği gibi genetik, genomik kararsızlık, epigenetik ve biyolojik etmenlerin yer aldığı pekçok etken nedeniyle kanser meydana gelmektedir (Konac, 2014).



Şekil 2.2.2 PK risk faktörleri (Konac, 2014).

PK sporadik ve kalıtsal olarak sınıflandırılabilmesine rağmen iki grup birbirinden net olarak ayrılamaz. Kalıtsal PK tüm olguların % 10'undan daha azını oluşturmaktadır. Kanser oluşmasında birden fazla genin az veya orta düzeyde etkide bulunduğu bilinmektedir. Bununla beraber sporadik vakalarda da kalıtsal tipte görülen birçok mutasyon görülmüştür. Bu nedenle bu iki grubu ayırmak daha da güçleşmektedir (H. T. Ozen, L. Beduk, Y. Çal, C. Eskicorapci, S. Narter, F., 2017). PK oluşumu ve ilerlemesindeki süreçler moleküler değişiklikleriyle beraber Şekil 2.2.3'te özetlenmeye çalışılmıştır (Konac, 2014).



Şekil 2.2.3 PK'nin patogenezindeki karşılaştırmalı moleküler aşamalar (Konac, 2014).

### 2.2.1. Prostat kanserinin tanı ve tedavisi

PK tanısı koyabilmek için ilk önce digital rektal muayene (DRE) yapılmakta ve kanda PSA düzeyine bakılmaktadır. Daha sonra transrektal ultrasonografi (TRUS) incelemesi yapılmaktadır. Bütün bu işlemlerin ardından hastalık şüphesi devam ederse biyopsi yapılmakta ve kesin tanı biyopsi ile konmaktadır (Szeliski vd., 2018). Daha önce altın standart olarak kabul edilen PSA ölçümü, özellikle de PSA seviyesi 2-10 ng/ml aralığında olduğunda erken dönem PK hastaları ile BPH hastalarını etkin olarak

ayıramamaktadır. PSA seviyesi 10 ng/ml'yi aştığında ise yanlış teşhis % 50'yi aşmaktadır (Y. H. Lee vd., 2011). PSA düzeyleri, PK ile ilişkili olmayan faktörlerden dolayı yüksek veya düşük çıkabilmesinin yanı sıra kanserli hastaların sadece yüzde 25'inde yüksek çıkmaktadır (Barry, 2001). ABD Önleyici Hizmetler Görev Gücü (USA Preventive Services Task Force) 2012 yılında PK taraması için PSA kullanımına karşı olduğunu belirtmiştir. Daha sonra PSA'nın yüksek riskli PK hastalarında teşhiste daha iyi olduğu ama orta riskli hastaların teşhisinde yetersiz kaldığı gözlenmiştir (Banerji vd., 2016). Transrektal ultrason eşliğinde yapılan biyopsiler ise kendi komplikasyonlarına sahip olmakla beraber hastayı fiziksel olarak etkilemektedir (L. V. Rodriguez & Terris, 1998). PK'li erkeklerin önemli bir kısmı müdahale gerektirmeyen rahat ve yavaş büyüyen bir hastalığa sahiptir. Ayrıca teşhisteki girişimsel tetkikler hastalar tarafından hem fizyolojik hemde psikolojik olarak pek tercih edilmemektedir. Dolayısı ile hastalığın teşhisi, ancak semptomlar ortaya çıktıktan sonra, hastanın başvurusu ile konulabilmektedir. Bu da PK'inde ölüm sıklığını ve tekrarlama olasılığını arttırmaktadır (Kornberg, Cooperberg, Spratt, & Feng, 2018).

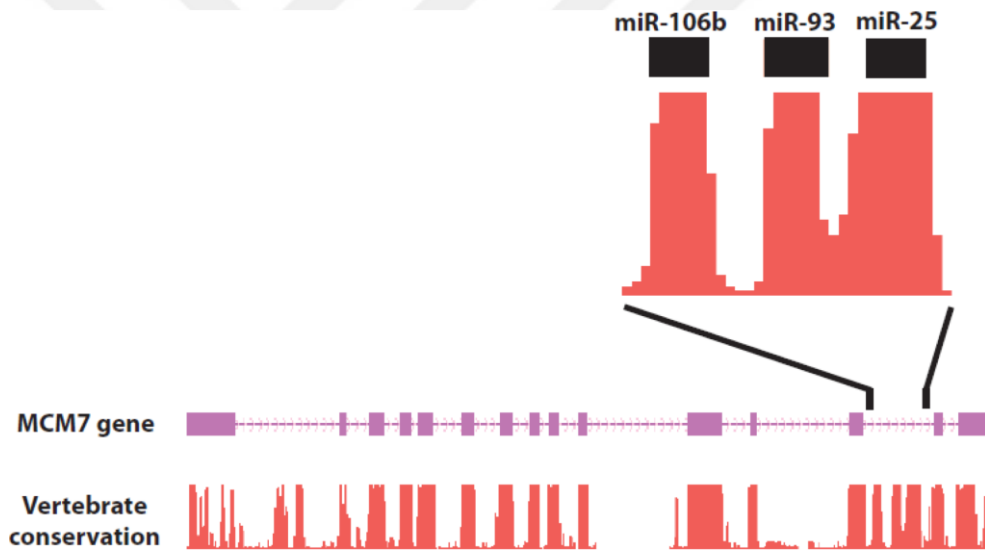
PK hastalarına uygulanacak tedavi hastalığın hangi evrede tanı aldığıyla ilişkilidir. Sadece prostat ile sınırlı olgularda tedavi radikal prostatektomi veya radyoterapi gibi lokal tedavi seçenekleridir. Bu hastalarda yaşam süresi on yılın üzerindedir. İleri evre hastalarda ise temel tedavi yöntemi dolaşımdaki androjenlerin cerrahi yada ilaç uygulamaları ile uzaklaştırılmasıdır (Team, 2019).

## **2.3. Mikro RNA'lar**

### **2.3.1. miRNA'ların sentezi ve biyolojik önemi**

miRNA'lar 18-25 nükleotit uzunluğunda, protein kodlamayan RNA parçacıklarıdır ve ilk olarak 1993'te yuvarlak solucanda keşfedilmişlerdir (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). miRNA genleri genom boyunca bulunur (A. Rodriguez, Griffiths-Jones, Ashurst, & Bradley, 2004). Birçok miRNA geni, tek transkripsiyonel ürünü miRNA olan, kodlayıcı olmayan genlerdir. Bu

genler aracılığıyla miRNA'ların yaklaşık % 50'sinin sentez edildiği tahmin edilmektedir. miRNA'nın çıkarılması protein kodlayan bölgenin kaybına yol açacağından, miRNA'lar genel olarak eksonlarda bulunmazlar. miRNA'ların diğer sentez yolu, bir intron veya bir protein kodlayan genin kodlanmayan bölgesi (UTR) içinde bulunup, genellikle konakçı genleriyle birlikte yazılıp ardından ayrı olarak işlenerek sentezlenmesidir (Saini, Griffiths-Jones, & Enright, 2007). Buna örnek olarak MCM7 genini kodlayan protein kodunun, intronu içine yerleştirilmiş üç miRNA kümesi gösterilebilir. Tüm miRNA genlerinin tanımlayıcı özelliği, ilmek görünümü (stem-loop) öncü RNA yapısıdır. Şekil 2.3.1.1' de farklı hedef kümesine sahip, herbiri farklı olgun miRNA'ları oluşturan üç stem loop kümesi görülmektedir (Hammond, 2015).

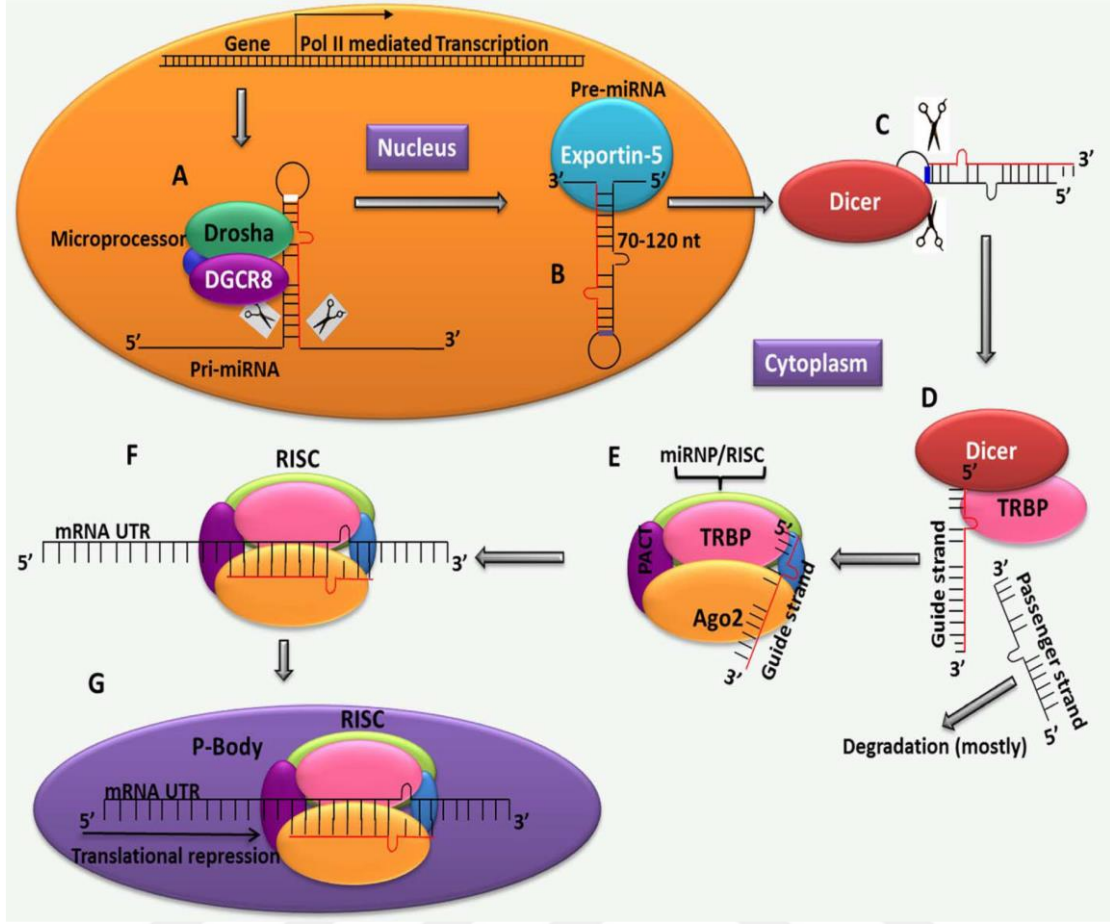


Şekil 2.3.1.1 Aynı intron bölgesinde oluşan birbirinden farklı miRNA'lar (Hammond, 2015).

miRNA'lar ilk olarak çekirdekte çift iplikli, ilmek görünümü, yaklaşık 700 baz çifti boyutunda pri-miRNA olarak sentezlenir. pri-miRNA'lar da mRNA'da oluşu gibi 5' ucuna cap eklenmesi, splicing ve 3' ucuna poli A kuyruğu eklenmesi işlemlerinden geçirilirler (Cai, Hagedorn, & Cullen, 2004). Ardından Drosha adı verilen RNase III endonükleaz ile kesilerek pre-miRNA'ya dönüştürülürler (R. C. Lee & Ambros, 2001; Zeng, Yi, & Cullen, 2003). Drosha enzimi kesim işlemi için RNA bağlayıcı protein olan DGCR8'e ihtiyaç duyar (Han vd., 2004). Oluşturulan pre-miRNA exportin-5 proteini



aracılığıyla aktif taşıma ile sitoplazmaya taşınır (Lund, Guttinger, Calado, Dahlberg, & Kutay, 2004). Burada TRBP adlı RNA bağlayıcı proteine ihtiyaç duyan Dicer enzimi ile kesilir (Gregory, Chendrimada, Cooch, & Shiekhattar, 2005). Oluşan çift zincirli kompleks helikaz enzimi ile öncül miRNA ve onun tamamlayıcı zinciri olarak ayrıştırılır. Tamamlayıcı zincir genellikle yıkıma uğrarken, miRNA ribonükleoprotein (RNP) ile birleşir. Bu kompleks RNA-induced silencing complex (RISC) olarak adlandırılır. RISC kompleksinin tam bileşimi net değildir, ancak dört aile üyesinin insanlarda tanımlandığı Argonaute (Ago1-4) proteinleri temel bileşenleridir (Hammond, Boettcher, Caudy, Kobayashi, & Hannon, 2001). Oluşan RISC kompleksi miRNA aracılığıyla hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak protein sentezini kısmen veya tamamen engelleyebilmektedir (Shomron & Levy, 2009)(Şekil 2.3.1.2). Bununla birlikte, bazı miRNA'lar için, her iki zincirde benzer sıklıkta RISC'e yüklenebilmektedir. Bu durumda, stem loop yapısının 5' ucundaki zincir "5p" ve 3' ucundaki zincir "3p" olarak adlandırılmaktadır (Hammond, 2015). miRNA'lar keşfedildikleri sırayla numaralandırılırlar. Farklı öncü sekanslardan ve genomik lokuslardan kaynaklanan özdeş olgun miRNA sekansları, hsa-miR-219-1 ve hsa-miR-219-2 gibi sayısal numaralarla sonlarına ekleme yapılmaktadır. Öte yandan, sadece bir veya iki nükleotidi farklı olan yakından ilişkili olgun sekanslar hsa-miR-130a, hsa-miR-130b gibi harf eklenerek isimlendirilmiştir (Bhaskaran & Mohan, 2014).



Şekil 2.3.1.2 miRNA'ların sentezi, aktivasyonu ve etki mekanizması (Bhaskaran & Mohan, 2014).

miRNA'ların bir hücrede üretilebilecek toplam proteinlerin yaklaşık %30'unu düzenlediği düşünülmektedir. Böylelikle miRNA'lar hücre çoğalması, gelişmesi, apoptoz, hematopoetik hücrelerin gelişiminin düzenlenmesi, yaşlanma, metabolizma gibi biyolojik olaylarda görev almaktadırlar (Bartel, 2004). miRNA'ların memeli gelişimindeki biyolojik önemi Dicer ve DGCR8 için eksik olan fare modellerinin üretilmesiyle gösterilmiştir. Bu fare modelinin kullanılmasının sebebi Drosha, diğer RNA metabolik yollarında yer alırken, DGCR8 miRNA sentezine özgüdür. Dolayısıyla DGCR8 yokluğu miRNA için daha bilgilendiricidir. miRNA sentezindeki her iki molekülün de kaybı embriyonik ölümle sonuçlanmıştır (Bernstein vd., 2003; Y. Wang, Medvid, Melton, Jaenisch, & Blelloch, 2007). Ayrıca organ ve organ sistemlerinin gelişiminde önemli bir olay olan embriyonik kök hücre farklılaşmasının, miRNA'lar tarafından önemli ölçüde modüle edildiği bulunmuştur (Melton & Blelloch, 2010). Doku üzerindeki etkilerini gözlemlemek için, miRNA'ların

dokuya özgü nakavt edilmesi sonucu çoğu doku tipinde gelişimsel kusurlara yol açtığı gösterilmiştir (Park, Choi, & McManus, 2010) (Tablo 2.3.1.1).

**Tablo 2.3.1.1** miRNA nakavt farelerde oluşan değişimler (Park vd., 2010). SMC; Düz kas hücreleri, KLL; Kronik lenfositik lösemi

Gen	Ekspresyon	Fenotip
miR-155	Timus, Dalak	Akciğer havayollarında değişiklik, Kazanılmış bağışıklık defekti
miR-155	Timus, Dalak	T ve B hücre bağımlı bağışıklıkta bozulma
miR-17-92	Dokuların çoğu	Doğum sonrası akciğer ve kalp defektleri nedeniyle ölüm
miR-15a/16-1	Yaygın ekspresyon	Yaşlılarda KLL ilişkili fenotip
miR-144/451	Eritrosit seri	Eritroid hiperplazi, splenomegali, anemi
miR-150	Olgun B ve T hücreleri	B hücre büyümesi
miR-223	Miyeloid hücreler	Granülosit seri hücre büyümesi
miR-1-2	Kalp, İskelet kası	Kardiyak defekt sonucu ölüm (%50)
miR-143/145	Kalp gelişimi, Yetişkin SMCs	Damarlarda medya tabakasının incilmesi
miR-375	Adacık hücreleri	Hiperglisemi

### 2.3.2. miRNA hedef ilişkisi

miRNA ve hedefi arasındaki tamamlayıcı dizi, tercihen miRNA'nın 5' ucunda 2-8 nükleotit pozisyonunda (7 baz) bulunur ve tohum (seed) olarak adlandırılır (Lewis, Burge, & Bartel, 2005). Bu tamamlayıcılık bir nükleotit eksikle 2-7 pozisyonunda olduğunda, genellikle hedefi baskılamak için yetersizdir ancak 8. pozisyondaki nükleotit bağlanınca hedef baskılanmaktadır (Grimson vd., 2007). Bu standart bağlanma, 1. sıradaki baz ile sonraki 7 tamamlayıcı bazı içerir ve miRNA'ların hedeflerini tahmin etmek için kullanışlıdır. Ancak yine de bu standart bağlanmanın dışında, bağlanmanın gerçekleştiği hedef bölgeleri vardır (Lewis vd., 2005). Son zamanlarda, beş sınıf miRNA bağlanma bölgesi tanımlanmıştır.

1. grup sadece tohum bölgesindeki nükleotit dizilimine dayanır.
2. grup ilk gruba ilaveten 13-16 pozisyonlarındaki nükleotit tamamlayıcılığına
3. grup ilk gruba ilaveten 17-21 pozisyonundaki nükleotit tamamlayıcılığına
4. grup tohum bölgesindeki bağlanma eksikliğine ve merkezi eşleşmeye ( 9-12 baz) dayanır.
5. grup ise dağılmış veya daha az kararlı bağlanma bölgelerine göre sınıflandırılmıştır (Mohr & Mott, 2015).

miRNA'nın hedefine bağlanması için sıklıkla 7-8 tamamlayıcı baz yeterlidir. Daha fazla miktardaki baz sayısı bağlantıyı güçlendirmektedir. RISC'de "susturma" sözcüğü, hedefte tamamen susturmadan daha çok ekspresyonda azalma ve ince ayar yapan bir kompleks için yanlış izlenim vermektedir (Mohr & Mott, 2015). miRNA'ların hedefine bağlanıp baskıladığı mekanizmalar çeşitlidir (Bartel, 2009). Bazı durumlarda, miRNA tohum bölgesinde ve aynı zamanda merkez bölgede (bazlar ~ 9-12) tamamlayıcılık oluşturmaktadır. Bunun sonucu olarak mRNA bölünmesine ve ardından RNA'da bozunmaya neden olmaktadır. Bu sekansa özgü bozunma, tam susturma ile sonuçlanan RNA hidrolizine bağlıdır (Dykxhoorn, Novina, & Sharp, 2003). Çünkü bu endonükleolitik bölünme, 10-11. miRNA bazların karşısındaki hedef nükleotitlere katılan fosfat bağında meydana gelir ve bu bölgedeki yanlış eşleşmeler iyi tolere edilmediklerinden RNA'da bozunma ile sonuçlandırılır (Elbashir, Martinez, Patkaniowska, Lendeckel, & Tuschl, 2001; Martinez & Tuschl, 2004). Buna benzer yüksek derecede tamamlayıcılık derecesine sahip miRNA-hedef etkileşimleri mRNA bozulmasına neden olurken, düşük derecede tamamlayıcılık olduğunda translasyonu azalttığı söylenebilir. Ancak yine de birçok miRNA hedefi, yüksek oranda tamamlayıcılıktan yoksun olsa bile bozunmaktadır (Mohr & Mott, 2015).

Yukarıda anlatılan RNA bozunmasının haricinde miRNA'ların hedef proteinlerinin ekspresyonunu azalttığı çeşitli mekanizmalar vardır. Şu ana kadar deadenilasyonun indüklenmesi, cap bağlanmasının değiştirilmesi, decapping'in indüklenmesi, azalmış ribozom doluluğu ve mRNA'nın translasyon biriminden ayrılması gibi mekanizmalar bildirilmiştir. Bu

mekanizmalar birbirini dışlamamaktadır ve bazıları mRNA seviyelerinin düşmesine neden olurken diğerleri sadece protein ekspresyonunu azaltmaktadırlar. Mikroarray ve ribozom profillemeye analizi kullanılarak, mRNA degradasyonunun ve translasyonel baskılanmanın etkinliği test edilmiş, sonuç olarak miRNA'ların etkisinin çoğunu, hedef mRNA düzeyini azaltarak ortaya çıkardığı tespit edilmiştir (Guo, Ingolia, Weissman, & Bartel, 2010).

Başka bir çalışmada, farklı hücre tiplerinde miRNA hedeflerinin çoğunun büyük ölçüde farklı olmadığı ancak farklılığın daha çok 3'UTR izoformlarına ve çevreye dayandığı bulunmuştur (Nam vd., 2014). Buna ek olarak miRNA'lar, mRNA'ları hedeflemek için birlikte hareket edebilmektedirler. Herhangi bir mRNA 3'UTR bölgesi, birçok miRNA için bağlanma bölgesine sahip olduğundan, miRNA'ların birlikte hedefte baskılanmayı arttırmasına izin vermektedir. Bu şekilde pankreasta, miR-375, miR-124 ve let-7b'nin miyotrofin hedeflemesini arttırmak için birlikte çalıştığı gösterilmiştir. Böylelikle hedefte yüksek miktarda baskılanma oluşmaktadır (Krek vd., 2005).

### **2.3.3. miRNA ve kanser**

miRNA'ların kanserle ilişkisini ilk olarak Calin ve ark. kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalarda miRNA 15-a ve miRNA 16-1 miktarlarının azaldığı veya eksprese olmadığını bularak göstermişlerdir (Calin vd., 2002). Daha sonra Calin ve ark. miRNA'ların kansere katılımını araştırmak için 186 miRNA geninin DNA konumunu haritalamış ve belirli kanserlerle ilişkisi bilinen genetik değişikliklerle karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre miRNA genlerinin, sıklıkla hasarlanması durumunda kansere yol açabilen heterozigotluk kaybı bölgelerinde, minimum amplifikasyon bölgelerinde, kırılma bölgelerinde veya ortak kromozomal kırılma noktası bölgelerinde lokalize oldukları belirlenmiştir (Calin vd., 2004). KLL, antiapoptotik B hücreli lenfoma 2 (Bcl2) proteinini aşırı eksprese eden, artmış sayıda ve ağırlıklı olarak bölünmeyen malign B hücrelerinin varlığı ile karakterizedir. KLL hastalarında, 13q14 kromozomundaki tümör baskılayıcı

lokusun sıklıkla değiştiği bulunmuştur. miR-15a ve miR-16-1 içeren bu bölge, aşırı eksprese edildiğinde, post-transkripsiyonel seviyede antiapoptotik Bcl2 genini negatif olarak düzenlediği ortaya çıkmıştır (Bhaskaran & Mohan, 2014)

Solid organ tmrlерinde miRNA düzeylerinin değiştiğini ilk olarak Michael ve ark. bulmuşlardır (Michael, SM, van Holst Pellekaan, Young, & James, 2003). Daha sonra miRNA'ların akciğer, prostat, meme, karaciğer, tiroid, lenfoma, beyin tümörleriyle ilişkileri hakkında oldukça fazla çalışma yapılmıştır ve halen yapılmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda miktarı azalıp tümör oluşumuna neden olan miRNA'lar tümör baskılayıcı (TS) miRNA, miktarı artıp tümör oluşumu gözlenenlere ise onko-miRNA adı verilmiştir (Cowland vd., 2007; Murakami vd., 2006). Çoğu tümörde, miRNA'ların ekspresyon düzeyleri düşük bulunmuştur. Az diferansiye tümörlerde ise en düşük düzeylerde olduğu saptanmıştır. Bu, muhtemelen miRNA'ların hücre farklılaşmasındaki rolüyle ilişkilidir ve kanser dokularındaki genel farklılaşma kaybına da uygunluk göstermektedir. Miyeloid lösemi hücre dizilerindeki hücre farklılaşmasının, all-trans retinoik asit tarafından uyarılması sonucu miRNA'ların ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Lu vd., 2005). Artmış miR-34 ailesinin, p53 tarafından doğrudan aktive edilen mRNA'lar aracılığıyla hücreleri G1 safhasında durdurarak tümör baskılayıcı yetenekleri sergilediği gösterilmiştir (Bommer vd., 2007). Ayrıca, miR-34'n, SIRT1 genini inhibe etmesi sonucu p53, p21 ve PUMA'nın (p53-upregulated modulator of apoptosis) düzeylerini arttırdığı, böylece hücre döngüsünü ve apoptozu düzenlediği ve tümör baskılayıcı olarak SIRT1-p53 yolunu modüle ederek işlev yaptığı gösterilmiştir (Bhaskaran & Mohan, 2014). PK dokuları üzerinde yapılan bir çalışmada miR-21 ve miR-182 ekspresyon seviyeleri yüksek, let-7c, miR-145, and miR-221 ekspresyonları düşük bulunmuş ve miR-221'in düşük grade PK'lerde rekürrens ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kurul vd., 2019).

#### **2.3.4. Belirteç olarak miRNA'lar**

Mitchell ve ark. 2008 yılında yaptıkları çalışmada endojen miRNA'ların kanda stabil olduklarını ve RNAz enzimleri tarafından yıkılamadıklarını

göstermişlerdir. Böylelikle miRNA'ların hastalıkların teşhisinde belirteç olarak da kullanılabileceği düşünülmüştür (Mitchell vd., 2008). Daha sonra miRNA'lar plazma, tükürük, idrar, süt gibi 12 farklı vücut sıvısında stabil olarak izole edebilmiştir (Weber vd., 2010). Güzel ve ark. (2015) BPH ve PK'li hastaların prostat sekresyonundan miRNA düzeylerini mikroarray ve qRT-PCR yöntemiyle incelemiş ve belirteç olarak kullanılabileceklerini öne sürmüşlerdir (Guzel vd., 2015). Böylelikle miRNA'ların belirteç olarak kullanılabileceğine dair çalışmalar hız kazanmıştır. miRNA'lar normal ve kanserli dokuları birbirinden doğru bir şekilde ayırt edebilmesinin yanı sıra farklı evredeki kanserleri de sınıflandırabilmektedir. Wach ve ark. yaptıkları çalışmada miR-375 ile çözünebilir ürokinaz plazminojen aktivatör'ün (suPAR) birlikte PK'nin teşhisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Wach vd., 2015)

Kanserleri spesifik olarak ayırt etme konusunda, miRNA ve mRNA ekspresyonu düzeylerinin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, 17 karsinomun sadece 1'i mRNA ekspresyonu ile ayırt edilebilirken, 17 karsinomun 12'si miRNA'lar ile ayırt edilebilmiştir (Lu vd., 2005). Bu sonuç miRNA'nın mRNA'ya göre daha iyi bir belirteç olabileceğini göstermektedir. Plazmada yapılan bir çalışmada, ekspresyon düzeyleri düşük olan Let-7c, let-7e, miR-30c ile yüksek olan miR-622, miR-1285'in bir panel şeklinde, PK'nin teşhisinde belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Z. H. Chen vd., 2012). Kanser oluşumu çoklu sinyal iletim yollarındaki değişikliklerin karmaşık bir entegrasyonu olduğundan, miRNA'ların ekspresyon profilini sadece bir miRNA'dan ziyade tümöre özgü biyobelirteçler olarak incelemek daha iyidir. Bu nedenle, yüzlerce miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinin klinik teşhis sonucunun doğruluğunu artıracakı düşünülmektedir (Pang, Young, & Yuan, 2010).

### **2.3.5. Tedavi ajanı olarak miRNA'lar**

miRNA terapötikleri genel olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Hastalıkta düzeyleri azalmış TS-miRNA'lar için tedavi hedefi miRNA'nın yerini doldurmaktır. Bunu başarmak için sentetik miRNA mimikleri geliştirilmiştir. Bunlar doğrudan RISC'ye yüklenen dsRNA dupleksleridir.

Hastalıkta ekspresyon düzeyleri artan onko-miRNA'lar ise antisens oligonükleotit inhibitörleri tarafından hedeflenebilmektedir. Bu inhibitörlerin, büyük olasılıkla RISC kompleksinde miRNA'ya bağlandıkları ve miRNA'nın hedef mRNA'lara bağlanmasını önledikleri rapor edilmiştir (Hammond, 2015). Kanser tedavilerinde ikinci grup olarak, antagomirler olarak adlandırılan bir kolesterol konjuge sınıfı anti-miRNA'lar onko-miRNA'ları bloke etmek için kullanılmıştır (Rossbach, 2010). Afrika yeşil maymunlarında olgun miR-122, intravenöz yoldan verilen LNA-anti-miRNA-122 ile etkili ve stabil bir şekilde hiçbir yan etki olmadan susturulmuştur (Elmen vd., 2008). Aşağıdaki tabloda deneme aşamasında olan ajanlar verilmiştir (Tablo 2.3.5.1) (<http://regulusrx.com/programs/pipeline/>).

**Tablo 2.3.5.1** Deneme aşamasında olan miRNA'lar (Web 2).

HEDEF	HEDEF ORGAN	BİLEŞİM	KLİNİK ÖNCESİ	FAZ 1	FAZ 2	FAZ3
Alport sendromu (miR-21) Orphan hastalığı	Böbrek	RG-012				
ADPKD (miR-17)	Böbrek	RGLS4326				
HBV (Gizli Hedef)						
Gliablastome Multiforme (miR-10b)	CNS	RGLS5579				
NASH (miR-132)	Karaciğer					
HCV (miR-122)	Karaciğer					
Enfeksiyon Hastalıkları (Gizli Hedef)						
İmmünoloji (Gizli Hedef)						

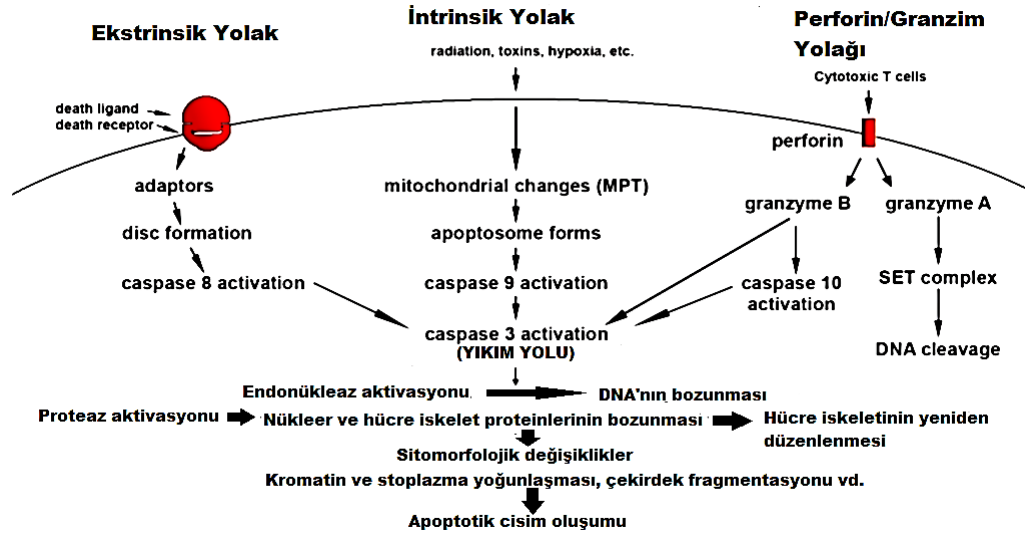
Her ne kadar miRNA'ların in vivo dağıtımında stabilite ve verimin elde edilmesi büyük bir zorluk olsa da, yapılan ilerlemeler tamamen yeni, küçük RNA-bazlı terapötik alanın hızlı bir şekilde ortaya çıktığını göstermektedir. Bu gelişmeler, miRNA'ların potansiyel biyobelirteç rolleriyle birlikte, tanı, sınıflandırma ve tedaviyi içeren bir hastalık sürecinin birçok yönünü araştırmak için onları paha biçilmez araçlar haline getirmektedir (Bhaskaran & Mohan, 2014)



### 3. APOPTOZ

Apoptoz, DNA hasarı sonrası veya gelişim sırasında zarar görmüş hücrelerin düzenli ve etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasıyla sonuçlanan programlı hücre ölümüdür (Fuchs & Steller, 2011). Apoptoz karmaşık birçok sinyal yolağını içermekle beraber, kaspaz aracılı intrinsik ve ekstrinsik yollar aracılığıyla tetiklenebilmektedir. Her iki yol da efektör kaspazları aktive etmek için birleşerek, sonuçta apoptozun tipik özellikleri olan morfolojik ve biyokimyasal hücresel değişikliklere neden olmaktadır (Wong, 2011). Morfolojik açıdan apoptotik hücreler, hücre zarında tomurcuklanma, hücre dışı taraftan mebranın fosfatidilserin'e maruz kalması, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmantasyonu, sitoplazmik hücre büzülmesi gibi tipik özellikler göstermektedir (Saraste & Pulkki, 2000).

Kaspazlar, esas olarak apoptotik yolun başlangıcından sorumlu olan başlatıcılar (kaspaz-2, -8, -9, -10) ve hücresel komponentlerin parçalanmasından sorumlu efektörler (kaspaz-3, -6, -7) olarak apoptozda merkezi öneme sahiptirler (Thornberry & Lazebnik, 1998). Başlatıcı kaspazlar bir kez aktive olduğunda kaskad halinde efektör kaspazları ayırmakta, sonuç olarak hücre ölümü gerçekleşmektedir (Stennicke & Salvesen, 2000). Bu olay intrinsik ve ekstrinsik yolların DNA ve hücresel bileşenlerin bozulmasına izin veren kaspaz-3, -6 ve -7 üzerinde birleşmesi sonucu gerçekleşir ve geri dönüşümsüzdür (Pistrutto, Trisciuoglio, Ceci, Garufi, & D'Orazi, 2016). Apoptoz sürecinde meydana gelen olaylar Şekil 3.1'de özetlenmiştir (Elmore, 2007).



Şekil 3.1 Apoptotik olayların şematik gösterimi (Elmore, 2007).

Kanser oluşumu sırasında apoptozisin baskılanmasının bazı kanserlerin gelişiminde ve ilerlemesinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (Kerr, Winterford, & Harmon, 1994). Apoptozu baskılamak için tümör hücrelerinin kullandığı çeşitli moleküler mekanizmalar vardır. Bunlar arasında bozulmuş ölüm reseptörü sinyalleri, proapoptotik (Bax gibi) ve anti-apoptotik (Bcl-2 gibi) proteinler arasındaki bozulma dengesi, azalmış kaspaz fonksiyonu ve bozulmuş p53 fonksiyonu bulunmaktadır (Pistritto vd., 2016). Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyonu, p53 tümör baskılayıcı gen tarafından düzenlenmektedir (Miyashita vd., 1994). p53, DNA sürekli zarar gördüğünde DNA onarım proteinlerini aktive edebilir, hücre döngüsünü G1 / S düzenleme noktasında tutabilir ve DNA hasarı onarılamaz hale gelirse apoptozu başlatabilir (Pietenpol & Stewart, 2002). P53 geni hasara uğradığında tümör baskılanmasında ciddi oranda azalma görülmektedir ve tüm insan kanserlerinin % 50'sinde mutasyona uğradığı düşünüldüğünde, bu genin kritik öneme sahip olduğu açıktır (Elmore, 2007). Nöroblastom, medulloblastom ve küçük hücreli akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde, kaspaz-8 ekspresyonunun yok veya azalmış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca intrinsik apoptotik yolun bazı bileşenlerinde değişiklikler meydana gelmesinin, farklı tümör türlerinde kemoterapiye direnç geliştirilmesinde temel bir rol oynadığı düşünülmektedir (Pistritto vd., 2016).

#### 4. Matriks Metalloproteninazlar

Ekstrasellüler matriks (ECM) ve bazal membran yıkımında görev alan proteolitik enzimler arasında ana enzimlerin matriksin olarak da adlandırılan çinko bağımlı matriks metaloproteinazlar (MMP'ler) olduğu kabul edilmektedir (Visse & Nagase, 2003). Fizyolojik olarak hücre göçüne ve mikroçevrenin düzenlenmesine olanak sağlayan ECM yıkılması, embriyonik büyüme ve dokuların gelişimi için gereklidir (Folgueras, Pendas, Sanchez, & Lopez-Otin, 2004). Ayrıca proteolitik enzimler, kanserlerin vasküler ve lenfatik sistemlere erişimini sağlayarak ilerlemesini sağlamakta ve tümör büyümesini destekleyerek daha fazla yayılması için bir kaçış yolu oluşturulmasında temel bir rol oynamaktadırlar (Chambers, Groom, & MacDonald, 2002). MMP'lerin 24 üyesi tanımlanmıştır ve normal dokularda aktiviteleri ihmal edilebilecek düzeydedir. MMP'lerin ekspresyonları enflamatuar sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi ile transkripsiyonel olarak kontrol edilmektedir (H. Nagase & Woessner, 1999). Ayrıca proenzim aktivasyonu ve enzim aktivitesinin inhibe edilmesiyle de kontrol edilmektedir (Folgueras vd., 2004). Bağlandıkları substratların özelliklerine göre kolajenazlar (MMP 1, 8, 13), jelatinazlar (MMP 2, 9), stromelizinler (MMP 3, 10, 11, 20) gibi altı alt gruba ayrılmaktadırlar (Nosrati, Kheirouri, Ghodsi, & Ojaghi, 2019). Son zamanlarda yapılan çalışmalar MMP 1, 2 ve 11'in hücre içinde de bulunduğunu ve hücre içi proteinlere de etki gösterdiklerini ortaya koymuştur. MMP'ler hücre göçünü, farklılaşmasını, büyümesini, enflamatuar süreçleri, yeni damar oluşumunu, apoptozu etkileyebilecek birçok olayda görev almaktadırlar (Hideaki Nagase, Visse, & Murphy, 2006).

MMP'ler ECM'yi parçalayarak kanser hücrelerinin yayılmasını kolaylaştırdığı gibi, primer ve metastatik tümörlerin büyümeye başlamasının ve ilerlemesinin devamı için gerekli mikro-ortamı düzenleyebilme yeteneğine de sahiptir ve hemen hemen tüm insan kanserlerinde normal dokuya kıyasla ekspresyonu ve aktivasyonu artmaktadır (Egeblad & Werb, 2002). MMP-2'nin laminin 5 proteininin  $\alpha$  zincirindeki bağı kırması sonucu hücre migrasyonunu

arttırdığı bulunmuştur. Laminin 5'in bu bölünmüş formu, tümörlerde ve yeniden şekillenen dokularda bulunmasına rağmen stabil dokularda bulunmamıştır. Transgenik farelerde yapılan deneyler, MMP-9 ekspresyonunun blastositin büyümesi sırasında, erken implantasyonun erken aşamalarında ve geç embriyonik iskelet dokusu gelişiminde kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir (H. Nagase & Woessner, 1999). Başlangıçta MMP'lerin yalnızca migrasyon ve metastazda önemli olduğu düşünülmüştür, ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar MMP'lerin kanser oluşumunda, tümör hücrelerinin büyümesi, anti-apoptotik ve apoptotik aktiviteler, anjiogenez gibi farklı aşamalarda da yer aldığını göstermiştir (Yadav vd., 2014). Bir çalışmada MMP-9 düzeylerinin PK dokularında BPH'lilere göre oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca PK'nin evresi arttıkça MMP-9 düzeylerinde çok daha fazla artış olduğu görülmüştür (Baspınar, Bircan, Ciris, Karahan, & Bozkurt, 2017).

## 5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ❖ miRCURY™ RNA izolasyon kiti (Qiagen)
- ❖ Universal cDNA sentez kiti (Qiagen)
- ❖ Exilent SYBR Green master mix (Qiagen)
- ❖ Primerler (Qiagen):

**hsa-let-7i-5p** : 5' UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU 3' (house keeping)

**hsa-miR-125b-5p** : 5' UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA 3'

**hsa-miR-145-5p** : 5' GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU 3'

**hsa-miR-221-3p** : 5' AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC 3'

**hsa-miR-486-5p** : 5' UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG 3'

**hsa-miR-361-3p** : 5' UCCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU 3'

**hsa-miR-1285-5p** : 5' GAUCUCACUUUGUUGCCCAGG 3'

**hsa-miR-301a-3p** : 5' CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAAGC 3'

**hsa-miR-203a-3p** : 5' GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG 3'

**hsa-miR-130b-3p** : 5' CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU 3'

- ❖ Mimikler (Qiagen):

hsa-miR-125b-5p miRCURY LNA miRNA Mimic;

Mature miRNA sequence: UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA

miRNA sequence (pre-miR): UGCGCUCCUCUCAGUCCCUGAGACCCUAAC  
UUGUGAUGUUUACCGUUUAAAUCCACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCUG  
CGAGUCGUGCU

hsa-miR-145-5p miRCURY LNA miRNA Mimic;

Mature miRNA sequence: GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU

miRNA sequence (pre-miR): CACCUUGUCCUCACG GUCCAGUUUCCCAG  
GAAUCCCUUAGAUGCUAAGAUGGGGAUUCUGGAAAUACUGUUCUUG  
AGGUCAUGGUU

hsa-miR-221-3p miRCURY LNA miRNA Mimic:

Mature miRNA sequence: AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC

MiRNA sequence (pre-miR):UGAACAUCCAGGUCUGGGGCAUGAACCUGGC  
AUACAAUGUAGAUUUCUGUGUUCGUUAGGCAACAGCUACAUUGUCUG  
CUGGGUUUCAGGCUACCUGGAAACAUGUUCUC

❖ Sandwich ELISA Kitleri (SunRed);

Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9, Matriks Metalloproteinase (MMP) 2, MMP 9.

❖ DU 145 Prostat Kanseri hücre dizisi (ATCC)

❖ 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma)

❖ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma)

❖ Fetal Dana Serumu (Fetal Calf Serum= FCS, Sigma)

❖ Antibiyotikler; Penisilin, streptomisin (Sigma)

❖ % 0,25'lik tripsin-EDTA (Sigma)

❖ Transfeksiyon reagenti (Xfect Takara)

❖ Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ve Bax antikorları (Bcl-2 ilişkili X protein, Santa Cruz)

❖ Hematoksilen ve Eozin boyası (H-E, Diapath)

❖ Dimethyl sülfoksit (DMSO, Sigma)

❖ Alkol %95'lik

## 5.2. Kullanılan Cihazlar

❖ LightCycler® Nano RT-PCR cihazı (Roch)

❖ Hücre inkübatörü (Panasonic)

❖ Güvenlik Kabini (Hedlab)

❖ Soğutmalı santrifüj (Nüve NF800R)

❖ Nanodrop cihazı (Roch)

❖ Inverted ışık mikroskobu (Olympus)

❖ Hücre sayım cihazı (Cedex)

- ❖ Her ebatta mikropipet (Eppendorf)
- ❖ Spektrofotometre (BioTek)

### 5.3. Kullanılan Çözeltiler

- ❖ Phosphate Buffered Saline (PBS); NaCl: 8 gr, KCl:0.2 gr, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.2 gr, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:2.32 gr, tartılıp 1 litre steril distile suya eklenip hazırlandı.
- ❖ Hücre ortamı DMEM (%89), FCS (%10) ve penisilin + streptomisin (%1) oranında karıştırılarak hazırlandı.
- ❖ MTT 5mg/ml olacak şekilde PBS ile karıştırılıp 0,22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek hazırlandı.
- ❖ % 95'lik alkol steril distile su ile sulandırılarak % 70 oranında alkol hazırlandı.

### 5.4. Kullanılan Sarf Malzemeler

- ❖ Hücreler için T-25 (25 cm<sup>2</sup>) ,T-75'lik (75cm<sup>2</sup>) flasklar
- ❖ Tüpler; 0,25 ml, 0,50 ml, 1,50 ml ebatlarında
- ❖ Serolojik pipetler; 1ml, 5 ml, 10 ml ebatlarında
- ❖ PCR tüpleri 0,2 ml
- ❖ Hücre stoklamak için, 1,25 ml ve 1,5 ml ebatlarında kriyo tüpler
- ❖ Pipet uçları; 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl

### 5.5. Kullanılan Materyal

Projenin etik kurul onayı ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI'nın 13 Nisan 2016 tarihli 14 nolu karar sayılı izni ile alınmıştır.

Projenin laboratuvar çalışmaları ESOGÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı. Projenin PCR kısmı için ESOGÜ Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na gelen hastalardan yaklaşık 5 mL kan EDTA'lı tüplere alındı. Çalışmamıza alınan hasta grupları BPH tanısı konmuş olanlar, radikal prostatektomi ameliyatı öncesi ve sonrası PK tanısı konmuş olanlardan oluşturuldu. Gruplardaki hasta sayıları aşağıda özetlenmiştir.

**Grup 1:** ESOGÜ Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nca BPH tanısı konulmuş hastalar kontrol grubu olarak kullanıldı (**BPH, 18 hasta**).

**Grup 2:** Prostat biyopsisi sonucu Patoloji Anabilim Dalı'ndan kesin olarak kanser tanısı alan ve Üroloji Anabilim Dalı'nda radikal prostatektomi ameliyatından bir gün önce kan örneği alınan hastalar (**AÖ, 19 hasta**).

**Grup 3:** İkinci gruptaki radikal prostatektomi ameliyatı geçiren hastalardan, ameliyattan 4-8 hafta sonra kan örneği alındı (**AS, 19 hasta**).

Hastalardan alınan kanlar 4000 devir, 4 °C'de 15 dk santrifüj cihazında santrifüj edildikten sonra plazma kısmı alındı ve -80 °C'de saklandı.

## **5.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Aşaması**

Çalışmamızda hasta plazmalarında bir house keeping geni ve 9 adet hedef geni olmak üzere on adet miRNA ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile ölçüldü.

### **5.6.1. miRNA izolasyonu**

miRNA izolasyon işlemi ilgili kitin protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

- 1) Tüpe 200 µl plazma kondu, üstüne 60 µl lysis buffer eklenip oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi.
- 2) Üstüne 20 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi ve bir dk beklendikten sonra üç dk 1100x g de santrifüj edildi.
- 3) Elde edilen süpernatant yeni tüpe alınıp üzerine 270 µl isopropanol eklenip vortekslendi.
- 4) Spin kolon toplama tüpüne yerleştirildikten sonra üzerine örnek eklenip iki dk. oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra 30 sn 11000xg'de santrifüj edildi.
- 5) Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve üç kez yıkama işlemi yapıldı.

Üç yıkama işleminden önce DNA kontaminasyonunu engellemek için ek bir protokol uygulandı. Bu protokole göre;



A) 700 µl yıkama solüsyonu II, spin kolon membranına pipet yardımıyla direkt olarak boşaltıldı ve 11000xg de 30 sn santrifüj edildi.

B) Alttaki tüpte biriken sıvı atıldı. Spin kolon tüpe tekrar yerleştirildi. 250 µl yıkama solüsyonu II ile tekrar yıkama işlemi yapıldıktan sonra 11000xg de 2 dk santrifüj edildi.

C) Alttaki sıvı atıldı. Spin kolondaki membrana 50 µl rDNAse direkt olarak damlatıldı. Oda ısısında 15 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra yıkama işlemine geçildi.

İlk yıkama: 100 µl yıkama solüsyonu I ile yapıldıktan sonra 11000xg de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.

İkinci yıkama: 700 µl yıkama solüsyonu II ile yapıldı, ardından 11000xg de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.

Üçüncü yıkama: 250 µl yıkama solüsyonu II ile yapıldı, ardından 11000xg de 2 dk santrifüj edildi. Spin kolondaki membranın iyice kurumaması beklendi.

6) Spin kolon 1,5 ml'lik yeni bir tüpe yerleştirildi ve üzerine 50µl RNase içermeyen su eklendi. Bir dk oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra 1 dk 11000xg de santrifüj edildi.

Elde edilen Total RNA konsantrasyonları Nanodrop cihazında ölçüldü ve miRNA örnekleri -80 °C saklandı.

### **5.6.2. cDNA sentezi**

cDNA sentezi için cDNA sentez kiti kullanıldı ve kitin protokolü takip edilerek işlemler aşağıdaki belirtildiği gibi yapıldı.

1) Total RNA her örnek için 10 ng olacak şekilde miktarı ayarlandı.

2) cDNA sentezi için alınan reaksiyon mix (2 µl), enzim (1 µl) ve spike kitlerinden karışım (0,5 µl) hazırlandı. Örnek totalde 10 ng olacak şekilde üstüne eklendi. Total hacim 10 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile tamamlandı.

3) Reaksiyon için aşağıdaki program thermal cycler cihazında ayarlandı ve gerçekleştirildi.

42 °C                      60 dk

95 °C                      5 dk

Elde edilen cDNA'lar -20 °C' de saklandı.

### **5.6.3. qRT-PCR miRNA ekspresyon analizi**

miRNA ekspresyon analizi için LightCycler® Nano PCR cihazı kullanıldı.

cDNA'lar 1:40 oranında sulandırıldı.

RT-PCR tüpünde 5 µl master mix, 1µl primer, 4µl cDNA (totalde 10 µl) olacak şekilde karışım hazırlanıp RT-PCR cihazına kondu. Cihazda aşağıdaki gibi program ayarlanıp reaksiyon gerçekleştirildi.

95 °C 10 dk                      (Hold)  
95 °C 10 sn } 60 °C 1 dk        (45 döngü)  
Melting Curve aşaması

## **5.7. Hücre Kültürü Aşaması**

### **5.7.1. Hücrelerin ekimi ve yaşatılması**

Hücre kültürü aşaması için DU 145 prostat kanseri hücre dizisi kullanıldı. Hücreler inkübatörde % 5 CO<sub>2</sub>, % 95 O<sub>2</sub> içeren ve 37 °C sıcaklığın olduğu ortamda T-25 (25 cm<sup>2</sup>) ve T-75'lik (75cm<sup>2</sup>) flasklarda çoğaltıldı. Hücrelerin çoğaltıldığı besiyeri +4°C'de saklanan DMEM (%89), -20°C'de saklanan FCS (%10) ve penisilin + streptomisin (%1) karıştırılarak hazırlandı.

Daha sonra kullanılmak üzere sıvı nitrojen içerisinde muhafaza edilen hücreler çözündükten sonra 5 ml besiyeri eklenerek 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekimi yapıldı ve inkübatörde çoğaltılmaya bırakıldı. İnkübatörde bulunan flasklar, iki günde bir laboratuvarımızda bulunan alttan aydınlatmalı (inverted) ışık mikroskobu ile hücre çoğalma ve gelişmesi yönünden kontrol edildi. Hücrelerin fizyolojik ve biyokimyasal aktiviteleri göz önünde bulundurularak, flasklarda renk değişimi gözlenen besiyerleri steril pipet aracılığıyla atılıp,

yenisi eklendi. Hücrelerin 25 cm<sup>2</sup>'lik flaskların tabanını % 85-90 civarında kaplamasıyla birlikte 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alındı ve hücreler bu flasklarda çoğaltılıp deneye alındı.

### **5.7.2. Hücre sayımı**

Deney aşamasında istediğimiz sayıda hücre ekiminin yapılabilmesi için hücre sayımı yapılması gerekmektedir. Bunun için hücre canlılık oranının ölçülebildiği Tripan mavisi yöntemi kullanıldı. Bu sayede 1 ml'deki canlı hücre sayısı belirlenebilmektedir. Canlı olan ve hücre zarı hasar görmemiş hücreler Tripan mavisi ile boyanmamakta, boya hücrenin içine girmemektedir. Canlı olmayan hücreler boyayı absorbe etmekte ve Tripan mavisi ile mavi boyanmaktadırlar.

Öncelikle flasklarda bulunan besiyeri pipetle çekilerek atıldı ve PBS ile yıkama yapıldı. Kalan hücreler tabandan uzaklaştırılmak için % 0,25'lik tripsin-EDTA ile muamele edilerek inkübatörde 37°C'de 5 dakika beklendi. Ardından santrifüj tüpü içerisine tripsin miktarının yaklaşık iki katı miktarda besiyeri eklenerek tripsinin etkisi uzaklaştırıldı. 900 devir, 4°C ve 5 dk olmak üzere santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 2 ml besiyeri eklendi. Geriye kalan hücre solüsyonu pipetaj ile homojen hale getirildi. Eppendorf tüpüne 0,1 ml hücre solüsyonu, 0,15 ml PBS, 0,25 ml Tripan mavisi konuldu ve hafifçe dairesel hareketlerle çalkalandı. 5 dk karanlıkta inkübe edildikten sonra hücre sayım cihazının sayım kasetine 10 µl olacak şekilde örnek konularak hücre canlılık durumu belirlendi ve hücre sayımı yapıldı.

### **5.7.3. Mimik transfeksiyonu**

Mimik (agonist) transferi için transfect reagent kullanıldı. Protokole göre transfeksiyon için 2 tüp kullanıldı ve 96 kuyucuklu plate için aşağıdaki miktarlarda hazırlandı.

<u>Tüp 1(miRNA)</u>	<u>Tüp 2 (transfect polimer)</u>
__ µl ( 5 pmol) miRNA	0,5 µl Xfect miRNA
__µl Xfect reaksiyon buffer	4,5 µl Xfect reaksiyon buffer
5 µl total volüm	5 µl total volüm

Her tüp vortekslendikten sonra tüp 2, tüp 1'e eklendi. Karışım tekrar vortekslendi. Oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildikten sonra hücre besiyerine verilmeye hazır hale geldi. Hücreler içinde serum olmayan besiyerine alındı. Bu besiyerine hazırlanan karışım eklenerek 4 saat inkübe edildi. Daha sonra inkübatörden hücreler alınarak besiyeri normal besiyeri ile değiştirildi. Böylelikle hücreler deneysel işleme hazır hale getirildi. Kontrol grubu ise, eklenecek miRNA miktarı yerine reaksiyon buffer konarak aynı işlemlerden geçirildi.

#### ***5.7.4. MTT yöntemi ile hücre canlılığının ölçülmesi***

Mitokondri enzim substratı olan tetrazolium tuzları hücrelere verilerek renge dayalı olarak spektrofotometrik analiz yapılmaktadır. Tetrazolium halkası canlı hücre mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri ile parçalanarak, renkli formazan kristalleri oluşmaktadır. Canlı hücre mitokondrisi sarı-soluk renkli MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayarak koyu mavi-mor renkli formazana indirgemektedir. Sonuçta canlı ve mitokondri enzimleri aktif hücreler mor renkte boyanırken, ölü hücreler boyanmamaktadır.

Tripan mavisi yöntemi ile 1 ml'deki hücre sayısı belirlendi. Hücreler, 100 µl besiyeri eklenerek her bir kuyucuğa  $3 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plate'lere ekildi. 24 saat tabana tutunmaları için süre verildi. Ardından hücrelere mimik transferi yapıldı. 48 ve 72 saat sonunda her bir kuyucuk için 10 µl MTT çözeltisi eklenerek 37°C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltılarak her kuyucuğa 100'er µl DMSO konuldu. 5 dk karanlık ortamda hafifçe sallanarak beklendi. Oluşan formazan kristalleri 550 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Kuyucuklarda

okunan optik yoğunluk kontrol hücrelerine göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Deney 3 kez tekrarlandı.

#### **5.7.5. ELISA yöntemi**

DU 145 hücrelerinde, kaspaz 3-8-9 ile MMP 2 ve 9 düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü Her kuyucuğa  $2 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plate ekim için kullanıldı. Mimik transferinin ardından 48 saat beklendikten sonra hücreler işleme alınmıştır. Hücreler kuyucukların tabanından kaldırıldıktan sonra medyum ile birlikte 3000 devir/dk, 4°C ve 5 dk olmak üzere santrifüj edildi. Medium uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası PBS uzaklaştırıldı, 0.5 ml soğuk 1mM fenilmetilsülfonil florid (PMSF) eklendi ve 5 dk buz üzerinde bekletildikten sonra buz üzerinde sonike edildi. Bu şekilde hücreler parçalandı. Daha sonra 12000xg'de +4 °C'de santrifüj edildikten sonra hücre lizati bulunan süpernatant başka bir tüpe alınarak -80 °C'de çalışılıncaya kadar saklandı. Çalışmaya başlamadan önce nanodrop cihazı aracılığıyla bütün örneklerdeki protein miktarı ölçüldü. Protein miktarı 0,04 mg/ml olacak şekilde ayarlanıp ELISA işlemine alındı. ELISA prosedürü aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

1-) Standarttan 120 µl alınarak üzerine 120 µl standart dilüent eklendi ve standart 5 hazırlandı. Daha sonra standart 5'ten 120 µl alınıp üzerine 120 µl standart dilüent eklendi ve standart 4 oluşturuldu. Bu şekilde azalan seri halinde beş standart oluşturuldu.

2-) Kör olarak kullanılacak kuyucuğa hiçbir şey konulmadı. Beş adet standart kuyucuğu, 50 µl Streptavidin-HRP ve 50 µl standart konularak hazırlandı.

3-) Örnek kuyucukları ise 50 µl Streptavidin-HRP, 40 µl örnek ve 10 µl antikor eklenerek hazırlandı.

4-) Kuyucuklar hazırlandıktan sonra 37 °C'de 60 dk inkübe edildi.

5-) Bütün kuyucuklar yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı.

6-) Bütün kuyucuklara 50 µl chromogen solution A ve 50 µl chromogen solution B eklendi ve 37 °C'de 10 dk inkübe edildi.

7-) Bütün kuyucuklara stop solüsyonu eklendi ve 10 dk içinde spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.

#### **5.7.6. H-E boyama**

H-E boyaması çok uzun yıllardan beridir dokularda ve hücrelerde morfolojik incelemelerde kullanılan bir yöntemdir. Çeşitli fiksatiflerle beraber kullanılabilir ve bu boyamayla dokunun sitoplazmik, nükleer ve hücre dışı matriks özellikleri hakkında bilgi sağlamak mümkündür. Bu ikili boyama tekniğinin bir bileşeni olan hematoksilen non-spesifik olarak çekirdeği koyu mavi-mor bir renge boyamaktadır. Bu boyanma bazofilik boyanma olarak adlandırılır. Diğer bir bileşeni olan eozin ise pembe ve sitoplazmayı non-spesifik olarak pembe renge boyar. Bu boyanmaya da eozinofilik boyanma adı verilir. Bu boyanmada normal hücreler geniş sitoplazmaya sahip ve çekirdekler açık renkte boyanmaktadır. Hücrelerde ölüm süreci başladığında, sitoplazma gittikçe azalmakta ve çekirdek küçülerek kondanse hale gelmektedir. Ardından çekirdek fragmente olarak hücre ölümü görülmektedir (Larson, Ho, Anumolu, & Chen, 2011).

Hücrelerde mimik transferi sonrası oluşan değişimlerin morfolojisini gözlemlemek için H-E boyama yapıldı. 6 kuyucuklu plate, kuyucuk başına  $4 \times 10^4$  hücre ekildi ve transfeksiyon işleminin ardından 48. ve 72. saatte boyamaya alındı. Yapılan işlemler sırasıyla şöyledir;

- 1-) İnkübasyon sonrasında hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler steril PBS ile birkaç defa yıkama işleminden geçirildi
- 2-) Daha sonra hücreler soğuk metanol çözeltisiyle 10 dk fikse edildi.
- 3-) Fiksasyonun hemen sonrasında hücreler herbiri 5 dk olmak üzere üç defa PBS ile yıkandı.
- 4-) Ardından % 0.2 Triton X ile 5 dk inkübe edildikten sonra her biri 5 dk olmak üzere üç defa PBS ile yıkandı.
- 5-) Hücreler 5 dk hematoksilen boyasında bekletildikten sonra herbiri 5 dk olmak üzere üç defa PBS ile yıkandı ve daha sonra, 5 dk % 1 amonyaklı suda bekletildi.

6-) Üç defa PBS ile yıkama aşamasından sonra 3-4 dk boyunca eozin ile boyandıktan sonra üç defa PBS ile yıkandı ve bu işlemi takiben su bazlı yapıştırıcı ile kapatılarak mikroskopta incelendi.

#### **5.7.7. Bax/ Bcl-2 immunositokimya boyama ile apoptoz tayini**

1-) Altı kuyucuklu flaskın tabanına lamel kondu, üzerine  $4 \times 10^4$  hücre ekimi yapıldı ve bir gün sonra mimik transferi yapıldı

2-) 30 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler steril PBS ile birkaç defa yıkandı.

3-) Daha sonra hücreler soğuk metanol çözeltisiyle 10 dk fikse edildi.

4-) Fiksasyonun hemen sonrasında hücreler her biri 5 dk olmak üzere üç defa PBS ile yıkandı.

5-) Ardından % 0.2 triton X ile 5 dk inkübe edildi ve her biri 5 dk olmak üzere 3 defa PBS ile yıkandı.

6-) On dk hazır bloklama solüsyonuyla bloke edildi.

7-) Üstü hidrofobik kalemle çizildikten sonra yeterli derecede seyreltilmiş Bcl-2 veya Bax primer antikörleri eklendi.

8-) +4 °C' de gece boyu nemli ortamda inkübe edildi.

9-) Ertesi gün her biri 5 dk olmak üzere üç defa PBS ile yıkandı, bu şekilde bağlanmayan antikörler uzaklaştırılmış oldu.

10-) Daha sonra 10 dk boyunca biotinli keçi anti-polivalant solüsyonuna tabi tutuldu.

11-) Her biri 5 dk olmak üzere üç defa PBS ile yıkandıktan sonra hücreler on dk streptavidin peroxidase konjugatıyla inkübe edildi.

12-) Her biri 5 dk olmak üzere üç defa PBS ile yıkandıktan sonra kromojen eklendi.

13-) Mikroskopta renk değişimi görülünce karşıt boyama yapıldı ve hücreler su bazlı yapıştırıcı ile kapatılarak mikroskopta incelendi.

### **5.7.8. Migrasyon testi**

- 1-) Altı kuyucuklu plakalara hücre ekimi yapıldı.
- 2-) Plakanın tabanı hücreler tarafından kaplandığında mimik transferi yapıldı.
- 3-) Tabanı hücrelerce kaplanmış durumdaki (konfluent) kuyucuklar 100 µl sarı pipet ucuyla çizildi.
- 4-) Çizilmeyle beraber kalkan hücrelerin uzaklaştırılması için besiyeri değiştirildi.
- 5-) Hücreler arası eşit uzunlukta oluşturulan bölgeler (yara alanı) mikroskopta incelenerek işaretlendi.
- 6-) Bu işaretlenen yara alanları, belirli aralıklarla mikroskopta tekrar incelenerek resimler çekildi. Yara alanı kapandığında resim çekimi sonlandırıldı.
- 7-) En son elde edilen resimlerde hücrelere arası yara alanı ve değişimi Image J programı ile analiz edildi.

### **5.8. İstatistiksel Analiz**

RT-PCR miRNA ekspresyon analizi için LightCycler® Nano Software'den alınan sonuçlar Microsoft Excel programına aktarılıp  $2^{-\Delta\Delta ct}$  relatif kuantifikasyon yöntemiyle hesaplandı. Daha sonra GraphPad Prism 7.04 ile one-way ANOVA varyans analizi ile herbir grup bir diğerine göre karşılaştırılıp  $p < 0,05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

ELISA analizinde, spektrofotometreden alınan sonuçlar Microsoft Excel programında, standartlara göre konsantrasyonları lineer regresyon denklemiyle hesaplandı. ELISA ve MTT analizinde, gruplar kontrol grubuna göre oneway ANOVA/Dunnet testi uygulanarak istatistiki olarak değerlendirildi.  $p < 0,05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Migrasyon testinde alınan görüntülerdeki ölçümler Image J programı ile yapıldı.



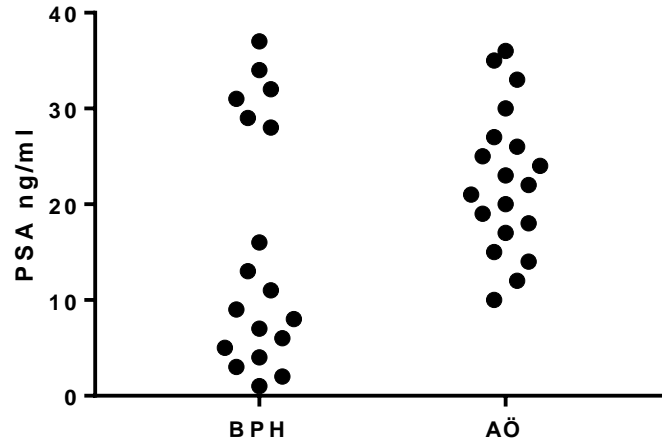
## 6. BULGULAR

BPH ve radikal prostatektomi geçiren hastaların yaş ve PSA düzeyleri dağılımı, karşılaştırılması ile gleason skorlaması aşağıdaki şekildedir (Tablo 6.1)

**Tablo 6.1** Grupların yaş, PSA ve gleason dağılımı

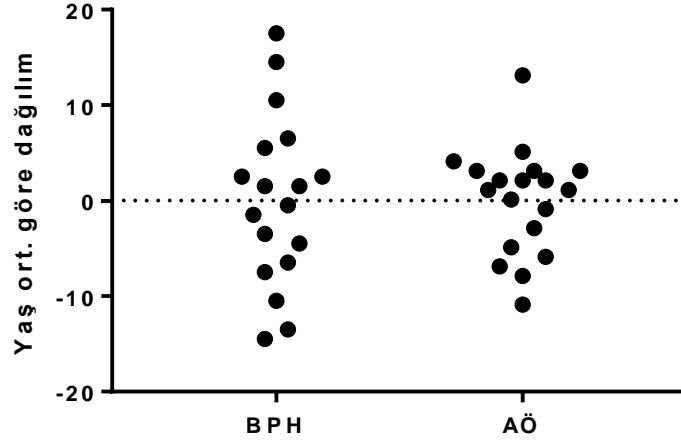
	<b>Benign Prostat Hiperplazisi</b>	<b>Prostat Kanseri</b>
<b>YAŞ</b>		
<b>Ortalama</b>	67,5	62,89
<b>Standart Sapma</b>	8,92	5,557
<b>Standart hata</b>	2,102	1,275
<b>PSA</b>		
<b>Ortalama</b>	8,325	11,57
<b>Standart Sapma</b>	11,04	7,968
<b>Standart hata</b>	2,677	1,828
<b>P değeri</b>	0,0456	
<b>GLEASSON Skoru</b>		
<b>6</b>		5
<b>7</b>		14

BPH grubunun PSA düzeyi daha düşük olmasına rağmen ( $p=0,0456$ ), 1/3'ünde 10 ng/ml nin üzerindedir. Bütün hastalar içinde en yüksek PSA düzeyi 40,88 ng/ml ile yine bir BPH hastasına aittir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1 BPH'li ve PK'li hastaların PSA dağılımı

BPH'li ve PK'li hastaların yaşları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmaktadır ve BPH'lilerde (ort:67,5) daha yüksektir (Şekil 6.2).

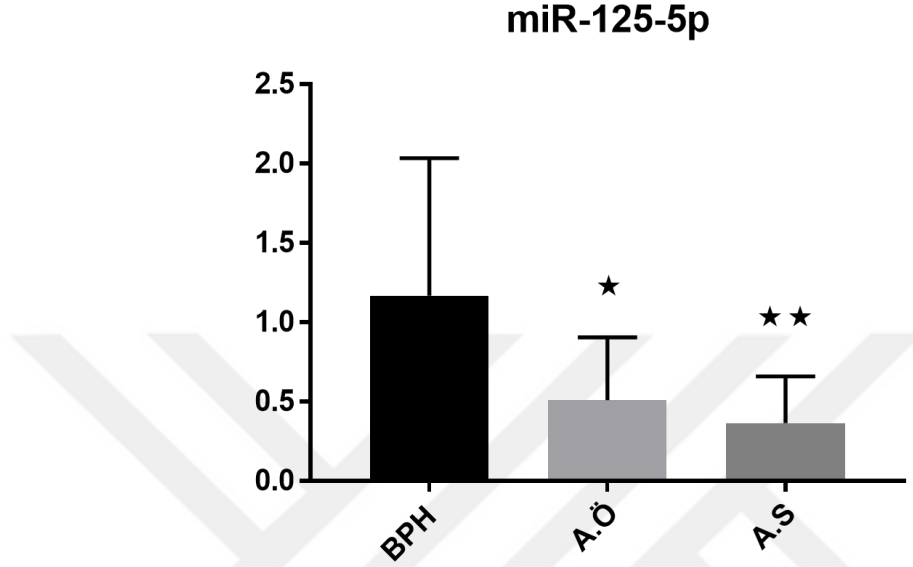


Şekil 6.2 BPH'li ve PK'li hastaların yaşlarının kendi grup ortalamalarına göre dağılımı.

## 6.1. qRT-PCR miRNA Ekspresyon Analizi Sonuçları

Çalışmamızda hasta plazmalarında bir house keeping geni ve 9 adet hedef geni olmak üzere on adet miRNA'nın gen ekspresyon analizi qRT-PCR ile yapıldı. Çalışmamızda BPH grubu kontrol grubu olarak değerlendirildi. Hedef miRNA'lardan hsa-miR-361-3p, hsa-miR-1285-5p ve hsa-miR-203a-3p ekspresyon düzeyleri belirlenemedi. Diğer miRNA'ların sonuçları aşağıda verildi.  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edildi.

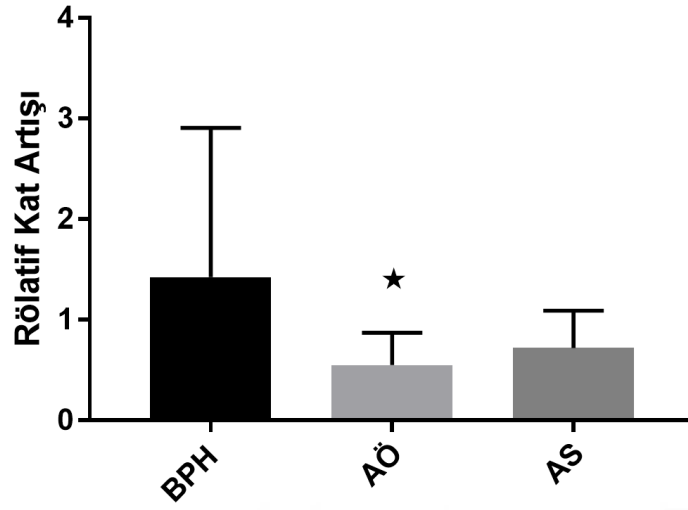
Çalışmamızda miR-125b-5p ekspresyon düzeylerinde, AÖ grupta ( $p=0,0426$ ) ve AS grupta ( $p=0,0042$ ) kontrol (BPH) grubuna göre anlamlı düzeyde azalma bulundu. Fakat AÖ grup ile AS grup arasında fark bulunamadı ( $p>0,9999$ ; Şekil 6.1.1).



**Şekil 6.1.1** BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-125b-5p ekspresyon düzeylerinin analizi. BPH grubu kontrol grubu olarak değerlendirildi.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre miR-145-5p ekspresyon düzeylerinde AÖ grupta ( $p=0,0300$ ) kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalma bulundu. Fakat AS grupta kontrol grubu arasında ( $p=0,6027$ ) ve AÖ grup ile AS grup arasında ( $p=0,4906$ ) miR-145-5p ekspresyon düzeylerinde anlamlı fark bulunamadı (Şekil 6.1.2).

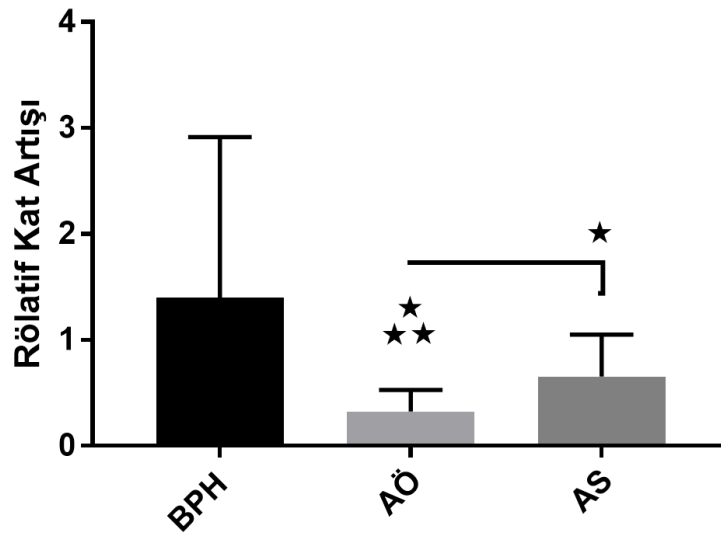
### miR 145-5p



Şekil 6.1.2 BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-145-5p ekspresyon düzeylerinin analizi.

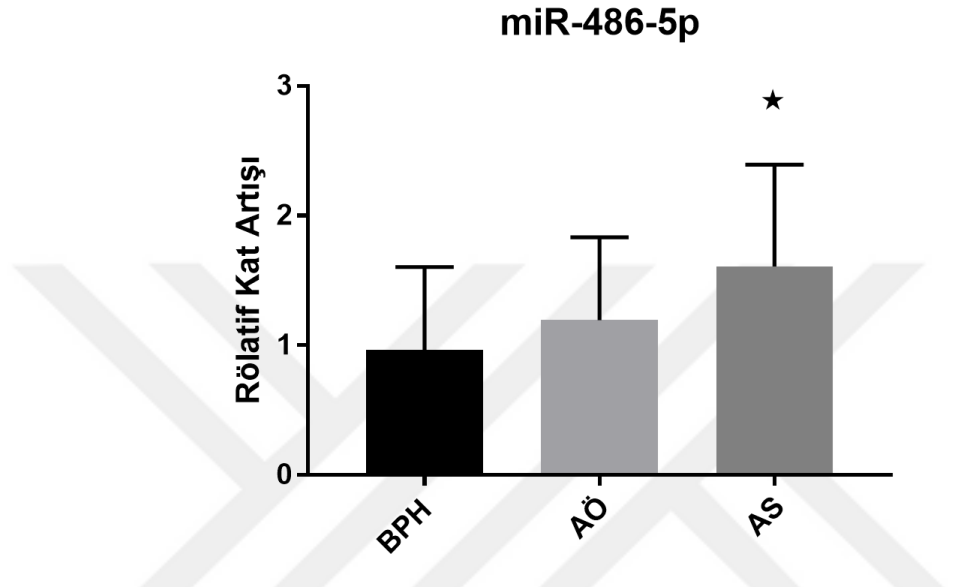
Çalışmamızda miR-221-3p ekspresyon düzeylerinde, AÖ grupta kontrol grubuna göre ( $p=0,0004$ ) ve AS grubuna göre ( $p=0,0236$ ) anlamlı düzeyde azalma bulundu. Kontrol grubu ile AS grup arasında ise anlamlı fark olmadığı gözlemlendi ( $p=0,5854$ ; Şekil 6.1.3).

### miR 221-3p



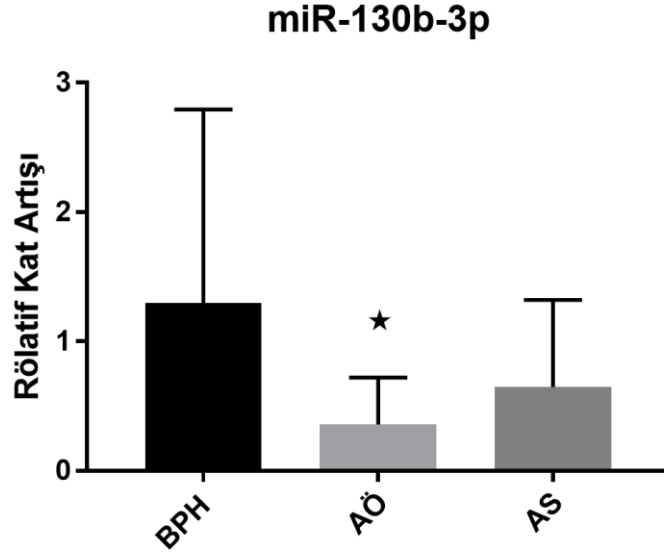
Şekil 6.1.3 BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-221-3p ekspresyon düzeylerinin analizi.

Çalışmamızda miR-486-5p ekspresyon düzeylerinde AS grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış olduğu görüldü ( $p= 0,0351$ ). AÖ grupla kontrol grubu arasında ( $p=0,6226$ ) ve AÖ grupla AS grup arasında ( $p=0,1936$ ) miR-486-5p ekspresyon düzeylerinde anlamlı fark bulunmadı (Şekil 6.1.4)



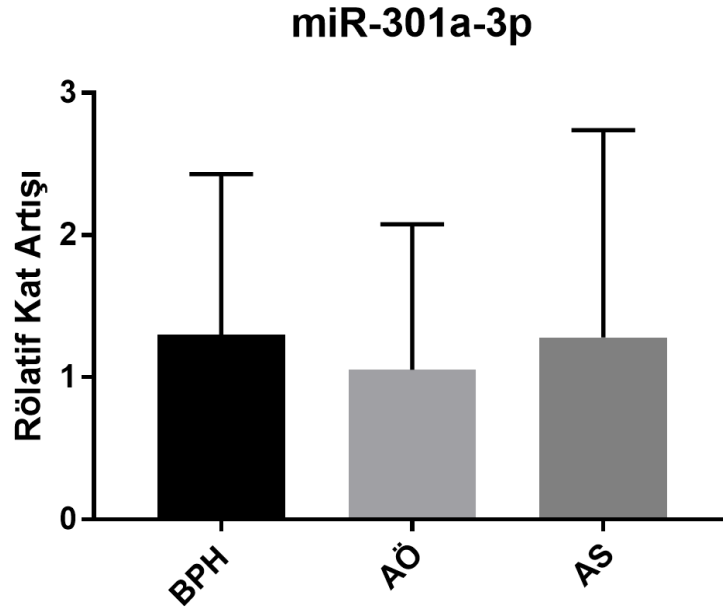
Şekil 6.1.4 BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-486-5p ekspresyon düzeylerinin analizi.

Çalışmamızda miR-130b-3p ekspresyon düzeyleri AÖ grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p= 0,0225$ ). Fakat AS grupla kontrol grubu arasında ( $p= 0,6963$ ) ve AS grupla AÖ ( $p= 0,4118$ ) grup arasında anlamlı fark görülmedi (Şekil 6.1.5)



Şekil 6.1.5 BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-130b-3p ekspresyon düzeylerinin analizi.

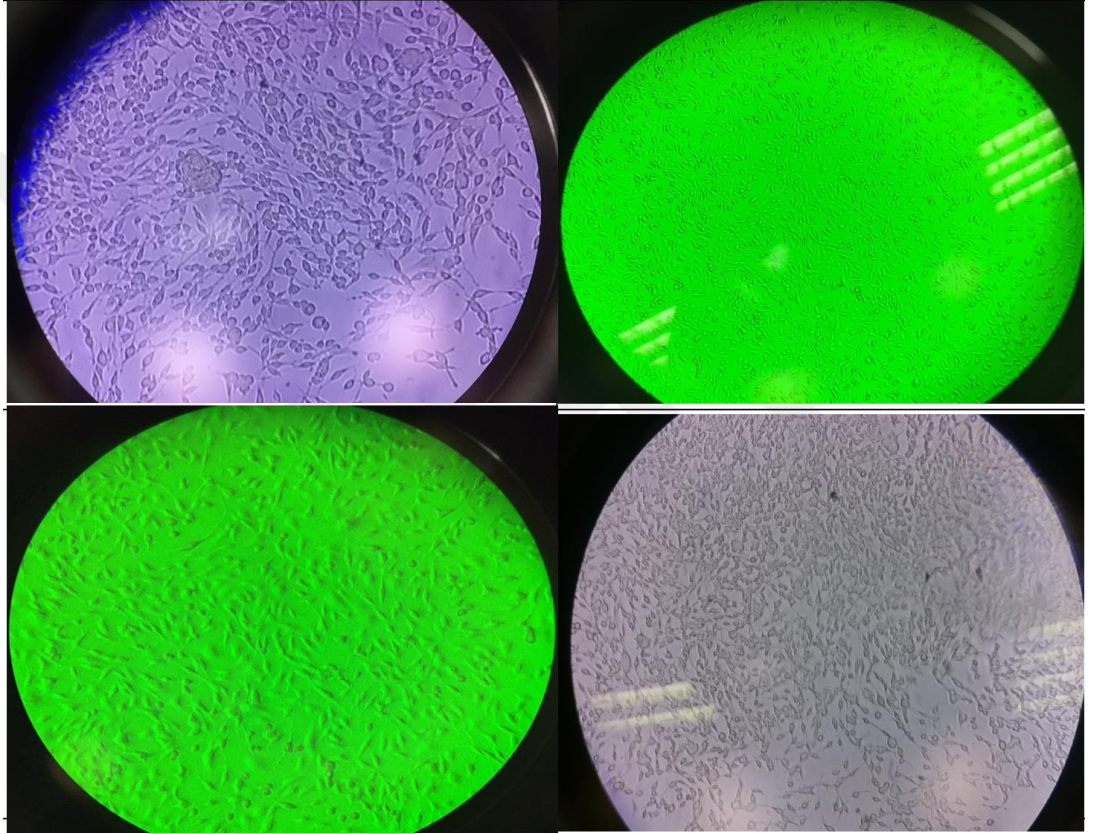
Elde ettiğimiz verilere göre miR-301a-3p'nin ekspresyon analizinde, gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi ( $p > 0,9999$ ; Şekil 6.1.6).



Şekil 6.1.6 BPH, AÖ ve AS grubu hastaların plazmalarında miR-301a-3p ekspresyon düzeylerinin analizi.

## 6.2 Hücre Kültürü Sonuçları

Hücre kültürü aşaması DU 145 insan prostat kanseri hücre dizilerinde çalışıldı. Laboratuvarımızda çoğalttığımız hücrelerin görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 6.2.1). qRT-PCR aşamasında ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılık bulduğumuz miRNA'ların üçünün mimikleri kullanıldı; hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-221-3p. Üç adet mimik ve kontrol olmak üzere 4 grupta çalışıldı.

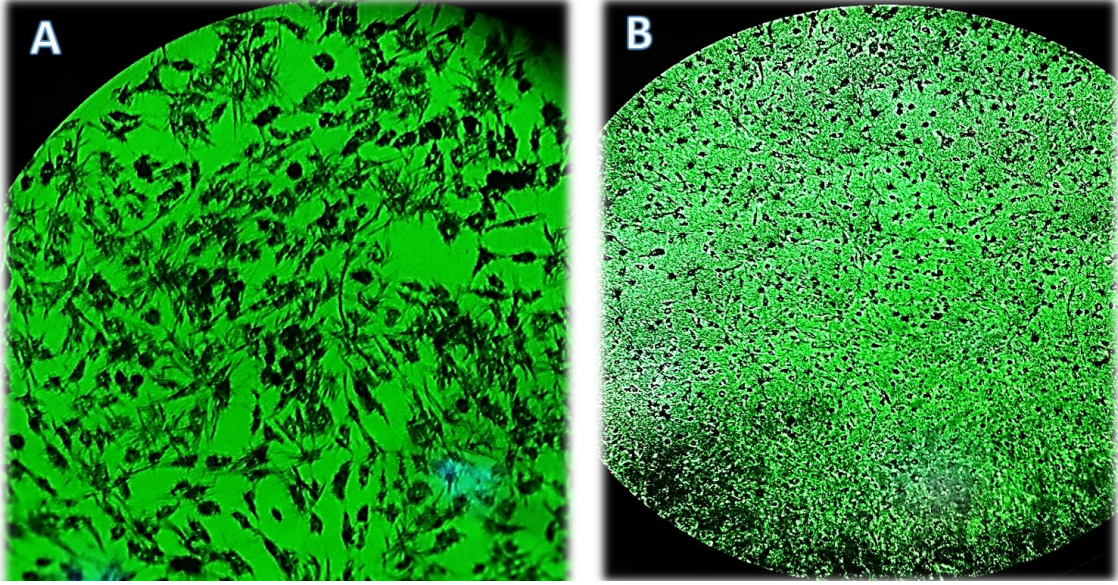


Şekil 6.2.1. Mikroskopta DU 145 hücrelerinin genel görüntüsü (10X).

### 6.2.1. MTT sonuçları

MTT analizi sırasında hücrelerden görüntülediğimiz formazan kristalleri şekil 6.2.1.1' de gösterilmiştir.





**Şekil 6.2.1.1** Hücre ortamına MTT eklenmesi sonucu hücrelerde oluşan formazan kristallerinin genel görüntüsü (A: 20X büyütme, B:10X büyütme)

MTT analizi sonrası elde edilen hücre canlılık oranları kontrol grubuna göre karşılaştırılarak değerlendirildi. Ortalama ölçümleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve canlılık oranları tablo 6.2.1.1’de verildi.

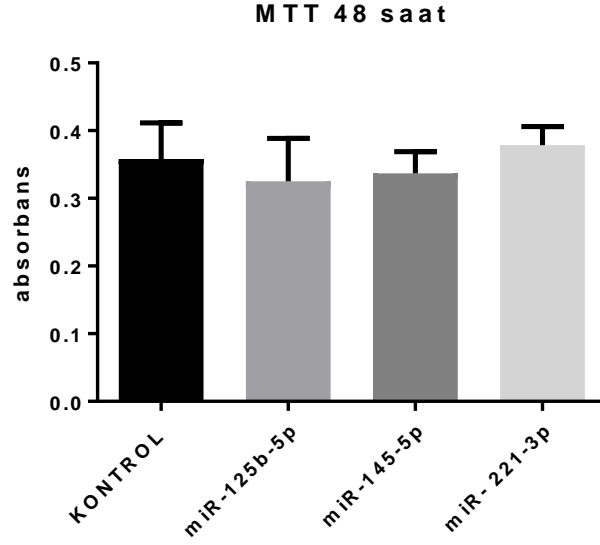
**Formül:** Her bir kuyucuktaki ilaç verilen hücre absorbansı x 100 / Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı

**Tablo 6.2.1.1** Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde MTT yöntemi ile 48. ve 72. saatte elde edilen canlılık oranları.

Gruplar	CANLILIK ORANLARI	
	48 Saat (%)	72 Saat (%)
<b>miR-125b-5p</b>	90%	63%
<b>miR-145-5p</b>	94%	72%
<b>miR-221-3p</b>	99%	82%
<b>Kontrol</b>	100%	100%

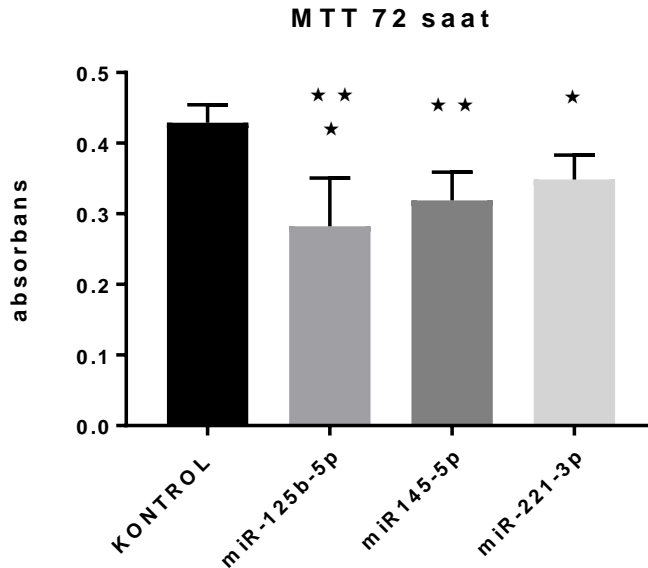
miR-125b-5p (p=0,4747), miR-145-5p (p=0,7872) ve miR221-3p'nin (p=0,8415) DU 145 hücrelerine transfeksiyonundan 48 saat sonra, kontrol grubuna göre hücre canlılığını biraz düşürmelerine rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturamadıkları gözlemlendi (Şekil 6.2.1.2).





**Şekil 6.2.1.2** Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde 48. saatte MTT yöntemi ile elde edilen absorbans değerleri.

MTT yöntemiyle yaptığımız analizde, miR-125b-5p (% 63 canlılık oranı;  $p= 0,0001$ ), miR145-5p (% 72 canlılık oranı;  $p= 0,0051$ ) ve miR-221-3p'nin (% 82 canlılık oranı;  $p= 0,0276$ ) transfeksiyon işleminden 72 saat sonra kontrol grubuna göre DU 145 hücrelerinde anlamlı düzeyde hücre canlılığını azalttığı bulundu (Şekil 6.2.1.3).

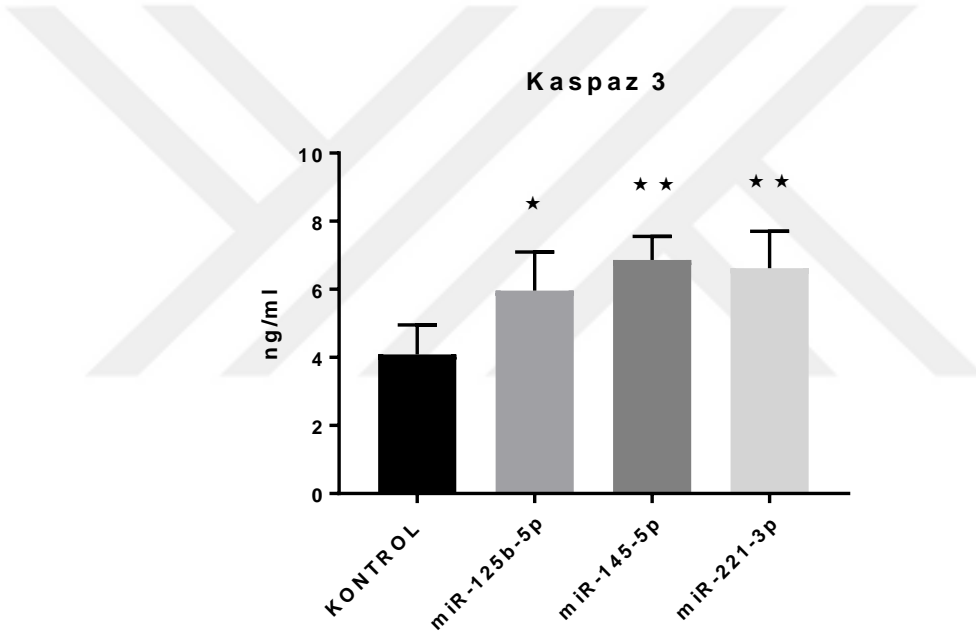


**Şekil 6.2.1.3** Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde 72. saatte MTT yöntemi ile elde edilen absorbans değerleri.

### 6.2.2. ELISA sonuçları

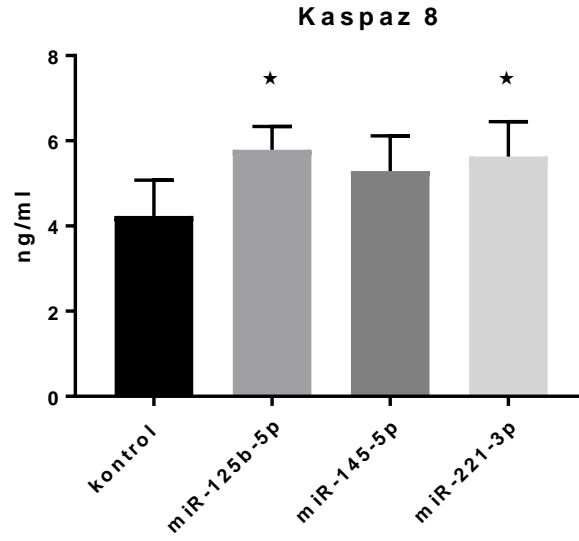
DU 145 hücrelerinde, kaspaz 3-8-9 ile MMP 2 ve 9 düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Spektrofotometrede ölçülen absorbans değerlerinin konsantrasyonları, standartlara göre Excel'de hesaplandı. Grupların konsantrasyon değerleri One way ANOVA analizi ile kontrol grubu konsantrasyonlarına göre değerlendirildi.  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edildi.

ELISA ile DU 145 hücre lizatlarında yaptığımız ölçümde, mimiklerimiz miR-125b-5p ( $p=0,0370$ ), miR-145-5p ( $p=0,0018$ ) ve miR-221-3p'nin ( $p=0,0038$ ) kontrol grubuna göre kaspaz 3 düzeylerinde anlamlı düzeyde artışa neden oldukları gözlemlendi (Şekil 6.2.2.1).



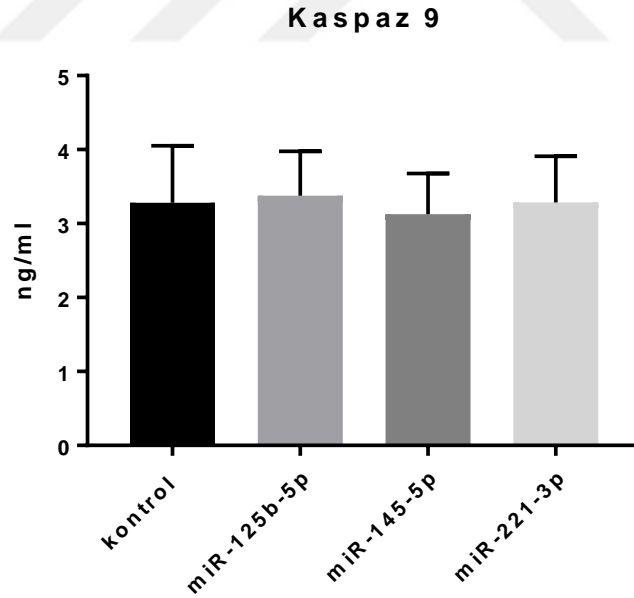
Şekil 6.2.2.1 Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde kaspaz 3 düzeylerinin değerlendirilmesi.

Çalışmamızda DU 145 hücre lizatlarında miR-125b-5p ( $p=0,0152$ ) ve miR-221-3p'in ( $p=0,0294$ ) kontrol grubuna göre kaspaz 8 seviyesini anlamlı düzeyde yükselttikleri bulundu. Buna karşın miR-145-5p ( $p=0,1118$ )'nin kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşturmadığı belirlendi (Şekil 6.2.2.2).



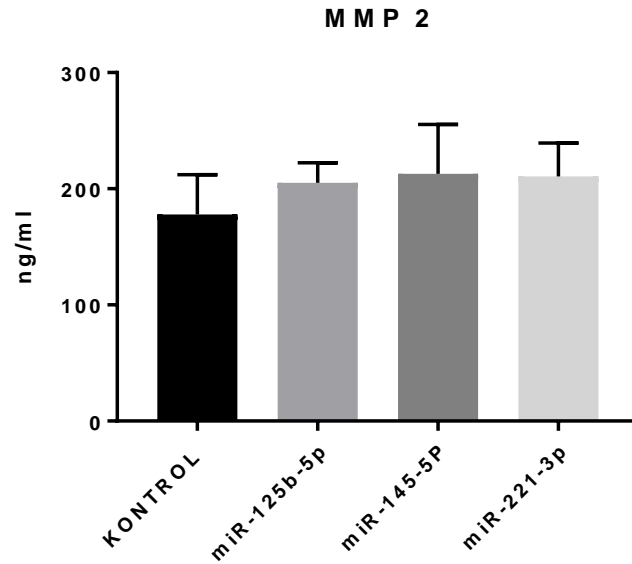
**Şekil 6.2.2.2** Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde kaspaz 8 düzeylerinin değerlendirilmesi.

Çalışmamızda, miR-125b-5p ( $p= 0,9913$ ), miR145-5p ( $p= 0,9566$ ) ve miR-221-3p ( $p> 0,9999$ )'nin DU 145 hücreleri kaspaz 9 düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşturamadıkları bulundu ( Şekil 6.2.2.3).



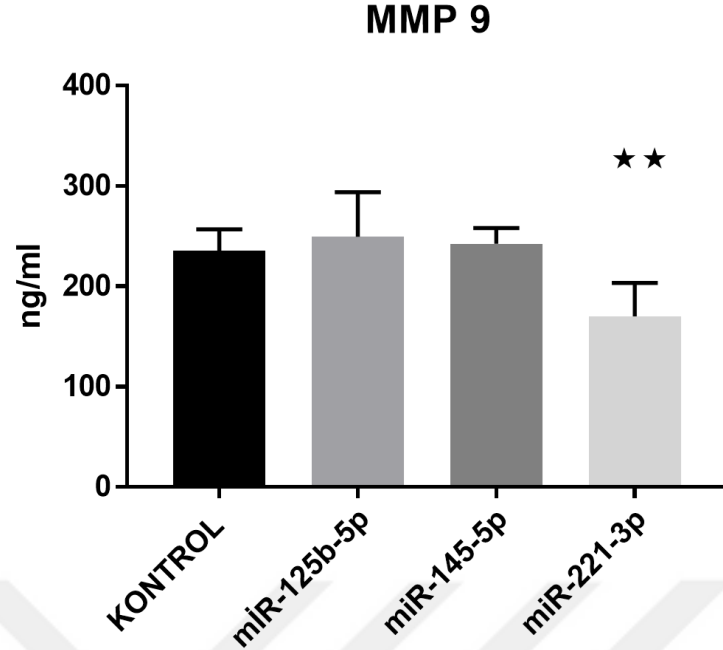
**Şekil 6.2.2.3** Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde kaspaz 9 düzeylerinin değerlendirilmesi

ELISA yöntemiyle DU 145 hücre lizatlarında ölçtüğümüz MMP 2 düzeylerinde, miR-125b-5p ( $p= 0,3412$ ), miR145-5p ( $p= 0,1715$ ) ve miR-221-3p ( $p= 0,2143$ )'nin kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşturmadıkları gözlemlendi (Şekil 6.2.2.4).



Şekil 6.2.2.4 Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde MMP 2 düzeylerinin değerlendirilmesi

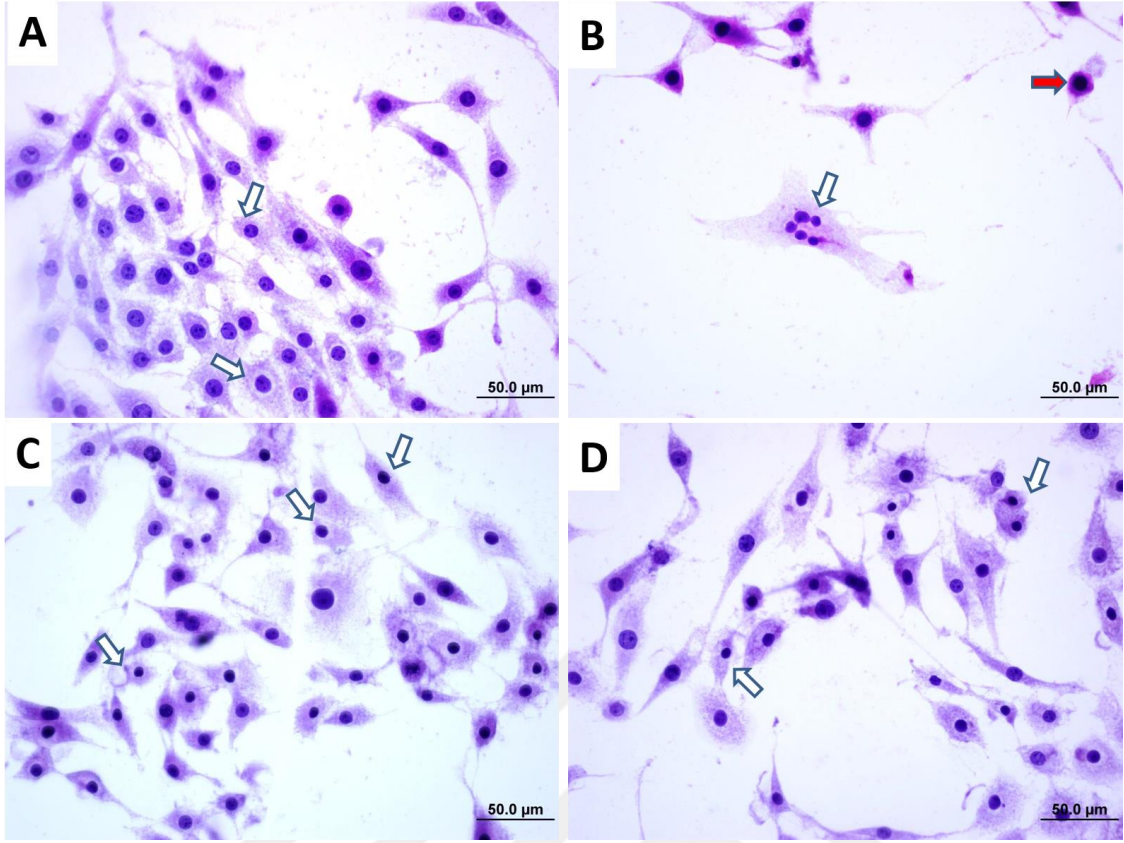
DU 145 hücrelerinde ELISA yöntemi ile yaptığımız analizde, miR-125b-5p ( $p=0,7716$ ) ve miR145-5p ( $p=0,961$ ) ile transfekte edilen gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında MMP 9 düzeylerinde anlamlı farklılık gözlenmezken, miR-221-3p'nin ( $p=0,0040$ ) kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.2.2.5)



Şekil 6.2.2.5 Agonistler ile transfekte edilen DU 145 hücrelerinde MMP 2 düzeylerinin değerlendirilmesi

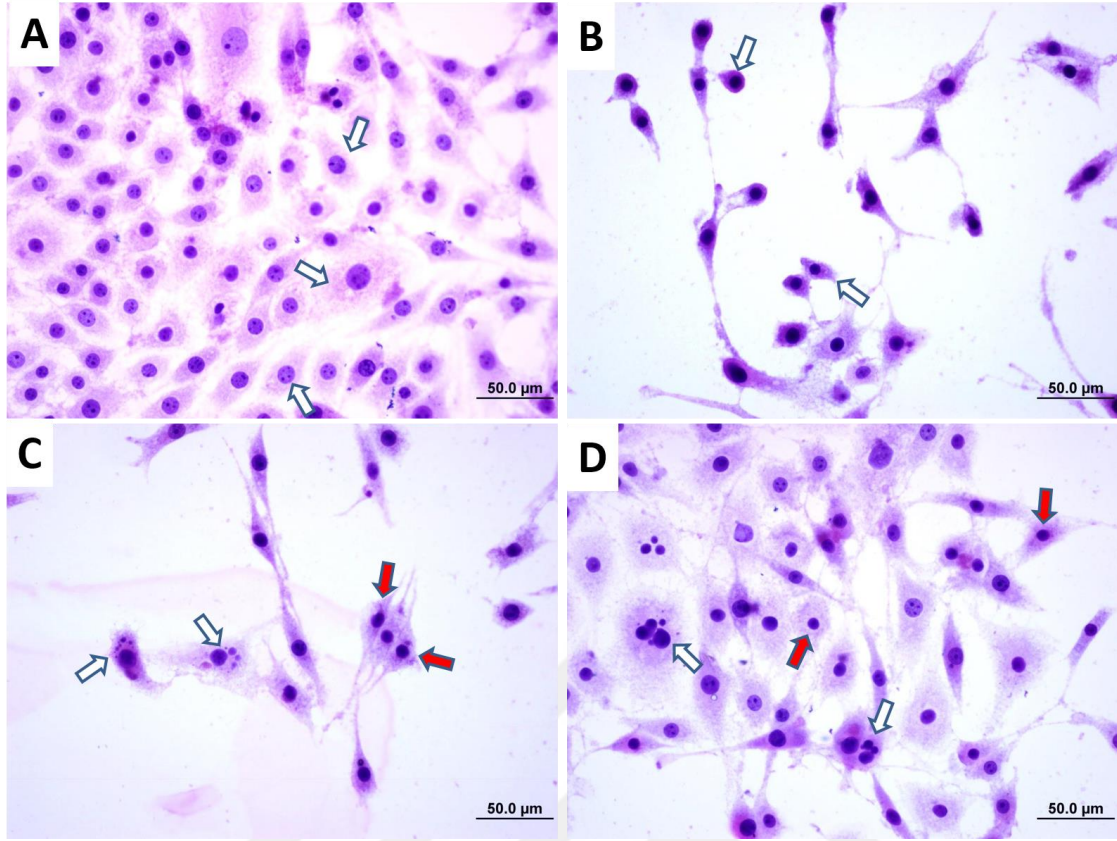
### 6.2.3. H-E ile hücrelerin morfolojik değerlendirilmesi

Çalışmamızda Transfekte hücrelerin 48. Saatteki H-E boyanmaları Şekil 6.2.3.1'de gösterildi.



**Şekil 6.2.3.1** Transfeksiyondan 48 saat sonra DU 145 hücrelerinin H-E boyama görüntüleri. A-) Ökromatik çekirdek ve geniş sitoplazmaya sahip normal DU145 hücreleri görülmektedir (oklar). B-) miR-125b-5p transfekte edilmiş DU145 hücrelerinde çekirdek fragmentasyonu (Beyaz ok), yoğunlaşmış çekirdek ve eozinofilik sitoplazmaya sahip hücre (kırmızı ok) görülmektedir. C-) miR -145-5p transfekte edilmiş DU145 hücrelerinde çok sayıda yoğunlaşmış ve boyut olarak küçülmüş çekirdek içeren hücreler görüntülenmektedir (Beyaz oklar). D-) miR-221-3p transfekte edilmiş DU145 hücrelerinde çok sayıda yoğunlaşmış ve boyut olarak küçülmüş çekirdek içeren hücreler görüntülenmektedir (Beyaz oklar).

Çalışmamızda transfekte hücrelerin 72. saatteki H-E boyama görüntüleri Şekil 6.2.3.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 6.2.3.2** Transfeksiyondan 72 saat sonra DU 145 hücrelerinin H-E boyama görüntüleri. A-) Ökromatik çekirdek ve geniş sitoplazmalara sahip normal DU145 hücreleri (oklar). B-) miR -125b-5p tranfekte edilmiş DU145 hücrelerinde, eozinofilik sitoplazmalı yoğunlaşmış çekirdekli hücreler gösterilmiştir (beyaz oklar) C-) miR-145-5p tansfekte edilmiş DU145 hücrelerinde, çekirdek fragmentasyonları (beyaz oklar) ve yoğunlaşmış çekirdekli hücreler (kırmızı oklar) gösterilmiştir. D-) miR-221-3p transfekte edilmiş DU145 hücrelerinde çekirdek fragmentasyonları ve yoğunlaşmış çekirdekli hücreler (kırmızı oklar) gösterilmiştir.

#### 6.2.4. Migrasyon testi sonuçları

DU 145 hücrelerinin 6 kuyucuklu plate tabanını tamamen doldurmalarının ardından transfeksiyon işlemi yapıldı. Daha sonra mimikler ve kontrol gruplarının kuyucuk tabanına yapışık hücre tabakası, 100 µl pipet ucuyla çizilerek hasarlandı ve her kuyucukta neredeyse aynı boyutlarda boş alan açıldı. Çizme işlemini takiben sağlam hücreler boşalan alanı hızla tekrar doldurmaktadırlar. Bu da bize kanser hücrelerinin metastaz ve yayılım hızı hakkında destekleyici bilgi vermektedir.

Test uygulanırken fotoğraflarda Image J programı ile onbir farklı yerden ölçüm alınmış ve ortalamaları ile hesaplama yapılmıştır. Fotoğraflar 10X

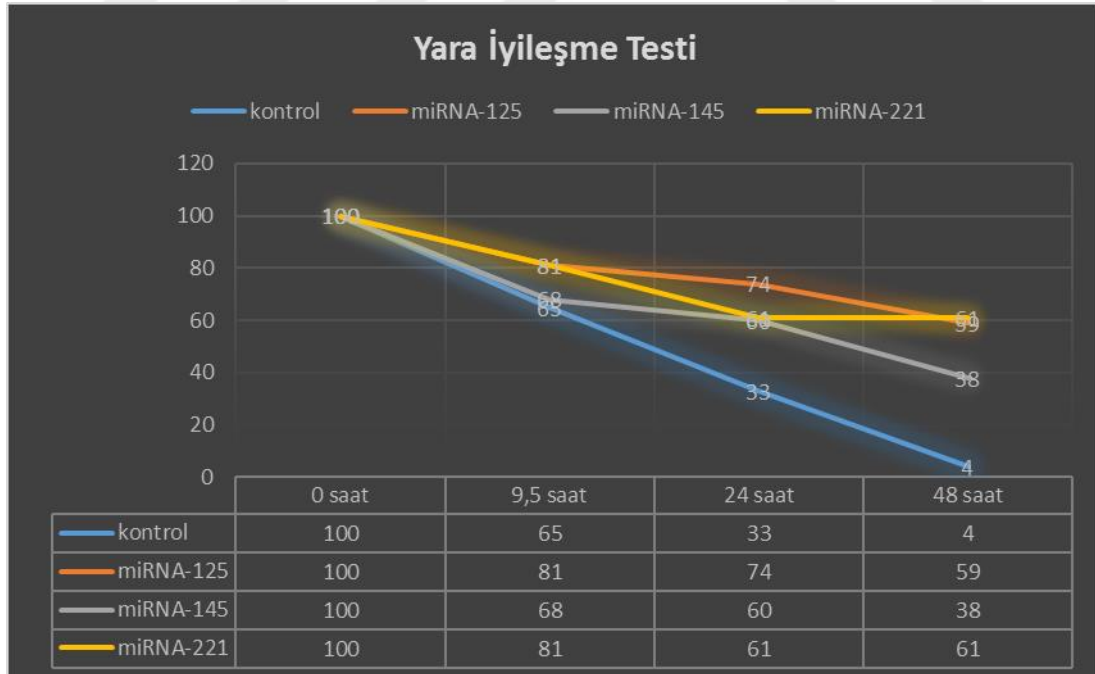


objektif kullanılarak çekildi. Ölçümler 0. – 9,5. – 24. - 48. saatlerde alındı. Elde edilen ölçümler aşağıda verildi (Tablo 6.2.4.1)

**Tablo 6.2.4.1** Migrasyon testi. Ölçümler  $\mu\text{m}$  cinsinden yazılmıştır.

		SAATLER			
		0	9,5	24	48
standart sapmaları	Gruplar				
	kontrol	805,4	524,7	265,7	29,5
	miRNA-125	778	632,6	576,2	455,5
	miRNA-145	810,1	547	482,5	304,2
	miRNA-221	791,9	637,9	483,4	483,4
	kontrol	45,4	35,1	38,1	0
	miRNA-125	42,1	33,2	144,2	82,9
	miRNA-145	52,4	51,4	62,4	90,2
	miRNA-221	30,3	38,9	92,4	92,4

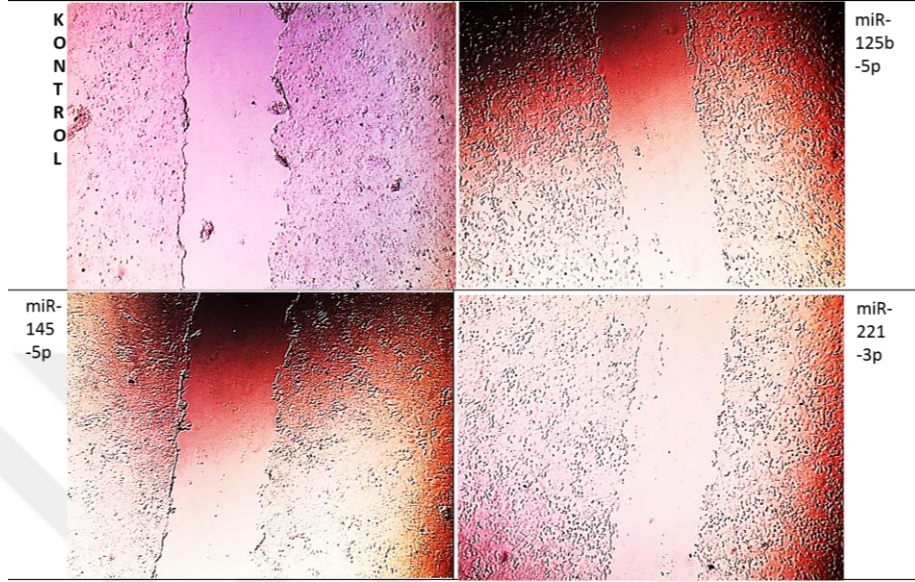
Mimiklerin ve kontrol grubunun kapatabildikleri yara boşluğunun zamana ve birbirilerine göre değişimi yüzdelik olarak aşağıda gösterildi (Şekil 6.2.4.1).



**Şekil 6.2.4.1** Migrasyon testi.

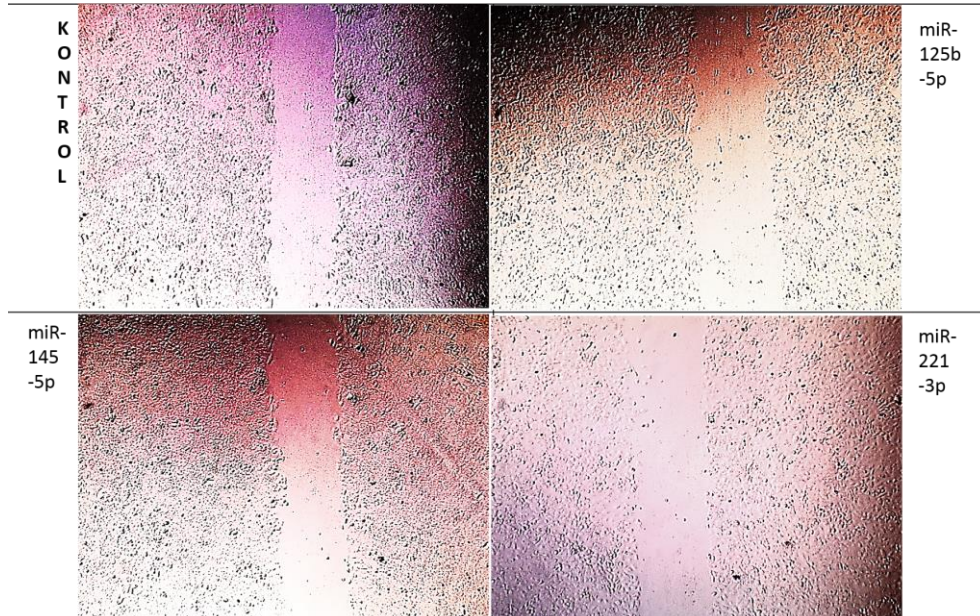


Image J programı ile migrasyon testinin başlangıcında pipet ucu ile çizimden sonra kontrol (805,4  $\mu\text{m}$ ), miR-125b-5p (778  $\mu\text{m}$ ), miR145-5p (810,1  $\mu\text{m}$ ) ve miR-221-3p (791,9  $\mu\text{m}$ ) gruplarının genel görüntüsü Şekil 6.2.4.2 verilmiştir.



Şekil 6.2.4.2 Migrasyon testi başlangıç görüntüleri (10x büyütme).

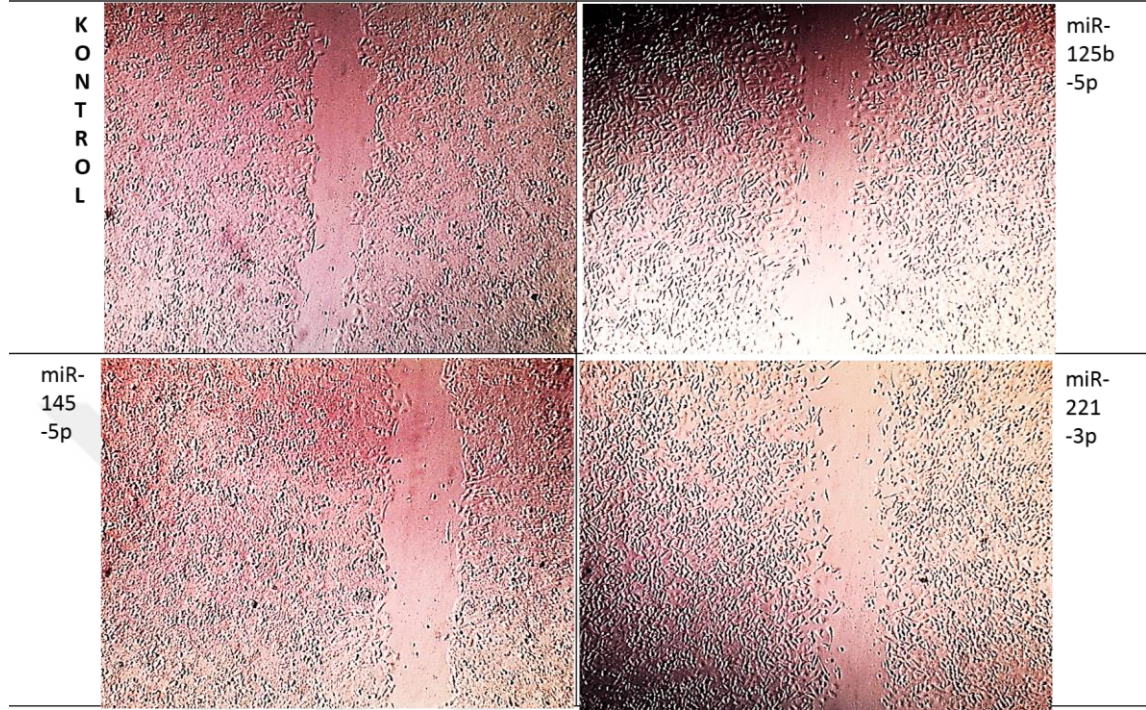
Image J programı ile migrasyon testinin 9  $\frac{1}{2}$ . saatinde kontrol (524,7 $\mu\text{m}$ ) miR-125b-5p (632,6  $\mu\text{m}$ ), miR145-5p (547  $\mu\text{m}$ ) ve miR-221-3p (637,9  $\mu\text{m}$ ) gruplarının genel görüntüsü Şekil 6.2.4.3'te verilmiştir.



Şekil 6.2.4.3 Migrasyon testi 9  $\frac{1}{2}$  .saatteki görüntüleri (10x büyütme).

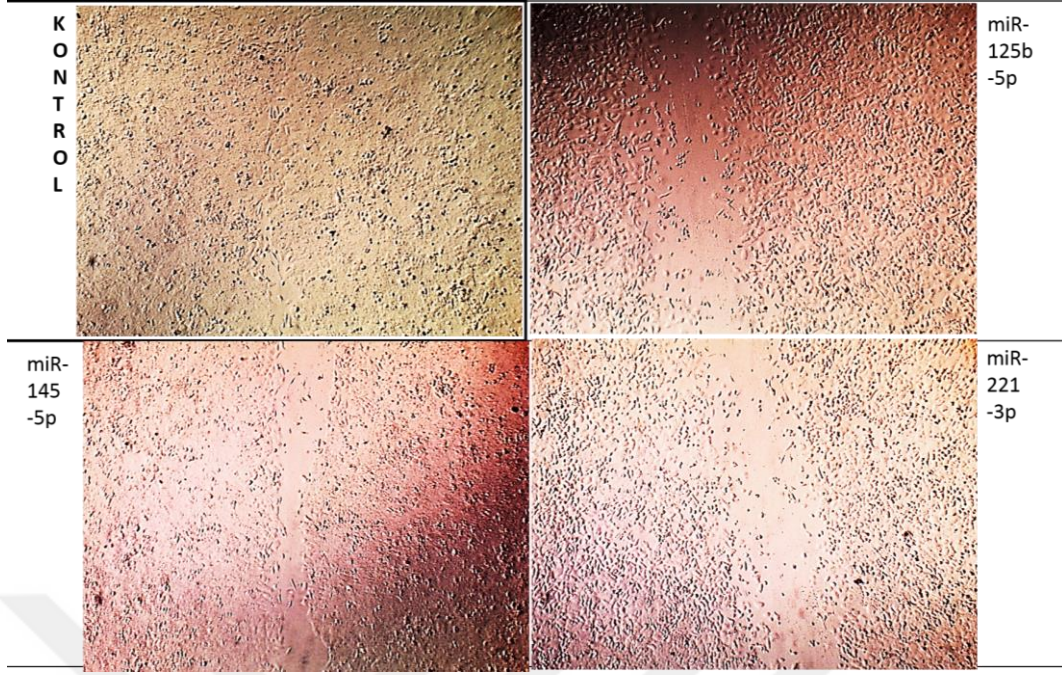


Image J programı ile migrasyon testinin 24. saatinde kontrol (265,7 $\mu$ m) miR-125b-5p (576,2  $\mu$ m), miR145-5p (482,5  $\mu$ m) ve miR-221-3p (483,4  $\mu$ m) gruplarının genel görüntüsü Şekil 6.2.4.4'te verilmiştir.



Şekil 6.2.4.4 Migrasyon testi 24. saat görüntüleri (10x büyütme)

Image J programı ile migrasyon testinin 48. saatinde kontrol (29,5  $\mu$ m) miR-125b-5p (455,5  $\mu$ m), miR145-5p (304,2  $\mu$ m) ve miR-221-3p (483,4  $\mu$ m) gruplarının genel görüntüsü Şekil 6.2.4.5'te verilmiştir.



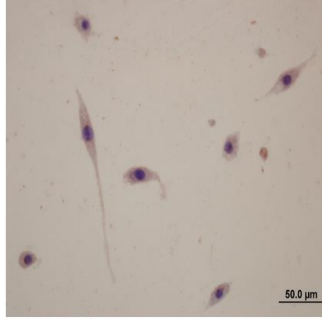
Şekil 6.2.4.5 Migrasyon testi 48. saatteki görüntüleri (10x büyütme).

### **6.2.5 Bax-Bcl immunositokimya boyama ile apoptozun değerlendirilmesi**

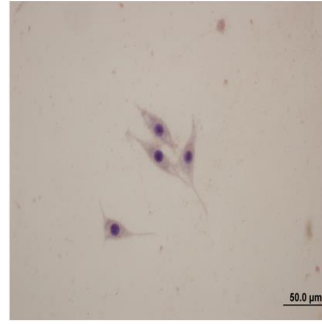
Hücre ölümlerinin apoptoz ile meydana geldiğini desteklemek amacıyla Bax/Bcl-2 immünohistokimyasal boyama yapıldı. Bax ve Bcl-2 mitokondride bulunan sırasıyla pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerdir. Apoptozu regüle eden Bcl-2 gen ailesi proteinleri, çok yaygın olarak apoptozun belirteci olarak kullanılırlar. Fazla Bax ifadesi apoptozu gösterirken, Bcl-2 nin fazla ifadelenmesi ise apoptozun baskılandığı ve yaşam sinyallerinin fazla olduğu anlamına gelmektedir. Hücreler primer antikor ile boyandıklarında kahve kırmızı renk alırken boyanmadıkları zaman bu rengi almamaktadır. Bu sayede hücrelerde baktığımız genin ifadelenip ifadelenmediğini anlamaktayız.

Çalışmamızda, proapoptotik belirteç olan Bax ile boyama sonucu kontrol grubu hücreleri boyanmazken miR-125b-5p transfekte hücrelerin proapoptotik olarak kahve-kırmızı renkte boyandığı görülmektedir (Şekil 6.2.5.1).

KONTROL

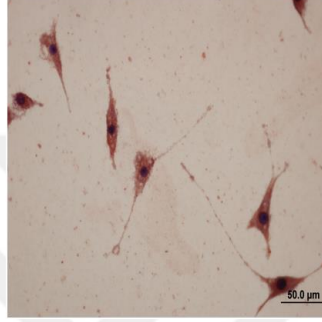


KONTROL

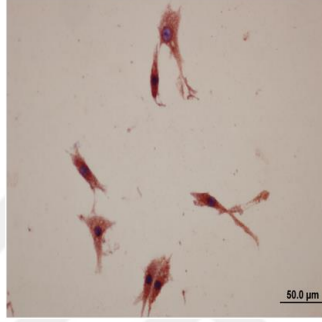


**BAX**

MİR 125



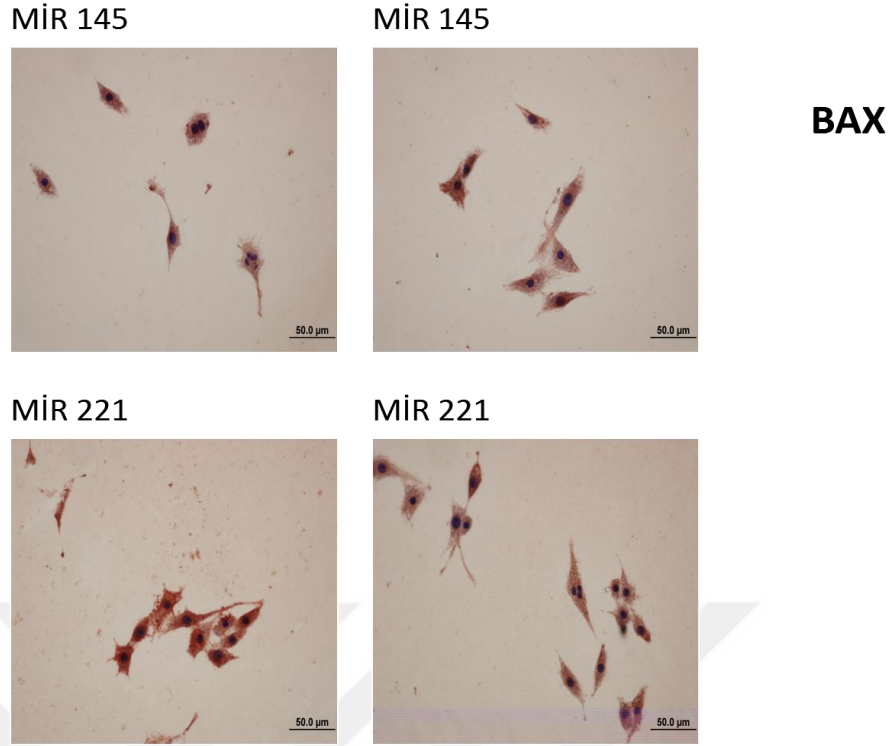
MİR 125



**Şekil 6.2.5.1** miR-125b-5p transfeksiyonu yapılmış DU 145 hücrelerinde Bax antikoru ile boyama görüntüleri (40X büyütme).

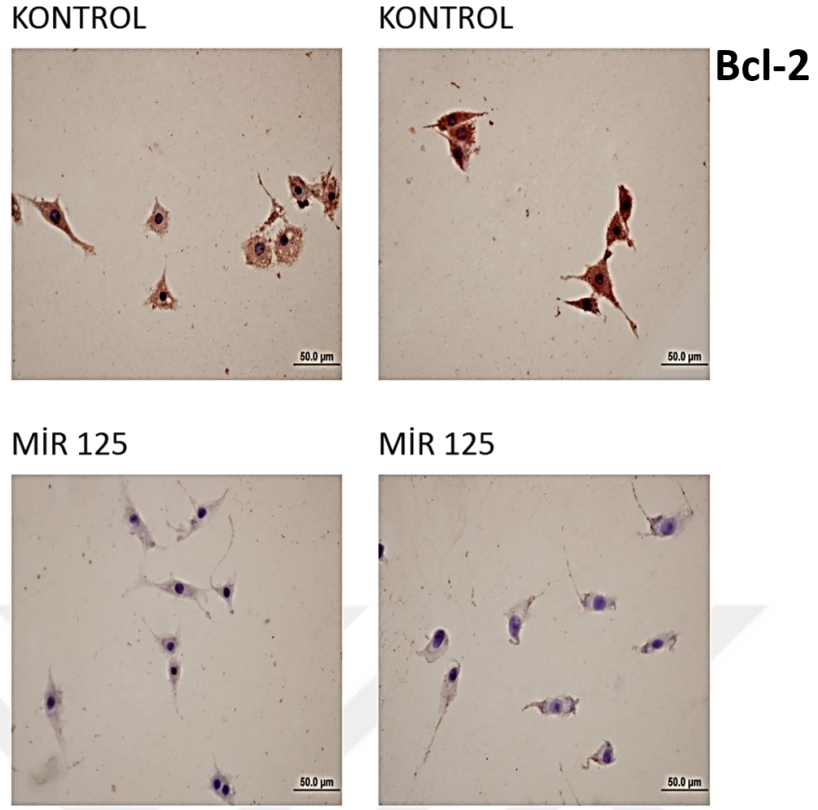
Bax immünohistokimya boyama ile kontrol grubu boyanmazken miR-145-5p ile miR-221-3p transfekte hücrelerin proapoptotik olarak kahve-kırmızı renkte boyandığı görülmektedir (Şekil 6.2.5.2).





**Şekil 6.2.5.2** miR-145-5p ve miR-221-3p transfekte DU 145 hücrelerinin Bax antikoruna ile boyama görüntüleri (40X büyütme).

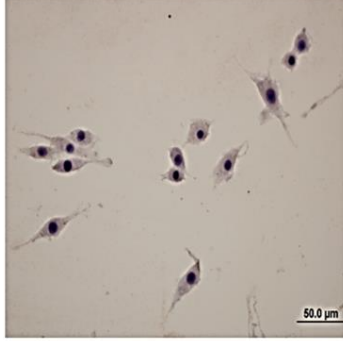
Apoptoz inhibitörü Bcl-2 gen ifadenmesini immünohistokimya boyama ile incelediğimizde, miR-125b-5p transfekte hücrelerin boyayı almadığını, kontrol grubu hücrelerin ise antiapoptotik Bcl-2 antikoruna uygulaması ile kahve-kırmızı renkte boyandığı görülmektedir (Şekil 6.2.5.3).



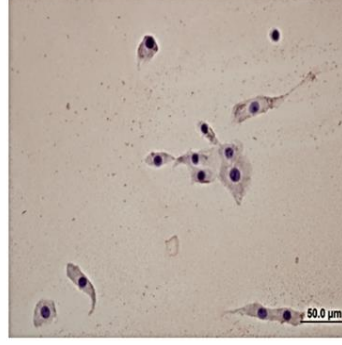
**Şekil 6.2.5.3** Normal ve mir-125b-5p transfekte DU 145 hücrelerinin Bcl-2 antikoruna boyanma görüntüleri (40X büyütme).

Diğer mimiklerimiz miR-145-5p ve miR-221-3p transfekte edilmiş DU 145 hücrelerinin antiapoptotik Bcl-2 antikoruna uygulanması ile boyanmadığı görülmektedir (Şekil 6.2.5.4).

MİR 145

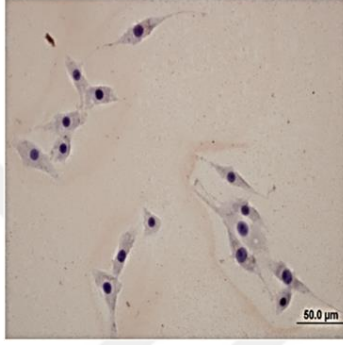


MİR 145

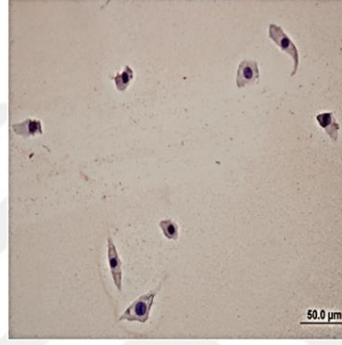


**Bcl-2**

MİR 221



MİR 221



**Şekil 6.2.5.4** miR-145-5p ve miR-221-3p transfekte DU 145 hücrelerinin Bcl-2 antikoruna ile boyama görüntüleri (40x büyütme).

## 7. TARTIŞMA

PK erkeklerde kanserlerden ölümün en sık ikinci nedenidir (Siegel vd., 2019). Tanı geciktikçe tedavi olasılığı azalmakta ve yeniden tekrarlama sıklığı artmaktadır. Tanıda kullanılan PSA ölçümünün özgüllüğü düşüktür ve sıklıkla yanlış sonuç vermektedir. Bu sebepten dolayı PK'nin tanısı için yeni belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Vücut sıvılarında stabil olarak bulunan ve çeşitli hastalıklarda düzeyleri değişen miRNA'lar uygun hedef olarak öne çıkmaktadırlar (Lu vd., 2005).

miRNA ile ilgili araştırmaların çok büyük bir kısmında doku ve hücre kültürü tekniklerinin kullanıldığı görülmektedir. Kandan miRNA düzeyi ölçümü ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Doku çalışmaları zaten hastalık tanısı konmuş ve çoğunlukla radikal prostatektomi ameliyatı geçirmiş hastalar üzerinde yapılmaktadır. Doku çalışmalarından elde edilen verilerin tekrar kan örneklerinde çalışılarak doğrulanmasına ihtiyaç vardır. Sayısı iki binin üzerinde olan miRNA'ların hangilerinin PK oluşumu ile ilgili olduğunun tespit edilebilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. PK'nin teşhisinde, kandaki miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinin ve bunların bir panel halinde düzenlenmesinin gelecekte yararlı olabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda PK hastaların plazmalarında ölçtüğümüz miRNA'lardan miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-221-3p ve miR-130b-3p'nin ekspresyon düzeylerinde kontrol grubu olarak kabul ettiğimiz BPH grubuna göre anlamlı farklılık gözlenirken miR-486-5p ve miR-301a-3p'nin ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılık gözlenmedi. miR-486-5p ekspresyon düzeylerinin ise AS grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü. Çalışmamızda miR-361-3p, miR-1285-5p ve miR-203a-3p plazmada saptanamamıştır. Bunun nedeninin bu miRNA'ların hastalarımızın plazmasında amplifiye olacak düzeyde bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

miR-125b-5p ekspresyon düzeyleri, hem AÖ ( $p=0,0426$ ) hemde AS ( $p=0,0042$ ) grupta BPH grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulundu. Bizim



sonucumuza benzer olarak Ozen ve ark yaptıkları çalışmada, mikroarray ve RT-PCR yöntemi ile mir125b, mir-145, let-7c ekspresyon düzeylerini PK dokularında düşük bulmuşlardır. Ayrıca miR-125b ekspresyon düzeyindeki bu azalmanın, aralarında PK oluşmasında ve ilerlemesinde rol alan genlerin de bulunduğu yirmi altı genin ekspresyonunu arttırdığını belirtmişlerdir (M. Ozen, Creighton, Ozdemir, & Ittmann, 2008). Çalışmayı planlarken AÖ grubu kanserli hastaların plazmalarında oluşabilecek miRNA değişimlerinin, AS grupta kontrol grubu düzeyine döneceğini düşünmüştük. Ancak, beklentimizin aksine AS grupta miR-125b-5p düzeyinde daha fazla düşüş görülmüştür. Kim ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, miR-125a/b'nin diffüz büyük B hücreli lenfomada yüksek düzeyde bulunduğunu ve NF-κB yolağını aktive ettiklerini belirtmişlerdir (Kim vd., 2012). Ayrıca, servikal kanser (Sun vd., 2019) ve akciğer kanserinde (X. Wang vd., 2015) miR-125b'nin düzeyleri yüksek bulunmasına rağmen, hepatosellüler karsinom (Tsang vd., 2014) ve Ewing sarkomda (J. Li, You, & Jing, 2014) düşük bulunmuştur.

miRNA çalışmalarının en büyük dezavantajı miR-125b gibi tek bir miRNA'nın farklı sistemlerde karşıt fonksiyonlara sahip olma kabiliyetidir. Bu özellik miR-125b gibi bir miRNA'nın doku/ortama göre hem onkojenik hem de tümör baskılayıcı kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir. Bu tutarsızlık, p53 gibi miR-125b'nin hedefleriyle kısmen açıklanabilmektedir. Bazı kanser dokularında, miR-125b'nin aşırı ekspresyonu, apoptozu bloke eden p53 kaybına neden olmaktadır. Başka dokularda, bir ihtimal p53 mutasyona uğramakta ve miR-125b kaybı, meme kanserinde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aile üyeleri ERBB2 / 3 gibi onkojenik hedeflerin ekspresyonuna neden olmaktadır (Banzhaf-Strathmann & Edbauer, 2014). MiR-125a ve miR-125b'nin hücre farklılaşmasını, proliferasyonunu ve apoptozu hücre tipine spesifik bir şekilde düzenlemektedir. Bunların düzeylerindeki farklılıkların modüle ettikleri, daha tam olarak bilemediğimiz hücre yolları üzerinden otoimmün hastalıklar ve kansere sebep oldukları düşünülmektedir (J. K. Wang, Wang, & Li, 2019).

miR-145-5p ekspresyon düzeyi AÖ grupta, BPH'li gruba göre anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p=0,0300$ ). AS grupta ise az artış görülmüş ve anlamlı farklılık ortadan kalkmıştır ( $p=0,6027$ ). Cerrahi operasyon sonrası, düzeyi normale yaklaşma eğilimi göstermiştir. Yang ve arkadaşları 2014 yılında aralarında prostat kanseri, osteosarkom, meme kanseri, serviks kanseri gibi çeşitli malignitelerin bulunduğu 18 farklı çalışma üzerinde meta analiz yapmışlardır. miR-145-5p'nin özellikle p53 geni üzerinden DNA hasarını düzenlediğini ve bunun yanı sıra miR-145-5p düzeylerindeki yüksekliğin düşüklüğüne göre, belirteç olarak daha etkin kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (Yang vd., 2014). Ozen ve ark. yaptıkları çalışmada miR145-5p ekspresyon düzeyini arttırmanın SOX2 geninin ifadenme düzeyini düşürdüğünü bulmuşlar ve miR145-5p'nin bu gen aracılığıyla apoptozu arttırarak hücre proliferasyonunu azalttığını söylemişlerdir (M. Ozen vd., 2015). Bizim plazmada bulduğumuz sonuçlara paralel olarak, başka bir çalışmada PK dokusu ve bitişiğindeki normal dokudaki miR-145 ekspresyon düzeyleri ölçülmüş ve BPH'lilere göre anlamlı düzeyde düşük olduğu gözlenmiştir (Suh vd., 2011).

Çalışmamızda miR-221-3p düzeyleri AÖ grupta kontrol grubuna göre düşük olup, ileri derecede anlamlı bulundu ( $p=0,0004$ ). Radikal prostatektomi sonrası miR-221-3p düzeylerinin artış gösterdiği ve anlamlı farklılığın ortadan kalktığı görüldü ( $p=0,5824$ ). Yine de AÖ grupla AS grup arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür ( $p=0,0236$ ). Zhang ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları meta analiz çalışmasında miR-221/22 ailesinin düzeylerindeki yüksekliğin yaşam süresi ile ters orantılı olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda, Gleason grade 6 ve 7 PK hastalar ile çalışma yapılmıştır. Bu hastalarda prognoz iyidir ve yaşam süresi on yılın üzerindedir. Bu sonuç hastalarımızda miR-221-3p ekspresyonunun düzeyinin düşük bulunmasıyla pozitif korelasyon göstermektedir (Zhang vd., 2018). Shao ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada miR-221-5p düzeyinin PK hastalarda yüksek olduğunu ve tümör süpresör gen olan SOCS1 ekspresyonu değiştirerek, hücre çoğalması ve metastazı arttırdığını belirtmişlerdir. (Shao, Ma, Zhang, & Zhu, 2018). Gu ve

ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada PK hastaların dokularında, miR-182 ve miR-200c düzeyini yüksek, miR-221-3p düzeyini ise düşük bulmuşlar ve PK teşhisinde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (Gu vd., 2015).

Elde ettiğimiz verilere göre miR-130b-3p ekspresyon düzeylerinin AÖ grupta BPH hastalarına göre düşük olup, anlamlı farklılık olduğu görüldü ( $p=0,0225$ ). AS grupta ise kontrol grubuna göre istatistiki olarak fark gözlenmedi ( $p=0,6963$ ). Bizim sonucumuza benzer olarak Chen ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada, PK doku ve hücre dizisinde miR-130b seviyesinin düşük olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca miR-130b inhibisyonunun MMP2 üzerinden invazyon ve migrasyonu arttırdığını göstermişlerdir (Q. Chen vd., 2015). Ayrıca miR-130b ekspresyon düzeyleri meme kanserinde düşük bulunurken (Shui vd., 2017), akut promiyelösitik lösemi (Gong, Xu, Jiang, Guan, & Liu, 2016), mide kanseri (Sun, Li, Ma, Wang, & Huang, 2016), glioma (B. Li vd., 2017) ve özofagus skuamöz hücreli karsinomda (Zhu vd., 2019) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (Hirono vd., 2019) yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda miR-301a-3p düzeyinde anlamlı fark görmememize rağmen ( $p>0,9999$ ), Kolluru ve ark. (2018) PK hastalarında hem serumda hemde dokuda miR-301a düzeyini yüksek bulduklarını ve RUNX3 geni üzerinden etki ettiğini bildirmişlerdir (Kolluru vd., 2018). Sonuçlar arasındaki farklılık muhtemelen çalışılan miRNA'ların aynı aileden olmalarına rağmen farklı miRNA'lar olmaları veya çalışılan popülasyonun ve kullanılan normalizasyon metodunun farklı olmasından kaynaklanmaktadır. miR-301a'nın prostat kanserinde RUNX3 geni, akciğer kanserinde MEOX2 geni (Cao vd., 2010), meme kanserinde ise FOXF2, BBC3, PTEN, ve COL2A1 genleri üzerinden etki ettiği bildirilmiştir (Shi vd., 2011). Bir miRNA'nın birden fazla hedefi olabileceği bilinmesine rağmen, bu durumun tedavi ajanı olarak kullanılmasını zorlaştıracakları görülmektedir. Dolayısıyla miRNA'ları etkiledikleri ortak yolların belirlenmesi zorunluluğu ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda qRT-PCR analizleri sırasında Let-7i-5p house keeping geni olarak kullanıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda miR-16, miR-39, RUN1A-1,

U6 gibi çok sayıda farklı gen normalizasyon amacıyla house keeping olarak kullanılmıştır. miRNA'larda henüz üzerinde uzlaşmaya varılmış normalizasyon geni bulunmamaktadır. Bu da çalışmalar arasında çelişkili sonuçlar ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Chen ve ark. 2013 yılında yaptıkları araştırmada normalleştirme için en uygun referans genin let-7i olduğunu ardından let-7d ve let-7g'nin geldiğini bildirmişlerdir. Ardından bu 3 geni karıştırarak oluşturdukları let-7d /g/i'nin miRNA RT-qPCR deneyleri için referans genleri olarak yaygın kullanılan miR-191, miR-103, U6, miR-16, RNU48 ve RNU44'ten daha stabil olduğunu belirtmişlerdir (X. Chen vd., 2013). Çalışmalarda görülen bu karışıklığın ileride doku, plazma ve vücut sıvıları için farklı normalizasyon genleri üzerinde uzlaşmaya varılıp standardize edilmesinin, sonuçların farklı çıkmasını engelleyebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın hücre kültürü aşaması, miRNA gen ifadenmesi araştırmaları sonucunda plazmada düzeyi düşük bulunan miRNA'lardan 3 tanesinin agonisti (miR-125b-5p, miR145-5p, miR-221-3p)'nin insan PK hücreleri üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirildi. Böylece miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin yükseltilerek PK'nin tedavisinde etkinliğinin gösterilmesi amaçlandı. Bu miRNA'ların hücre canlılığı üzerine etkisini gözlemlemek için öncelikle MTT yöntemi ile canlılık analizi gerçekleştirildi. Her üç miRNA grubunda da 48. saatte anlamlı farklılık gözlenmezken, esas etki 72. saatte görülmeye başlandı. Kontrol grubuna göre 48. saatte % 90 canlılık oranı tespit edilen miR-125b-5p grubunda, 72. saatte % 63 düzeyinde yaşam oranı ile en etkin sonuç elde edilmiştir (p= 0,0001). miR-145-5p'nin, % 72 canlılık oranı (p= 0,0051) ve miR-221-3p'nin ise % 82 canlılık oranı (p= 0,0276) ile 72. saatte hücre çoğalmasını azaltarak anlamlı sonuç verdikleri bulundu. Aakula ve ark. 5 farklı PK hücre dizisine 1129 mimik transfekte etmişlerdir. Bunlardan yirmi beş tanesinin hücre büyümesini uyardığını kırk sekiz tanesinin hücre büyümesini azalttığını gözlemlemişlerdir. Ekspresyon düzeyleri artan miRNA'ların hücre çoğalmasını arttırdığı, ekspresyon düzeyleri azalanların da hücre çoğalmasını azaltacağını

düşünmüşlerdir. Bu hipotez sonucu dokuda miRNA düzeylerini ölçtüklerinde sadece 14 miRNA'nın bu hipoteze uyduğunu gözlemlemişlerdir (Aakula vd., 2016). Böylelikle miRNA'ların düzeylerinde oluşan farklılıkların hücreyi farklı şekillerde etkilediği görülmektedir.

Çalışmamızda mimiklerimizin hücre canlılığını azalttığını tespit ettikten sonra, apoptoz üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla ELISA yöntemiyle kaspaz 3-8-9 düzeyleri incelendi. Apoptoz, hücrelerde çeşitli sebeplerle oluşan hasarlara, yaşlı hücrelere veya zararlı hücre yapılarına karşı hücre ölümünü uyaran fizyolojik bir cevaptır. Apoptoz, kaspaz proteinleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Kaspaz 8 ve 9 apoptozun başlangıcında görev alırken kaspaz 3 hücre yıkımından sorumludur. Çalışmamızda, miRNA'ların kaspaz 9 düzeyinde değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi. miR-125b-5p ( $p=0,0152$ ) ve miR-221-3p'nin ( $p=0,0294$ ) kaspaz 8 düzeyinde anlamlı artışa yol açtığı gözlemlendi. miR-125b-5p ( $p=0,0370$ ), miR145-5p ( $p=0,0018$ ) miR221-3p ( $p=0,0038$ )'nin kaspaz 3 düzeyinde anlamlı artışa neden oldukları bulundu. Elde ettiğimiz verilere göre mimiklerimizin hücre çoğalmasını apoptozu uyatarak baskıladığı görülmektedir. Bu durum MTT sonuçlarımıza uyum göstermektedir. Ancak MTT analiz sonuçlarımıza göre hücrelerin canlılığı üzerinde etkinliği en az bulunan miR-221-3p'nin, kaspaz düzeylerinde en etkin miRNA olması ilgi çekicidir. Bu da diğer miRNA'ların başka yollarla da hücreyi öldürdüğünü veya çoğalmasını yavaşlattığını düşündürmektedir.

Mimiklerimizin DU 145 hücrelerinde apoptozu uyardığı sonucunu desteklemek amacıyla, ELISA yöntemine ek olarak hücrelerimize, H-E ve Bax/Bcl-2 boyama işlemleri uygulandı. H-E boyama hücre morfolojisi hakkında bilgi edinmemizi sağlarken, Bax/Bcl-2 boyama apoptoz düzeyleri hakkında bilgi vermektedir. Her üç mimik transfeksiyonunun ardından hücrelerde, 48. ve 72. saatte H-E boyama ile kontrol grubu ile kıyaslandığında çok sayıda kondanse ve fragmente çekirdek oluşumu gözlemlendi. Elde ettiğimiz sonuçlar hücrelerimizde ölüm oranının arttığını göstermektedir ve MTT ile ELISA sonuçlarımıza uyum göstermektedir. Bax/Bcl- 2 boyama ile elde ettiğimiz görüntülerde hücrelerimizin kontrol grubuna göre proapoptotik Bax

ile boyandığı, antiapoptotik belirteç Bcl-2 ile boyanmadığı görülmüştür. Bu veriler her üç mimiğin transfeksiyonu sonrasında hücrelerde apoptozun arttığını açıkça ortaya koymaktadır.

Apoptoz çok sayıda anti/pro-apoptotik proteinler tarafından koordineli olarak düzenlenmektedir. Dolayısıyla kanser tedavi yöntemlerinden biri, ilaçlarla anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltmak ve/veya pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu uyarmaktır. Ma ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada, Bcl-2 proteinini hedef alan çok sayıda reaktif olmasına rağmen, bunların hiçbirisinin proteinin hücre içi seviyesini etkili bir şekilde azaltmadığını belirtmişlerdir. miR-143'ün Bcl-2'yi baskılayarak PK'de apoptozu uyardığını belirtmişlerdir (Ma, Luo, & Qiu, 2017). Mimiğimiz bu yolla etki edebilme potansiyeli görülmesine rağmen, bu ilişkinin kesin olarak ispatlanabilmesi için mimiğin transfeksiyonu sonrası Bax/Bcl-2 düzeylerinin RT-PCR ve Western Blot ile belirlenmesi gerekmektedir.

MMP'lar ekstrasellüler matriks yıkımında görev alırlar, böylelikle kanserlerin invazyon ve metastaz oluşturmalarına yardımcı olurlar. Bunun ilk aşaması MMP-2 ve MMP-9 aracılığıyla bazal membranda bolca bulunan tip 4 kollajenin yıkılmasıyla gerçekleşmektedir (Mook, Frederiks, & Van Noorden, 2004). Elde ettiğimiz sonuçlara göre kullandığımız miRNA agonistlerinin MMP-2 düzeyinde anlamlı değişiklik oluşturmadığı bulundu. Fakat miR-221-3p'nin MMP-9 düzeyini azalttığı gözlemlendi. Bütün bu veriler miR-221-3p'nin, PK'nin hem teşhisinde, hem tedavisinde hem de metastazının engellenmesinde bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Hücrelerin invazyon ve metastaz derecelerini gösteren diğer bir test migrasyon testidir. Elde ettiğimiz verilere göre her üç mimiğin teyara alanının daha geç kapanmasına neden olmuştur. Kırk sekiz saat sonunda kontrol grubunda teyara alanının % 96'sı kapanmıştır. Buna karşılık, miR-125b-5p transfekte edilen hücrelerde % 41, miR-145-5p' de % 62, miR-221-3p'de % 39 oranında teyara alanı kapanmıştır. Bu veriler ışığında mimiğimiz daha çok hücre apoptozunu uyarak ve miR-221-3p'nin buna ek olarak MMP 9 düzeyini düşürmesiyle etki ettiği sonucuna varılmaktadır.

miRNA çalışmalarının en büyük dezavantajı dokudan dokuya, kanser türünden kanser türüne ekspresyon düzeylerinin farklılık göstermesidir. Gelecekte yapılacak çalışmalar sayesinde belirli bir kanser türünün gelişimini sağlayan miRNA'ların belirlenmesinin tanı ve tedavide yönlendirici olabileceği veya yeni tedavi yöntemlerinin ortaya çıkmasına ışık tutacağı düşünülmektedir. Bu yüzden biz de bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre belirtilen miRNA'ların belirteç olmaları yolundaki yeni çalışmalara yol gösterici olacağına inanmaktayız.



## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-221-3p ve miR-130b-3p'nin ekspresyon düzeylerinin PK'li hastalarda BPH'lilere göre düşük olduğu gözlemlendi. miRNA mimikleri hücrelere transfekte edilerek düzeyleri arttırıldığında, hücre çoğalmasını azalttıkları, apoptozu uyardıkları, migrasyon ve metastazı azalttıkları bulundu. Bu veriler de bize bu miRNA'ların PK patogenezinde rol aldığını düşündürmektedir.

miRNA'ların düzeylerinde oluşan farklılıklar, protein sentezini düzenleme yoluyla birçok hastalığın başlamasında, ilerlemesinde ve metastazda rol oynamaktadırlar. Dolayısıyla teşhis ve tedavide potansiyel hedef haline gelmektedirler. Aynı miRNA'nın düzeyinde oluşan değişikliklerin (düşüklük/yükseklik), farklı maligniteler oluşturması, miRNA'ların etkiledikleri yolakların her iki duruma da hassas olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla tedavi edici ajan olarak kullanılırlarsa dozlarının çok dikkatli, hücredeki konsantrasyonuna eşdeğer olacak şekilde ayarlanması gerekmektedir. Bu konu vücuda dışarıdan verilebilmesi için aşılması gereken ciddi bir sorun olarak görülmektedir. Diğer bir sorun miRNA'ların, cinsiyete, ırka, bölgeye, genetik yapıya göre değişiklik gösterme ihtimalinin bulunmasıdır. Bu da her toplum için vücuttaki ideal ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi zorunluluğunu ortaya çıkarmaktadır. Bu durumun tedavi ajanı olarak kullanılmasını zorlaştıracığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak miRNA'ların PK gibi erken teşhis durumunda, tedavinin radikal prostatektomi gibi lokal çözümlerle yapılabileceği hastalarda belirteç olarak kullanılabilmesi, şu an için daha kolay ve ideal bir çözüm olarak ortaya çıkmaktadır. Hastalık teşhisinde belirli bir sayıda miRNA'nın panel halinde kullanılması doğruluk ve kesinlik açısından zorunludur. Plazmada düzeyini ölçtüğümüz miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-130b-3p ve miR-221-3p'nin bu amaçla kullanılabilmesini düşünmekteyiz. Bu miRNA'lar gelecekte PK tedavisi ve ilerlemesinin önlenmesinde potansiyel aday olarak



görünmektedirler. PK hastalarının miRNA profilinin belirlenmesi için geniş hasta popülasyonlarında, daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



## 9. KAYNAKLAR

- Aakula, A., Kohonen, P., Leivonen, S. K., Makela, R., Hintsanen, P., Mpindi, J. P., . . . Ostling, P. (2016). Systematic Identification of MicroRNAs That Impact on Proliferation of Prostate Cancer Cells and Display Changed Expression in Tumor Tissue. *Eur Urol*, *69*(6), 1120-1128. doi:10.1016/j.eururo.2015.09.019
- Banerji, J. S., Wolff, E. M., Massman, J. D., 3rd, Odem-Davis, K., Porter, C. R., & Corman, J. M. (2016). Prostate Needle Biopsy Outcomes in the Era of the U.S. Preventive Services Task Force Recommendation against Prostate Specific Antigen Based Screening. *J Urol*, *195*(1), 66-73. doi:10.1016/j.juro.2015.07.099
- Banzhaf-Strathmann, J., & Edbauer, D. (2014). Good guy or bad guy: the opposing roles of microRNA 125b in cancer. *Cell Commun Signal*, *12*, 30. doi:10.1186/1478-811x-12-30
- Barry, M. J. (2001). Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N Engl J Med*, *344*(18), 1373-1377. doi:10.1056/nejm200105033441806
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, *136*(2), 215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Baspinar, S., Bircan, S., Ciris, M., Karahan, N., & Bozkurt, K. K. (2017). Expression of NGF, GDNF and MMP-9 in prostate carcinoma. *Pathol Res Pract*, *213*(5), 483-489. doi:10.1016/j.prp.2017.02.007
- Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., . . . Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, *35*(3), 215-217. doi:10.1038/ng1253
- Bhaskaran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol*, *51*(4), 759-774. doi:10.1177/0300985813502820
- Board, P. D. Q. A. T. E. (2002). Prostate Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US).
- Bommer, G. T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A. J., Kuick, R., Love, R. E., . . . Fearon, E. R. (2007). p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol*, *17*(15), 1298-1307. doi:10.1016/j.cub.2007.06.068
- Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, *10*(12), 1957-1966. doi:10.1261/rna.7135204

- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., . . . Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(24), 15524-15529. doi:10.1073/pnas.242606799
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., . . . Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 2999-3004. doi:10.1073/pnas.0307323101
- Cao, G., Huang, B., Liu, Z., Zhang, J., Xu, H., Xia, W., . . . Shao, N. (2010). Intronic miR-301 feedback regulates its host gene, *ska2*, in A549 cells by targeting *MEOX2* to affect ERK/CREB pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, *396*(4), 978-982. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.037
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, *2*(8), 563-572. doi:10.1038/nrc865
- Chen, Q., Zhao, X., Zhang, H., Yuan, H., Zhu, M., Sun, Q., . . . Yu, J. (2015). MiR-130b suppresses prostate cancer metastasis through down-regulation of MMP2. *Mol Carcinog*, *54*(11), 1292-1300. doi:10.1002/mc.22204
- Chen, X., Liang, H., Guan, D., Wang, C., Hu, X., Cui, L., . . . Zhang, C.-Y. (2013). A Combination of Let-7d, Let-7g and Let-7i Serves as a Stable Reference for Normalization of Serum microRNAs. *PLoS One*, *8*(11), e79652. doi:10.1371/journal.pone.0079652
- Chen, Z. H., Zhang, G. L., Li, H. R., Luo, J. D., Li, Z. X., Chen, G. M., & Yang, J. (2012). A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate*, *72*(13), 1443-1452. doi:10.1002/pros.22495
- Cowland, J. B., Hother, C., & Gronbaek, K. (2007). MicroRNAs and cancer. *APMIS*, *115*(10), 1090-1106. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_775.xml.x
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., & Sharp, P. A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *4*(6), 457-467. doi:10.1038/nrm1129
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, *2*(3), 161-174. doi:10.1038/nrc745
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo j*, *20*(23), 6877-6888. doi:10.1093/emboj/20.23.6877
- Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., . . . Kauppinen, S. (2008). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, *452*(7189), 896-899. doi:10.1038/nature06783

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Fair, W. R., & Wehner, N. (1976). The prostatic antibacterial factor: identity and significance. *Prog Clin Biol Res*, 6, 383-403.
- Fine, S. W., & Reuter, V. E. (2012). Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. *Histopathology*, 60(1), 142-152. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04004.x
- Folgueras, A. R., Pendas, A. M., Sanchez, L. M., & Lopez-Otin, C. (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*, 48(5-6), 411-424. doi:10.1387/ijdb.041811af
- Franks, L. M. (1954). Latent carcinoma. *Ann R Coll Surg Engl*, 15(4), 236-249.
- Fuchs, Y., & Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4), 742-758. doi:10.1016/j.cell.2011.10.033
- Gong, X. C., Xu, Y. Q., Jiang, Y., Guan, H., & Liu, H. L. (2016). Onco-microRNA miR-130b promoting cell growth in children APL by targeting PTEN. *Asian Pac J Trop Med*, 9(3), 265-268. doi:10.1016/j.apjtm.2016.01.024
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), 631-640. doi:10.1016/j.cell.2005.10.022
- Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27(1), 91-105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017
- Gu, Y., Lei, D., Qin, X., Chen, P., Zou, Y. M., & Hu, Y. (2015). Integrated Analysis Reveals together miR-182, miR-200c and miR-221 Can Help in the Diagnosis of Prostate Cancer. *PLoS One*, 10(10), e0140862. doi:10.1371/journal.pone.0140862
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308), 835-840. doi:10.1038/nature09267
- Guzel, E., Karatas, O. F., Semercioz, A., Ekici, S., Aykan, S., Yentur, S., . . . Ozen, M. (2015). Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer. *Int J Cancer*, 136(4), 875-879. doi:10.1002/ijc.29054
- Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*, 87, 3-14. doi:10.1016/j.addr.2015.05.001
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., & Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. *Science*, 293(5532), 1146-1150. doi:10.1126/science.1064023

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, *18*(24), 3016-3027. doi:10.1101/gad.1262504
- Hirono, T., Jingushi, K., Nagata, T., Sato, M., Minami, K., Aoki, M., . . . Tsujikawa, K. (2019). MicroRNA-130b functions as an oncomiRNA in non-small cell lung cancer by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *Sci Rep*, *9*(1), 6956. doi:10.1038/s41598-019-43355-8
- Kanwal, R., Plaga, A. R., Liu, X., Shukla, G. C., & Gupta, S. (2017). MicroRNAs in prostate cancer: Functional role as biomarkers. *Cancer Lett*, *407*, 9-20. doi:10.1016/j.canlet.2017.08.011
- Kerr, J. F., Winterford, C. M., & Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, *73*(8), 2013-2026. doi:10.1002/1097-0142(19940415)73:8<2013::aid-cncr2820730802>3.0.co;2-j
- Kim, S. W., Ramasamy, K., Bouamar, H., Lin, A. P., Jiang, D., & Aguiar, R. C. (2012). MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF-kappaB pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(20), 7865-7870. doi:10.1073/pnas.1200081109
- Kolluru, V., Chandrasekaran, B., Tyagi, A., Dervishi, A., Ankem, M., Yan, X., . . . Damodaran, C. (2018). miR-301a expression: Diagnostic and prognostic marker for prostate cancer. *Urol Oncol*, *36*(11), 503.e509-503.e515. doi:10.1016/j.urolonc.2018.07.014
- Konac, E. S., S. (2014). Prostat Kanserinin Tanı ve Tedavisinde Moleküler Biyolojinin Kullanım Alanları. *Üroonkoloji Bülteni*, *13*:, 228-235.
- Kornberg, Z., Cooperberg, M. R., Spratt, D. E., & Feng, F. Y. (2018). Genomic biomarkers in prostate cancer. *Transl Androl Urol*, *7*(3), 459-471. doi:10.21037/tau.2018.06.02
- Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., . . . Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, *37*(5), 495-500. doi:10.1038/ng1536
- Kumar, V. L., & Majumder, P. K. (1995). Prostate gland: Structure, functions and regulation. *International Urology and Nephrology*, *27*(3), 231-243. doi:10.1007/BF02564756
- Kurul, N. O., Ates, F., Yilmaz, I., Narli, G., Yesildal, C., & Senkul, T. (2019). The association of let-7c, miR-21, miR-145, miR-182, and miR-221 with clinicopathologic parameters of prostate cancer in patients diagnosed with low-risk disease. *Prostate*, *79*(10), 1125-1132. doi:10.1002/pros.23825
- Larson, K., Ho, H. H., Anumolu, P. L., & Chen, T. M. (2011). Hematoxylin and eosin tissue stain in Mohs micrographic surgery: a review. *Dermatol Surg*, *37*(8), 1089-1099. doi:10.1111/j.1524-4725.2011.02051.x

- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*(5543), 862-864. doi:10.1126/science.1065329
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854.
- Lee, Y. H., Na, H. S., Jeong, S. Y., Jeong, S. H., Park, H. R., & Chung, J. (2011). Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues. *Biocell*, *35*(2), 43-49.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15-20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
- Li, B., Liu, Y. H., Sun, A. G., Huan, L. C., Li, H. D., & Liu, D. M. (2017). MiR-130b functions as a tumor promoter in glioma via regulation of ERK/MAPK pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *21*(12), 2840-2846.
- Li, J., You, T., & Jing, J. (2014). MiR-125b inhibits cell biological progression of Ewing's sarcoma by suppressing the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Prolif*, *47*(2), 152-160. doi:10.1111/cpr.12093
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., . . . Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, *435*(7043), 834-838. doi:10.1038/nature03702
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, *303*(5654), 95-98. doi:10.1126/science.1090599
- Ma, Z., Luo, Y., & Qiu, M. (2017). miR-143 Induces the Apoptosis of Prostate Cancer LNCap Cells by Suppressing Bcl-2 Expression. *Med Sci Monit*, *23*, 359-365. doi:10.12659/msm.899719
- Martinez, J., & Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*, *18*(9), 975-980. doi:10.1101/gad.1187904
- McDougal, W. S., Wein, A. J., Kavoussi, L. R., Novick, A. C., Partin, A. W., Peters, C. A., & Ramchandani, P. (2011). *Campbell-Walsh Urology 10th Edition Review E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Melton, C., & Blelloch, R. (2010). MicroRNA Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Adv Exp Med Biol*, *695*, 105-117. doi:10.1007/978-1-4419-7037-4\_8
- Michael, M. Z., SM, O. C., van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P., & James, R. J. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, *1*(12), 882-891.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., . . . Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc*

*Natl Acad Sci U S A*, 105(30), 10513-10518.  
doi:10.1073/pnas.0804549105

- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., . . . Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9(6), 1799-1805.
- Mohr, A. M., & Mott, J. L. (2015). Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis*, 35(1), 3-11. doi:10.1055/s-0034-1397344
- Mook, O. R., Frederiks, W. M., & Van Noorden, C. J. (2004). The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 1705(2), 69-89. doi:10.1016/j.bbcan.2004.09.006
- Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H., Okanoue, T., & Shimotohno, K. (2006). Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 25(17), 2537-2545. doi:10.1038/sj.onc.1209283
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002 %J Cardiovascular Research
- Nagase, H., & Woessner, J. F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 274(31), 21491-21494. doi:10.1074/jbc.274.31.21491
- Nam, J. W., Rissland, O. S., Koppstein, D., Abreu-Goodger, C., Jan, C. H., Agarwal, V., . . . Bartel, D. P. (2014). Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting. *Mol Cell*, 53(6), 1031-1043. doi:10.1016/j.molcel.2014.02.013
- Nosrati, R., Kheirouri, S., Ghodsi, R., & Ojaghi, H. (2019). The effects of zinc treatment on matrix metalloproteinases: A systematic review. *J Trace Elem Med Biol*, 56, 107-115. doi:10.1016/j.jtemb.2019.08.001
- Ozen, H. T., L. Beduk, Y. Çal, C. Eskicorapci, S. Narter, F. (Ed.) (2017). *Üroonkoloji Kitabı* (Vol. Cilt 1). PELİN OFSET: Türkiye/ Ankara
- Ozen, M., Creighton, C. J., Ozdemir, M., & Ittmann, M. (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*, 27(12), 1788-1793. doi:10.1038/sj.onc.1210809
- Ozen, M., Karatas, O. F., Gulluoglu, S., Bayrak, O. F., Seveli, S., Guzel, E., . . . Ittmann, M. (2015). Overexpression of miR-145-5p inhibits proliferation of prostate cancer cells and reduces SOX2 expression. *Cancer Invest*, 33(6), 251-258. doi:10.3109/07357907.2015.1025407
- Pang, Y., Young, C. Y., & Yuan, H. (2010). MicroRNAs and prostate cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42(6), 363-369. doi:10.1093/abbs/gmq038

- Park, C. Y., Choi, Y. S., & McManus, M. T. (2010). Analysis of microRNA knockouts in mice. *Hum Mol Genet*, *19*(R2), R169-175. doi:10.1093/hmg/ddq367
- Pietenpol, J. A., & Stewart, Z. A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, *181-182*, 475-481. doi:10.1016/s0300-483x(02)00460-2
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, *8*(4), 603-619. doi:10.18632/aging.100934
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, *14*(10a), 1902-1910. doi:10.1101/gr.2722704
- Rodriguez, L. V., & Terris, M. K. (1998). Risks and complications of transrectal ultrasound guided prostate needle biopsy: a prospective study and review of the literature. *J Urol*, *160*(6 Pt 1), 2115-2120. doi:10.1097/00005392-199812010-00045
- Rosbach, M. (2010). Small non-coding RNAs as novel therapeutics. *Curr Mol Med*, *10*(4), 361-368.
- Saini, H. K., Griffiths-Jones, S., & Enright, A. J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(45), 17719-17724. doi:10.1073/pnas.0703890104
- Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, *45*(3), 528-537. doi:10.1016/s0008-6363(99)00384-3
- Schalken, J. (2005). Androgen Receptor Mediated Growth of Prostate (Cancer). *European Urology Supplements*, *4*(8), 4-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eursup.2005.08.006>
- Shao, N., Ma, G., Zhang, J., & Zhu, W. (2018). miR-221-5p enhances cell proliferation and metastasis through post-transcriptional regulation of SOCS1 in human prostate cancer. *BMC Urol*, *18*(1), 14. doi:10.1186/s12894-018-0325-8
- Sharma, M. G., S. Dhole, B. Kumar, A. (2017). The Prostate Gland. In A. S. Kumar, M. (Ed.), *Basics of Human Andrology* (pp. 17-35): Springer Singapore.
- Shi, W., Gerster, K., Alajez, N. M., Tsang, J., Waldron, L., Pintilie, M., . . . Liu, F. F. (2011). MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res*, *71*(8), 2926-2937. doi:10.1158/0008-5472.Can-10-3369
- Shomron, N., & Levy, C. (2009). MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk. *J Biomed Biotechnol*, *2009*, 594678. doi:10.1155/2009/594678



- Shui, Y., Yu, X., Duan, R., Bao, Q., Wu, J., Yuan, H., & Ma, C. (2017). miR-130b-3p inhibits cell invasion and migration by targeting the Notch ligand Delta-like 1 in breast carcinoma. *Gene*, *609*, 80-87. doi:10.1016/j.gene.2017.01.036
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, *69*(1), 7-34. doi:10.3322/caac.21551
- Singh, I., W. Strandhoy, J., & G. Assimos, D. (2012). Campbell-Walsh Urology Tenth Edition. In (pp. 1087-1121).
- Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta*, *1477*(1-2), 299-306. doi:10.1016/s0167-4838(99)00281-2
- Suh, S. O., Chen, Y., Zaman, M. S., Hirata, H., Yamamura, S., Shahryari, V., . . . Dahiya, R. (2011). MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis*, *32*(5), 772-778. doi:10.1093/carcin/bgr036
- Sun, B., Li, L., Ma, W., Wang, S., & Huang, C. (2016). MiR-130b inhibits proliferation and induces apoptosis of gastric cancer cells via CYLD. *Tumour Biol*, *37*(6), 7981-7987. doi:10.1007/s13277-015-4632-3
- Sun, B., Zhang, Y., Zhou, L., Yin, L., Li, F., Li, C., & Xia, J. (2019). The proliferation of cervical cancer is promoted by miRNA-125b through the regulation of the HMGA1. *Onco Targets Ther*, *12*, 2767-2776. doi:10.2147/ott.S197740
- Szeliski, K., Adamowicz, J., Gastecka, A., Drewa, T., & Pokrywczynska, M. (2018). Modern urology perspectives on prostate cancer biomarkers. *Cent European J Urol*, *71*(4), 420-426. doi:10.5173/cej.2018.1762
- Team, N. G. U. (2019). National Institute for Health and Care Excellence: Clinical Guidelines. In *Prostate cancer: diagnosis and management*. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK)
- Copyright (c) NICE 2019.
- Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, *281*(5381), 1312-1316. doi:10.1126/science.281.5381.1312
- Tsang, F. H., Au, V., Lu, W. J., Shek, F. H., Liu, A. M., Luk, J. M., . . . Lee, N. P. (2014). Prognostic marker microRNA-125b inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells via suppressing tumorigenic molecule eIF5A2. *Dig Dis Sci*, *59*(10), 2477-2487. doi:10.1007/s10620-014-3184-5
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, *92*(8), 827-839. doi:10.1161/01.Res.0000070112.80711.3d
- Wach, S., Al-Janabi, O., Weigelt, K., Fischer, K., Greither, T., Marcou, M., . . . Taubert, H. (2015). The combined serum levels of miR-375 and urokinase plasminogen activator receptor are suggested as diagnostic

- and prognostic biomarkers in prostate cancer. *Int J Cancer*, 137(6), 1406-1416. doi:10.1002/ijc.29505
- Wang, J. K., Wang, Z., & Li, G. (2019). MicroRNA-125 in immunity and cancer. *Cancer Lett*, 454, 134-145. doi:10.1016/j.canlet.2019.04.015
- Wang, X., Zhang, Y., Fu, Y., Zhang, J., Yin, L., Pu, Y., & Liang, G. (2015). MicroRNA-125b may function as an oncogene in lung cancer cells. *Mol Med Rep*, 11(5), 3880-3887. doi:10.3892/mmr.2014.3142
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., & Blelloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*, 39(3), 380-385. doi:10.1038/ng1969
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., . . . Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56(11), 1733-1741. doi:10.1373/clinchem.2010.147405
- Williams, D. I., & Chisholm, G. D. (1976). *Scientific Foundations of Urology*. London: William Heinemann Medical Book Ltd.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 87. doi:10.1186/1756-9966-30-87
- Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., Ahmad, R., & Kaur, G. (2014). Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(3), 1085-1091. doi:10.7314/apjcp.2014.15.3.1085
- Yang, J., Zhang, J. Y., Chen, J., Chen, C., Song, X. M., Xu, Y., & Li, J. (2014). Prognostic role of microRNA-145 in various human malignant neoplasms: a meta-analysis of 18 related studies. *World J Surg Oncol*, 12, 254. doi:10.1186/1477-7819-12-254
- Zeng, Y., Yi, R., & Cullen, B. R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(17), 9779-9784. doi:10.1073/pnas.1630797100
- Zhang, P., Zhang, M., Han, R., Zhang, K., Ding, H., Liang, C., & Zhang, L. (2018). The correlation between microRNA-221/222 cluster overexpression and malignancy: an updated meta-analysis including 2693 patients. *Cancer Manag Res*, 10, 3371-3381. doi:10.2147/cmar.S171303
- Zhu, Y., Ma, Y., Peng, H., Gong, L., Xiao, M., Xiang, L., . . . Cao, K. (2019). MiR-130b promotes the progression of oesophageal squamous cell carcinoma by targeting SASH1. *J Cell Mol Med*, 23(1), 93-103. doi:10.1111/jcmm.13887

**Web 1:** <https://gis.cdc.gov/Cancer/USCS/DataViz.html>

**Web 2:** <http://regulusrx.com/programs/pipeline/>

## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Abdullah KARADAĞ  
Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1981 / Şanlıurfa  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Evli  
İletişim adresleri :  
Tel: 0544 715 1010  
Email: [abdullahtbb63@gmail.com](mailto:abdullahtbb63@gmail.com)  
Adres: Adıyaman Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri  
Fizyoloji A.D. Merkez/Adıyaman

### Eğitim Durumu

Orhan Gazi Ortaokulu 1991-1995  
Şanlıurfa Lisesi 1995-1999  
İstanbul Üniversitesi/ Cerrahpaşa Tıp Fak./ Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü  
2001-2006  
Yabancı Dil: İngilizce (YDS :67,5 Yökdil 76,25)

### Mesleki Deneyim :

#### Araştırma Görevlisi:

KSÜ Tıp Fak Mikrobiyoloji A.D.	2011- 2013
ESOGÜ Tıp Fak Fizyoloji A.D.	2013 – 2019
Adıyaman Üniversitesi Tıp Fak. Fizyoloji A.D.	2019 - .....

### Yayımlar :

#### Uluslar arası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

GUL M, DOGAN E, KIRECCI E, UÇMAK H, DIRICAN E, [KARADAG A.](#) *Serratia ficaria* Isolated from Sputum Specimen. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58(3), 235-238, 2011

#### Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler.

GUL M, DOGAN E, KIRECCI E, UÇMAK H, DIRICAN E, [KARADAG A.](#) *Serratia ficaria* Isolated from Sputum Specimen. *The 4th Eurasia Congress of Infectious Diseases (EACID). Sarajevo, Bosnia. 2011*

M. OZKURT, R. ÖZYURT, [A. KARADAĞ](#), T. HELLWIG-BÜRCEL, S. KABADERE AND N. ERKASAP. Analysis of Micro-RNAs Participating the Inhibition of Erythropoietin Synthesis by TNF-alpha

via Microarray Technology. Europhysiology 2018, 14-16 September 2108, London, UK.

M. OZKURT, R. ÖZYURT, A. KARADAĞ AND N. ERKASAP. Prevents the Supression of Epo by TNF-alpha. Europhysiology 2018, 14-16 September 2108, London, UK.

N. ERKASAP, R. ÖZYURT, M. OZKURT, A. KARADAĞ AND C. MERAL EVIS. Targeting Inhibition of Ceramidase Induces Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma in vitro. Europhysiology 2018, 14-16 September 2108, London, UK.

### **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler**

GUL M, ULAKCI A, KARADAĞ A, DIRICAN E. Kan Bağışçılarında HBV, HCV, HIV ve Sifiliz Tarama Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi. 4. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi, 2011, Antalya, TÜRKİYE

### **Bilimsel Etkinlikler**

Kurslar ve Eğitim Programları :

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

Eğitim Becerileri Kursu (ESOGÜ Tıp Fakültesi)

Probleme Dayalı Öğrenim Kursu (ESOGÜ Tıp Fakültesi)

