

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT KANSERLİ HASTALARDA RADYOTERAPİ
UYGULAMALARINDA MIR-20A VE MİR-106B
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Nazlı Eyvan ÖZDEN

Enstitü Anabilim Dalı: Biyofizik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birsen AYDEMİR

KASIM-2018

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT KANSERLİ HASTALARDA RADYOTERAPİ
UYGULAMALARINDA MIRNA-20A VE MIRNA-106B
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Nazlı Eyvan ÖZDEN

Enstitü Anabilim Dalı: **Biyofizik**

"Bu tez ~~2018~~ /2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir."

JÜRİ ÜYESİ	KANAATI	İMZA
Prof. Dr. Bülent Aydemir	Basarılı	
Doç. Dr. F. Belma Çirincioğlu	Basarılı	
Dr. Öğr. Üyesi Cüdet Nur	Basarılı	

BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 16214662/050.01.04/112 sayılı ve 01/10/2014 tarihinde onay olarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih:

08.11.2018

Nazlı Eyvan ÖZDEN

İmza

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Yüksek Lisans Programı öğrenciliğim sürecinde bilgi, fikir ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin her aşamasında emeğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Birsen AYDEMİR'e, tez çalışmamda destek sunan Sayın Doç. Dr. Fatma Behice CİNEMRE ve Sayın Prof. Dr. Hakan CİNEMRE ile Sayın M.Sc. Selim ÖĞÜT'e, hasta temini ve tez hazırlığımda Sayın Doç. Dr. Didem KARAÇETİN'e, Radyasyon Onkolojisi Kliniği'nde örneklerle ulaşmama yardımcı olan tüm sağlık personeline, deneysel çalışmalarına katkı sunan Sayın Dr. Sevgin DEĞİRMENCİOĞLU'na, hayatımın her alanında manevi desteği olan sevgili eşim Yusuf ÖZDEN ve kızım Zeynep Aden ÖZDEN'e, aileme, ayrıca tez projemin gerçekleşmesi sürecini destekleyen Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No:2014-8001-004

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMA VE SİMGELER.....	vii
ŞEKİLLER.....	ix
TABLolar	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Prostat Bezi.....	2
2.2. Prostat Kanseri	2
2.3. Prostat Kanseri Tedavisinde Radyoterapi Doz Değerleri.....	4
2.4. TEŞHİS VE TEDAVİDE KULLANILAN YÖNTEMLER	5
2.4.1.Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi (YART):.....	5
2.4.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA).....	6
2.4.3.Radyonüklid Kemik Sintigrafisi.....	7
2.4.4. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)	8
2.4.5. Ultrasonografi (USG)	9
2.4.6.Biyopsi Materyalinin Histopatolojik İncelenmesi.....	9
2.5. Radyoterapinin Önemi ve Güvencesi.....	9
2.6. Prostat Kanserinde Moleküler Mekanizmalar	10
2.7. Prostat Kanserinde Tümör Belirteci Olarak Öne Çıkan Biyomoleküller.....	13
2.7.1. Prostat Spesifik Antijen	14
2.8. Kodlama Yapmayan RNA'lar	15
2.8.1. Prostat Kanseri Antijeni 3.....	15
2.8.2. mikroRNA'lar.....	17
2.8.3. mikroRNA'ların Biyogenezi	18
2.9. Prostat Kanserinde mikroRNA'ların Rolü	19
2.9.1.Dolaşıma Katılan mikroRNA'lar	20

2.9.2 Prostat Kanserinde miRNA	21
2.9.3. Prostat Kanserli Hastaların Radyasyona Yanıtında miRNA'ların Rolü	23
2.9.4.Kanser Radyodirencindeki Sinyal Yollarının Düzenleyicisi Olarak miRNA'ların Kabul Edilen Rollerini	25
2.9.5.Prostat Kanserinde Radyorezistansındaki Farklı Hücresel Biyolojik Olayların Regülatörü Olarak miRNA'ların Kabul Edilen Rollerini	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	37
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	38
3.3. Radyoterapi Tedavisi.....	39
3.4. Tam Kandan Total RNA Eldesi	40
3.4.1. Total RNA İzolasyon Yöntemi.....	40
↓.....	41
Kan ve 2-ME içeren lizat içerisinde 300 µl izopropanol eklendi ve vortekslendi.....	41
↓.....	41
Sonra bu karışım spin kolon içerisinde aktararak 10.000 g de 30 saniye boyunca santrifüj edildi.....	41
↓.....	41
3.4.2. miRNA Ekspresyon Düzeyleri Analizi.....	42
3.4.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	44
3.5. İstatistiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR	48
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	52
EKLER	55
1. ETİK KURULU ONAYI	55
ÖZGEÇMİŞ	70

KISALTMA VE SİMGELER

AJCC	: Amerikan Kanser Komitesi
AR	: Androjen Reseptörü
BCL	: Antiapoptotik Protein Ailesi
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
BPH	: Bening Prostat Hipertrofisi
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CSA	: Cockayne sendromu Protein A
CTV	: Klinik Hedef Hacmi
CRPC	: Kastrasyona Dirençli Prostat Kanseri
DDR	: DNA Hasar Yanıtı
DHT	: Dihidrotestesteron
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ER	: Östrojen Reseptörü
GEN	: Gen İfade Profili
GTV	: Görünen Tümör Hacmi
HT	: Hormonal Tedavi
IR	: İyonize Radyasyon
ME	: Merkaptoetanol
MLC	: Çok Yapraklı Kolimatör
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	: Mesajcı RNA
miRNA	: MikroRNA
MV	: Megavoltaj

NCCN	: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı
PAP	: Prostat Spesifik Asit Fosfataz
PCa	: Prostat Kanseri
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PTV	: Planlanan Hedef Hacmi
PZ	: Periferik Zon
RT	: Radyoterapi
TNM	: Tümör Lenf Nodu Metastaz
TRUS	: Transrektal Ultrasonografi
USG	: Ultrasonografi
YART	: Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi

ŞEKİLLER

Şekil 1. Kanserlerde radyasyona yanıt olarak DNA Hasar Yanıtı'nın düzenleyicisi olarak miRNA'ların rollerine genel bir bakış	37
Şekil 2. PCa dahil olmak üzere kanserlerde radyasyon cevabında hücre döngüsünün ve apoptozun bir regülatörü olarak miRNA'ların rollerine genel bir bakış.....	41
Şekil 3. mir-20a için standart eğri grafiği ve örnek değerleri.....	49
Şekil 4. mir-106b için standart eğri grafiği ve örnek değerleri	49
Şekil 5. mir-20a Amplifikasyon grafiği	50
Şekil 6. mir-106b Amplifikasyon grafiği.....	50
Şekil 7. U6 RNA Amplifikasyon grafiği.....	51
Şekil 8. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-20a ekspresyon değerleri (ortalama±standarthata).....	52
Şekil 9. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-106b ekspresyon değerleri (ortalama±standarthata).....	52
Şekil 10. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların PSA değerleri (ortalama±standart hata).....	53
Şekil 11. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların serbest PSA değerleri (ortalama±standart hata).....	53

TABLÖLAR

Tablo 1. RNA İzolasyonu Yönteminin Akışı.....	45
Tablo 2. miRNA RT-PCR Reaksiyonu.....	46
Tablo 3. miRNA RT Primer Hazırlanması.....	47
Tablo 4. cDNA Sentezi Reaksiyon Bileşenleri.....	47
Tablo 5. Real Time PCR Reaksiyonu Bileşenleri.....	48
Tablo 6. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların tam kan sayımı değerleri (ortalama±standart sapma).....	54
Tablo 7. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-20a ve miR-106b ekspresyon değerleri ile tam kan sayımı parametreleri arasındaki korelasyon değerleri.....	54

ÖZET

Prostat kanserinde, radyoterapi hayatta kalma oranını ve tedavi etkinliğini arttıran terapötik yaklaşımlardan birisidir. Çalışmamızın amacı radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanseri olan hastalarda miR-20a ve miR-106b ekspresyon düzeyleri ve bazı hematolojik parametreler değişiklikleri araştırmaktır. Çalışmaya radyoterapisi için Radyasyon Onkolojisi Bilim Dalı'na başvuran 35 prostat kanserli hasta dahil edildi. Radyoterapiden önce ve sonra kan örnekleri alındı. miR-20a ve miR-106b ekspresyonları kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) kullanılarak analiz edildi. Lökosit, lenfosit, eritrosit, trombosit ve nötrofil sayımı, otomatik hücre sayımı cihazında ölçüldü. Radyoterapi sonrası hastalarda miR-20a ve miR-106b ekspresyon seviyelerinin arttığı saptandı. Radyoterapi sonrası hastalarda PSA, fPSA, lökosit, lenfosit ve nötrofil sayıları önemli derecede azalırken, eritrosit ve trombosit sayıları arasında anlamlı bir değişiklik olmadığı bulundu. Pearson korelasyon analizi ile, radyoterapi sonrasında miR-20a ile miR-106b ekspresyon düzeylerinin pozitif korelasyon gösterdiği bulundu ($r = 0.722$, $p = 0.01$). Radyoterapi öncesinde fPSA ile miR-106b ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı negatif bir korelasyonun olduğu görüldü ($r = -0.598$, $p = 0.014$). Ayrıca, radyoterapi öncesinde lökosit sayısı ile miR-20a ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı negatif bir korelasyonun varlığı gösterilmiştir ($r = -0.474$, $p = 0.035$). Lökosit, lenfosit, eritrosit, trombosit ve nötrofil sayımı, otomatik hücre sayımı cihazında ölçüldü. Radyoterapi sonrası hastalarda miR-20a ve miR-106b ekspresyon seviyelerinin arttığı saptandı. Radyoterapi sonrası hastalarda PSA, fPSA, lökosit, lenfosit ve nötrofil sayıları önemli derecede azalırken, eritrosit ve trombosit sayıları arasında anlamlı bir değişiklik olmadığı bulundu. Bu değişikliklerin prostat kanserli hastaların üzerindeki etkileri daha ileri çalışmalarla açıklanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Radyoterapi, prostat kanseri, miR-20a, miR-106b, kan hücreleri

SUMMARY

Investigation of miRNA-20a and miRNA-106b expression levels in radiotherapy applications in patients with prostate cancer

In prostate cancer, radiotherapy has therapeutic effect and increase treatment efficacy and thus the survival rate. It has been showed that radiation resulted in some changes on synthesis of miRNAs and so, cellular responses in tumor cells. The aim of our study was to investigate expression levels of miR-20a and miR-106b and some hematological parameters in patients with prostate cancer, before and after radiotherapy. 35 patients who admitted to Radiation Oncology Department for prostat cancer radiotherapy were included in this study. Blood samples were obtained before and after radiotherapy. miR-20a and miR-106b expressions were analyzed by using quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PZR). Leukocyte, lymphocyte, erythrocyte, platelet and neutrophil counts were measured by automatic cell counter. We found that miR-20a and miR-106b expression levels increased in the patients after radiotherapy. We also found that erythrocyte and platelet counts did not significantly change while PSA, fPSA, leukocyte, lymphocyte and neutrophil counts significantly decreased in patients after radiation treatment. From Pearson's rank correlation analysis, we found that miR-20a expression levels positively correlated with miR-106b expression levels after radiotherapy group ($r=0.722$, $p=0.01$). The levels of fPSA correlated significantly with miR-106b expression levels before radiotherapy group ($r=-0.598$, $p=0.014$). Additionally, the leukocyte count correlated significantly with miR-20a expression levels before radiotherapy group ($r=-0.474$, $p=0.035$). Our findings showed that expression levels of some miRNAs such as miR-20a and miR-106b and hematological parameters were changed in prostate cancer patient after radiation treatment. These changes might be an important factor for cancer treatment and metastasis. Effects of these changes on prostate cancer patients must be clarified with further studies.

Key Words: Radiotherapy, Prostate cancer, miR-20 a, miR-106b, blood cells

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen kanser tiplerinden biridir. Günümüzde prostat kanserinin teşhisinde ve tedavisinde, biyokimyasal belirteçler ve prostat dokusunun histopatolojik değerlendirme sonuçları esas kullanılan parametrelerdir. İyonize radyasyon, kanser tedavisinde kullanılan ana yöntemlerden biridir. Kanser hücrelerinde, radyasyondan etkilenen bazı genler, radyoterapi sonuçları üzerinde doğrudan etkiye sahiptir. MikroRNA'lar (miRNA'lar), iç ve dış streslerle ilgili bazı süreçleri düzenleyen moleküllerdir. Tümör hücrelerinin radyasyona hücresel yanıtında miRNA'ların sentezinde bazı değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. İyonize radyasyon ile prostat kanserinin tedavisi, radyasyona duyarlı tümörlerin tedavisi ve sağ kalımın artırılmasında önemli bir yer tutar. Ancak iyonize radyasyona dirençli tümörlerde, kanserin nüks ve metastazları görülmektedir. Tümör hücrelerinde radyasyon ile ilişkili genler, tümörün radyoterapiye cevabını doğrudan etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda iyonize radyasyon maruziyetine bırakılan tümör hücrelerinin miRNA profillerinde görülen değişikliklerin çeşitli hücresel yanıtlarından kaynaklandığı ve birçok kanserin patofizyolojik mekanizmasında rol oynadığı belirtilmektedir (John-Aryankalayil M et al 2012, Runkle EA et al 2012, Zhao L et al 2012). Literatürde insan prostat kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalarda miRNA profil taramalarında değişikliklerin görülmesine rağmen insan çalışmalarının oldukça sınırlı sayıda olduğu görülmektedir (Pesta M et al 2010, Sylvestre Y et al 2007, Volinia S et al 2006). Prostat kanseri hücre hattında yapılan çalışmalarda iyonize radyasyonun hücresel yanıtlarına bağlı olarak ekspresyon düzeyleri değişen aday miRNA'lardan olan miR-20a ve miR-106b seçilerek, bu miRNA'ların iyonize radyasyon uygulamaları öncesi ve sonrası ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Tez çalışmamızda, prostat kanser tanısı konan hastalarda radyoterapi uygulaması öncesi ve sonrasında dolaşımdaki miR-20a ve miR-106b gibi miRNA'ların iyonize radyasyona yanıtlarına bağlı olarak ekspresyon düzeyleri ölçülerek uygulanan tedavinin etkinliğinin artırılması açısından hücresel süreçlerdeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PROSTAT BEZİ

Prostat, erkek vücudunda mesanenin hemen altında yerleşmiş, semen üretimiyle görevli fibroglandüler bir organdır. Yapısal olarak ön kısımda dar, arka kısımda geniştir ve içinden prostatik idrar yolu ile spermi idrar yoluna ileten kanallar geçmektedir (Netter FH, 2010). Büyüme ve gelişmesi için androjen varlığına ihtiyaç duyan prostat, ergenlik dönemiyle birlikte işlevsellik kazanır ve 25-30 yaşlarındaki yetişkin erkeklerde yaklaşık 20 gram ağırlığa ulaşır (Hammerich KH, Ayala GE, Wheeler TM 2009).

Yaşa bağlı olarak gelişen BPH, geçiş bölgesi kaynaklıdır ve nadiren adenokarsinom oluşturur (McNeal JE, 1988). Periferal bölge çok sayıda salgı keseciği bulundururken, prostatın tepe kısmı ve kapsül yakınındaki arka kısmında bulunan glandüler dokunun tamamını içerir. Bu bölgede diğer bölgelere nazaran kronik prostatitis ve postenflamatuar atrofi daha sık görülürken prostat kanserinin de gelişme ihtimalinin en fazla olduğu bölgedir (Selman SH ,2011).

Prostat daha küçük ölçekte, bölgeye göre değişen miktarlarda kanallar, salgı bezleri ve düz kas hücreleri içeren bağ dokudan oluşmaktadır. Hem kanallar hem de salgı kesecikleri, üstte lümenal sekretuar kolumnar hücre tabakası ve altta bazal hücre tabakası olmak üzere iki katlı hücre tabakasıyla çevrilidir. İyi farklılaşmış (Gleason skoru 1-2) olan prostat kanseri hücrelerinde bazal hücre tabakası yok olmakta ve sadece lümenal hücrelerce çevrelenmiş yapılar oluşmaktadır. Öte yandan normal histolojiden sık görülen sapmalar arasında olan postenflamatuar atrofi, bazal hücre hiperplazisi, iyi huylu nodüler hiperplazi, atipik adenomatöz hiperplazi benzeri durumlar biyopsi materyalinde karsinom ile karıştırılabilmektedir (McNeal JE, 1988).

2.2. PROSTAT KANSERİ

Prostat kanseri, erkeklerde dünya genelinde akciğer kanserinden sonra ikinci en sık görülen kanser tipidir. Görülme sıklığı ve ölüm oranında dünya genelinde çok büyük değişkenlik göstermesine karşın prostat kanseri vakalarının ve prostat kanserine bağlı ölümlerin yarıdan fazlası gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Buna karşın prostat kanseri etyolojisinde yegane belirlenebilmiş risk faktörleri ileri yaş,

siyahi etnik köken ve hastalığın ailedeki hikayesidir (Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E ve Forman D.2011)

Çoğunlukla birden fazla odak halinde görülen bir adenokarsinom olan prostat kanseri, ağırlıklı olarak periferik bölge (%70), daha nadir olarak da merkezi bölge (%15-20) ve geçiş bölgesi (%10-15) kaynaklıdır (Özcan F, 2000). Prostat kanseri yayılımında bölgesel lenf bezlerine lenfatik yolla metastaz, hematojen yayılımdan önce olmaktadır ve sıklıkla obturator lenf bezleri tutulmaktadır. En sık görülen hematojen yayılım ise kemik metastazları şeklindedir ve çoğunlukla pelvis, kaburgalar ve omurgaya metastaz gerçekleşmektedir. Kemik metastazları sıklıkla osteoblastik (kemik oluşturucu) olmakla birlikte, daha nadir olarak osteoklastik (kemik yıkıcı) şekilde de olabilmektedir.

Prostat kanseri hücreleri yavaş bölünen hücrelerdir. Bu nedenle hastalık uzun süre herhangi bir semptom vermeden gelişebilmekte ve bu süre zarfında metastatik hale geçebilmektedir. Oluşan semptomların büyük kısmı metastaz kaynaklı olduğundan, teşhis koyulduğunda hastaların çoğunda ileri evre metastatik prostat kanseri gelişmiş olmaktadır (İnan Y, 2006).

Günümüzde prostat kanserinin belirlenmesinde rektal muayene ve dokuya özgü bir biyokimyasal belirteç olan PSA'nın serumda miktarının tayini yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Prostat tümörleri sıklıkla prostatın periferik bölgesinden kaynaklanmaktadır ve rektal muayene ile normal prostat dokusu dışındaki oluşumların belirlenebilmesi mümkündür. Ancak tek başına rektal muayene sonucu tümör varlığını kesin olarak ortaya koyamayacağı gibi, herhangi bir oluşumun belirlenmemesi de kanser gelişmediği anlamına gelmemektedir. Öte yandan semenin sıvılaşmasını sağlamakla görevli bir proteaz olan PSA, prostata özgü bir molekül olduğu halde prostat kanserine özgü değildir. Tümör varlığında artmış miktarda kana salınan PSA; çoğunlukla prostat hücrelerinin sayıca anormal artışı (hiperplazi) olarak kendini gösteren BPH, prostat biyopsisi ve uzun süre yatalak kalma gibi durumlarda da yine artmış miktarda kana salılabilmektedir. Buna karşın prostat kanserli hastaların %30- 40'ında normal seviyelerde de bulunabilmektedir. Değerlendirme açısından önemli olan bu yöntemler hastalığın tanısında yetersiz kaldığından prostat kanserinde kesin tanı, girişimsel bir yöntem olan transrektal ultrason eşliğinde alınan iğne biyopsisi ile konmaktadır. Prostat

kanseri için biyopsi yapmadan kesin tanı koyabilecek yeterli bir radyolojik yöntem bulunmamaktadır (Coen JJ,ve Dahl DM 2007).

Tümörün davranışını belirlemede en önemli kriterler tümör büyüklüğü ve hücrelerin farklılaşma dereceleridir (Özcan F, 2000). Histolojik olarak prostat kanseri hücrelerinin farklılaşma derecelerinin sınıflandırılmasında Gleason Sistemi kullanılmaktadır. Prostat kanserinin evrelemesi; Gleason skoru, rektal muayene sonucu ve PSA'nın serumdaki konsantrasyonu göz önünde bulundurulup, sıklıkla TNM sınıflama sistemi kullanılarak yapılmaktadır (Coen JJ et al 2007). Bu sistemde primer tümörün durumu (T), lenf nodlarına yayılım olup olmadığı (N) ve metastaz durumu (M) kriterleri esas alınarak sınıflama yapılmaktadır.

2.3. PROSTAT KANSERİ TEDAVISİNDE RADYOTERAPİ DOZ DEĞERLERİ

Radyoterapi hastaya dıştan ve içten olmak üzere iki şekilde verilebilir bu hastalığın ne kadar ileri boyuta taşındığı ile alakalı seçilecek bir yöntem olarak hekim tarafından karar verilir.

Bugün ülkemizde 45 i aşkın radyoterapi uygulama merkezi vardır ve hastalar sadece bu merkezlerde radyoterapiye kabul edilmektedirler

Normal seyirde kanser hücreleri büyürler ve bölünürler daha sonra komşu organlara sıçrama yaparak hastanın yaşam süresini çok daha kısa hale getirirler dolayısı ile radyoterapide ana amaç mevcut kanser hücrelerine verilen ışın ile hücrelerin bölünmesini ve büyümesini engelleyerek kanserin seyrini yavaşlatmak yada tamamen durdurmaştır. Ayrıca radyoterapide ki ışın tedavisi hastanın tüm vücuduna değil sadece kanserli bölgeye yapılan ışınlama ile tedavi edilmektedir. Normal şartlarda radyoterapi hastaya bölgedeki kanser hücrelerini küçültmek yada yok etmek amaçlı verilirken hastaya uygulanana cerrahi müdahale sonrasında kanserli bölgede gizlenmiş olan ve yeniden büyüme seyrinin devam etmesi muhtemel olan bölgeye tekrar radyoterapi verilebilmektedir.

Radyoterapi günümüzde neredeyse tüm kanser türlerinin tedavisinde kullanılan en yaygın tedavi türlerinden birisidir.

Radyoterapide çoğu hastaya genellikle 1,5-2 aylık tedavi dönemi içinde toplam

6000-7000 cGy (santigrey) ışın dozu bölünerek (fraksiyon) verilmesi planlanmaktadır. Radyasyon dozu; hastanın yaşı, kanser kitle derecesi ve büyüklüğü, kanserin radyasyona duyarlılığı, normal doku ve hastanın radyoterapiye toleransı, ışınlanan bölgenin büyüklüğü, radyoterapi sonrası hastanın iyilik durumu gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Prostat kanseri radyasyon tedavisinde dikkat edilmesi gereken en önemli unsur kanserli hücrelerin yoğunlukla bulunduğu organa komşu olan diğer organların bu uygulamadan minimum zararla ayrılmasıdır. Bunun için radyasyon dozu ciddi önem taşımaktadır.

Prostat kanseri tedavisinde risk altında kanserli hücreye yada organa komşu olan organların 50/5 oranı içinde doz limitleri doz hacim grafiği değerlendirilmesiyle yapılmaktadır.

Hastaya uygulanan doz normal doku toleransı ile sınırlandırılır. Brakiterapi sınırlı büyüklükteki bölgeye uygulanır. Kaynaktan uzaklaştıkça dozun hızla düşmesi nedeniyle normal dokular daha iyi korunmuş olur.

2.4.TEŞHİS VE TEDAVİDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Prostat kanseri tanısında; biyokimyasal tümör belirteçlerinden Prostat Spesifik Antijen (PSA) ve bazı büyüme faktörleri (İnsülin benzeri büyüme faktörü, İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3) değerleri, Transrektal ultrasonografi (TRUS), biyopsi ve histopatolojik değerlendirme sonucu, lenf nodu biyopsisi ve histopatolojik değerlendirme sonucu, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme ve kemik sintigrafisi değerlendirmeleri önemli rol oynar.

2.4.1.Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi (YART):

Üç boyutlu konformal radyoterapinin gelişmesi ile YART tedavi teknikleri bulunmuştur. Hedeflenen hacme istenilen dozu YART tekniği ile vermek için, her bir ışının doğrultusuna farklı yoğunluklarda birçok küçük alan (segment) uygulaması ile yapılır. Böylece oluşan doz dağılımının konvansiyonel tedavilerden en önemli farkı çevre kritik organların daha iyi korunabilmesidir. Bu nedenle YART hedef hacimde daha yüksek dozlara çıkabilme imkanı sağlar.

Ayrıca eş zamanlı olarak farklı hedef hacimlere farklı tedavi dozları uygulanabilir (Chao 2005)

YART, 3BKRT'nin gelişmiş bir şeklidir. Hedeflenen hacime istenilen dozu vermek için, uygulanan ışın doğrultusunda, farklı yoğunluklarda bir çok küçük alan kullanılır.

Her tedavi alanındaki ışın yoğunluğunun değiştirilmesi ilkesine dayanan YART tekniği, konvansiyonel ve 3BKRT teknikleri ile karşılaştırıldığında, hem hedef bölgede daha yüksek doz dağılımı hem de normal ve riskli dokularda daha düşük doz sağlayabilir.

ART'deki bu dozimetrik avantaj tümör kontrolü üzerine olumsuz etkisi olmaksızın normal dokuları anlamlı şekilde koruyarak normal dokulardaki geç yan etkiyi azaltmaktadır.

2.4.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA)

Prostat spesifik antijen, prostat kanserine değil organa özgül bir belirteçtir. Prostat kanseri dışında birçok faktör serum PSA seviyesini değiştirebildiği için özgüllüğü düşüktür. Benign prostat hipertrofisi (BPH), prostatit, prostat manüplasyonları ve ürolojik girişimler de PSA seviyesinde artışa neden olabilir.

Uzmanların ortak görüşü (PSA) Prostat kanseri için kullanılan en iyi yöntemlerden birisidir.

PSA için standart referans aralık genellikle 0-4 ng/ml'dir. Ancak 18.882 kişinin katılımıyla gerçekleştirilen Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT) verilerine göre önemli bir oranda prostat kanserinin bu normal PSA aralığında olduğu dikkat çekmektedir. Çalışmada 4 ng/ml altında PSA değeri olan, parmakla rektal muayenesinde normal bulgular saptanan kişilere yapılan biyopsilerde PSA \leq 0.5 ng/ml olanların % 6.6'sında, 0.6-1.0 ng/ml olanların % 10.1'inde, 1.1-2.0 ng/ml olanların % 17.0'sinde, 2.1-3.0 ng/ml olanların % 23.9'unda ve 3.1-4.0 ng/ml olanların % 26.9'unda prostat kanseri tespit edilmiştir (cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_8556/6-11.pdf. Erişim Tarihi: 26.10.2018).

Kanserli tümör için en önemli yöntemlerden ve belirteçlerden biri olan PSA ,nın dezavantajları da mevcuttur TRUS'da olduğu gibi hastaya ciddi derecede rahatsızlık vermeyen PSA'nın klinik düzeyde spesivite ve sensivite açısından zayıf olduğunu uzmanlar belirtmektedir. Ayrıca PSA, prostat kanseri için çok

yüksek pozitif prediktif değere sahip olmasına rağmen, PSA testi benign ve malign tümörleri ayırtmadığı için prostat kanseri taramalarında parmakla rektal muayenesi (PRM) yapılmadan PSA testi tek başına kullanılmamaktadır.

PSA olarak kısaltılan Prostat Spesifik Antijen, prostat hücrelerinin sitoplazmalarında salgılanan 33.000 molekül ağırlığında bir glikoproteindir.

Prostat kanserinde genelde PSA seviyesi çok yüksektir ancak bu oran sadece prostat kanserinde değil ince bağırsak ve mesane enfeksiyonlarında da aynı şekilde yüksektir bilindiği gibi mesane, ince bağırsak vb organların enfeksiyonel hastalıkları da prostat kanserinde olduğu gibi benzer belirtiler vermektedir. PSA değerleri, kapsül dışına penetrasyon olup olmadığına bakılmaksızın, her bir gram intrakapsüler kanser için genelde ortalama 3.5 ng/ml yükselmektedir. BPH' de ise PSA yükselmesi transizyonel zonun boyutu ile orantılı olarak değişmektedir. Bir gram BPH' nin PSA' yı yaklaşık olarak 0.3 ng/ml yükselmektedir (Tanagho EA, Mcaninch JW, 1999).

2.4.3.Radyonüklid Kemik Sintigrafisi

Nükleer tıp'ın alanine giren Radyonüklid kemik sintigrafisi kemik metastazlarının, özellikle de osteoblastik metastazların saptanmasında yaygın olarak kullanılan oldukça duyarlı bir görüntüleme yöntemidir. Hastaya damar yolundan verilen radyoaktif maddenin vucuda girmesinden sonra gamma kamera denilen görüntüleme yöntemi ile hastanın vücudunda bulunan patolojik lezyonları gösterir.

Radyonüklid kemik sintigrafisinin avantajlarından en büyüğü kanserin iyicil yada kötücül oluşunu göstermesi ve ne kadar yaygın bir halde olduğunu göstermesidir.

Prostat kanserinde evreleme ve hastalığın takibinde kullanılan kemik sintigrafisi aynı zamanda tedavi yanıtının belirlenmesinde kullanılabilir. Ancak, hormonoterapi/kemoterapi sonrası iyileşmekte olan tümör alanlarındaki inflamatuvar yanıtı bağılı olarak tedavi öncesi sintigrafide saptanan metastaz odaklarının sayısı ve intensitesinde artış izlenebilir. Bu durum flare fenomeni olarak adlandırılır.

Metastatik hastalığın progresyonu ile medikal tedaviye olumlu cevabın göstergesi olan flare fenomeninin ayırıcı tanısı için tedavi bitiminden 6 ay sonra kemik sintigrafisinin tekrarlanması önerilir. Tekrarlanan sintigrafide flare fenomeninde

metastatik odakların sayı ve intensitesinde azalma, metastatik hastalığın progresyonunda ise artma beklenir.

2.4.4. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) çok güçlü bir mıknatıs ve radyo dalgaları kullanılarak görüntü elde edilmesini sağlayan ve iyonizan radyasyon içermeyen kesitsel bir radyolojik inceleme yöntemidir. Hasta sabit bir manyetik alan içine yerleştirildiğinde vücuttaki protonlar mıknatısın vektörü doğrultusunda paralel ve antiparalel dizilim göstererek dönüş (spin) yapar. Daha sonra radyo dalgaları gönderilerek dokulardaki hidrojen atomlarında sapmalar sağlanır. Radyo dalgaları kesildiğinde ise protonlar mıknatıs doğrultusundaki eski konumlarına tekrar geri döner ve dönerken aldığı enerjiyi geri verir (https://www.researchgate.net/.../228939362_MANYETIK_REZONANS_GORUNTULEME. Erişim Tarihi: 26.10.2018) .

Kanser tespitinde kullanılan en sık görüntüleme yöntemlerinden biri olan MRG'nin en büyük avantajlarından birisi Yüksek kontrast rezolüsyonuna sahip olması ve iyonizan radyasyon içermemesidir. Radyolojik tanı yöntemleri arasında Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) hastalığın evrelemesinde, lokal yayılım ve lenf bezi metastazlarının belirlenmesinde önemli bir role sahiptir. Prostat kanserinin saptanmasında, mevcut MRG görüntüleme yöntemleri arasında en iyisi ise dinamik kontrastlı MRG, difüzyon ağırlık görüntüleme ve manyetik rezonans spektroskopisi gibi fonksiyonel sekansları içeren multiparametrik MRG'dir (Mp-MRG). Bu yöntemler ile lezyon boyut, genişlik, kontrastlanma özellikleri, görünür difüzyon katsayısı değerleri ile biyolojik içeriği konusunda bilgi elde edilmesi ve hastalıkta bazı risk sınıflandırmaları yapılması mümkündür. Ayrıca Mp-MRG, diğer görüntüleme teknikleri ile karşılaştırıldığında, daha üstün bir görüntüleme yöntemidir. Üç boyutlu görüntüleme ve artmış kontrast çözünürlüğü sayesinde prostat bezinin en iyi anatomik görüntülemesini sağlar (cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_10459/136-143.pdf. Erişim Tarihi: 26.10.2018).

2.4.5. Ultrasonografi (USG)

Ultrasonografinin prostat kontrolünde ki en büyük avantajı ise hastaya hiçbir şekilde zarar vermemesi ve rahatsız etmemesidir ayrıca iyonize radyasyon içermemeside en büyük avantajlarından birisidir. Transabdominal ultrason işleminde prostatın boyutu, ağırlığı ve anatomik şekli belirlenir. Transrektal ultrason işleminde bunların yanı sıra prostatın doku detayları da değerlendirilmektedir.

Prostat biyopsisi almak ve lokal olarak evrelemek için bilgi sağlamada kullanılan en önemli yöntemlerde biri transrektal ultrasonografidir (TRUS). Parmakla rektal muayene (PRM) ve Prostat Spesifik Antijen (PSA) ile beraber kullanımına başlanan TRUS sayesinde yapılan ince iğne biyopsisi, prostat kanserini tanılamada ve hangi tedavi yönteminin kullanılabilceğinde bize kolaylık sağlamıştır.

2.4.6. Biyopsi Materyalinin Histopatolojik İncelenmesi

Prostat kanserinin histopatolojik tanısı, ultrasonografi eşliğinde transrektal veya transperineal ile alınan prostat doku biyopsi materyeli ile konulmaktadır. Prostat adenokarsinom tanısında en yaygın kullanılan derecelendirme sistemi, glandüler yapıların diferansiyasyon derecesinin 1 ile 5 arasında değerlendirildiği Gleason derecelendirme sistemi yer alır. Gleason skoru da prostat kanserinin histolojik değerlendirilmesinde en yaygın (primer) ve ikinci en yaygın (sekonder) paternin derecelerinin toplanmasıyla hesaplanır. Gleason skoru, prostat kanseri biyolojisinin ve agresifliğinin temel göstergesidir ve lokalize prostat kanseri tedavisinin planlanması ve prognozunun belirlenmesinde rol alır (Şahinkanat T, Küçükdurmaz F, Efe E, Koluş E, Ekerbiçer HÇ, Bitiren M, 2017).

2.5. RADYOTERAPİNİN ÖNEMİ VE GÜVENCESİ

Radyoterapinin prostat kanserinin tedavisinde ki yeri çok önemlidir ve son derece başarılı yöntemlerden biridir, kanserin ilerleyen safhalarında prostatın dışına taşması durumunda cerrahi yöntem kullanılmadan çok başarılı sonuçlar elde etmek mümkündür günümüzde radyoterapi yöntemlerini 3 ana grup altında sıralanmaktadır.

- İnternal, hastanın vücuduna verilen radyoizotop sıvılarla yapılan yöntem
- Eksternal, yani uzak mesafeden yapılan ışınlama yöntemi
- Brakiterapi, yakın mesafeden yapılan ışınlama yöntemi

İnternal Yöntemi: Bu yöntem hastanın damar yolundan hastaya enjekte edilen radyoaktif sıvının hastanın kanserli organının üzerinde ve çevresinde toplanması ve o sıvıya karşı verilen ışınlamadır.

Eksternal yöntemi: Daha çok radyoterapide kullanılan bu yöntem uzak mesafe ışınlaması olarak bilinmektedir hasta ile ışınlama arasında ortalama 80 ile 100 cm lik bir uzaklık bulunması gerekir

Brakiterapi: Yakın mesafe ışınlaması adı verilen bu yöntem Radyoaktif kaynakların veya kaynak taşıyıcı aygıtların vücuda ya da tümör dokusuna temas olacak şekilde uygulanan bir yöntemdir.

Radyoterapinin esas amacı kanserli hücreyi çevreleyen sağlıklı dokuya zarar vermemektir bu yüzden doğrusal ışın veren radyoterapi direk kanserli hücreye tümöre ışınlanarak tümörün yok olmasını, kanserin seyrinin bitmesini ve komşu organlara sıçramasını engellemesi açısından günümüzde prostat kanseri içinde özellikle erken teşhiste en yaygın kullanılan tedavi yöntemidir.

2.6. PROSTAT KANSERİNDE MOLEKÜLER MEKANİZMALAR

AR'nin prostat kanserindeki öneminin anlaşılmasıyla hastalıkla ilgili moleküler mekanizmalar araştırılmaya başlanmış fakat tümör oluşumlarının klonal özellik göstermemesi ve prostat kanserinin çok odaklı doğası sebebiyle başlangıç, ilerleme ve yayılımla ilgili moleküler işleyiş tam anlamıyla aydınlatılamamıştır (Abate-Shen C ve Shen MM 2000).

Yaşlanmayla kuvvetli bir şekilde ilişkili olan ve nadiren 40 yaştan önce görülen prostat kanserlerinin yaklaşık %85'i sporadik tipte iken yaklaşık %15'lik kısmı herediter tiptedir ve genellikle erken yaşta ortaya çıkan hastalıkla ilişkilidir (Abate-Shen C et al 2000). Aralarında HPC1/RNASEL, HPC2/ELAC2, MSR1 ve HPCX genlerinin de bulunduğu pek çok gen ailesel yatkınlıkla ilişkilendirilmiş fakat sonraki çalışmalarla bu ilişkilerin çoğu desteklenemediğinden etkili olabilecek aday genler net olarak belirlenememiştir (Bunz F. *Principles of Cancer Genetics*. NY: Springer Science and Business Media; 2008). 1q24-25 kromozom

bölgesi yerleşimli herediter prostat kanseri (HPC1) gen bölgesi, prostat kanserine ailesel yatkınlıkla ilişkilendirilmiş ilk gen bölgesi olup (Cai X, Hagedom CH ve Cullen BR.,2004), sonraki çalışmalarda anti-viral ve pro-apoptotik bir enzim olan ribonükleaz L'nin (RNase-L) HPC1 gen bölgesini kapsadığı belirlenmiştir (Malathi K, Paranjape JM, Ganapathi R ve Silverman RH 2004). Ribonükleaz L geni (RNASEL) viral enfeksiyona karşı interferon tarafından uyarılan, viral ve hücreli kökenli tek zincirli RNA'nın yıkımından sorumlu bir endoribonükleaz kodlamaktadır (Liang SL, Quirk D ve Zhou A. 2006).

Öte yandan yetişkinlerde görülen kanser tiplerinin yaklaşık %20'sinin kronik enflamasyon bölgelerinde meydana geliyor olması, prostat kanserinin de enflamasyonla ilişkili olabileceği düşüncesini doğurmuştur (Shen MM ve Abate-Shen C. 2004). İmmün cevap dahilinde prostat epitelinde enflamatuvar hücre kaynaklı tekrar eden oksidatif veya nitrozatif hasarlar ile epitel hücrelerin çoğalmaları sonucu meydana gelen "proliferatif enflamatuvar atrofi" (PIA) olarak adlandırılan morfolojik değişimlere sahip bölgeler ile prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) bölgeleri arasında bir geçiş olabileceği ve PIA ile prostat kanserinin bazı ortak moleküler yollara sahip oldukları gösterilmiştir. Prostat kanserinde enflamasyonla ilişkili olarak en dikkat çeken moleküllerden biri olan ve sitokinler, büyüme faktörleri, mitojenler ve tümör promotörleri tarafından uyarılan proenflamatuvar bir enzim olan siklooksijenaz-2'nin prostat kanserinde yüksek miktarda ifade edildiği belirlenmiştir (Correa JJ, 2010).

Yine hücre dışı etkenlere bağlı olarak gelişen oksidatif stres ile ilgili yapılan çalışmalarda da başlıca antioksidan enzimlerin prostat kanseri ve PIN'de azaldığı gösterilmiştir (Correa JJ ve Pow-Sang J ,2010). En çok üzerinde durulan genlerden, karsinojen detoksifiye edici olarak rol alan bir enzimi kodlayan "glutasyon S-transferaz pi 1" geninin CpG adacıklarındaki hipermetilasyon ile ifadesinin engellendiği bazı prostat kanserlerinde gösterilmiştir.

5 α -redüktaz enziminin farklı dokularda düşük seviyelerde bulunan 5 α -redüktaz- 1 ile deri ve prostatın androjene duyarlı hücrelerinde bulunan 5 α -redüktaz-2 olmak üzere iki izoenzimi bilinmektedir. 5 α -redüktaz-2 enzimi SRD5A2 geni tarafından kodlanmakta ve testosteronu daha aktif formu olan DHT'ye dönüştürmektedir. SRD5A2 geninde görülen A49T (49. kodonda alaninin terionine dönüşümü)

polimorfizmi, enzim miktarını 5 kat arttırmaktadır. Bunun sonucu olarak yüksek serum testosteron seviyesine sahip topluluklarda prostat kanseri riskini arttırmanın yanı sıra kötü prognozla da ilişkili bulunmuştur. Öte yandan 5 α -redüktaz yoksunluğu olan erkekler prostat kanseri geliştirmezler ve ergenlikte veya erken yetişkinlikten önce kastre olmuş erkeklerde prostat kanseri nadirdir (Correa JJ ve Pow-Sang J 2010).

Prostat kanserinde 8p, 10q, 13q ve 17p kromozomlarında heterozigotluk kaybı sık görülür. Ayrıca kromozom kazanımları, kromozom kayıplarından daha az görülmektedir. Prostat karsinogenezinde allelik kaybın önemine karşın, kanser ilerleyişinde belirli bir aday tümör baskılayıcı gen nihai olarak belirlenememiştir. Prostat karsinogenezinin erken döneminde en sık rastlanan olaylardan biri, kromozom 8p'deki spesifik bölgelerin kaybıdır ki prostat tümörlerinde yaklaşık %85 oranında heterozigotluk kaybı görüldüğü gibi kolorektal ve akciğer karsinomlarında da görülmektedir. Bir çok çalışma NKX3.1 genini 8p12-21 bölgesinde aday gen olarak desteklemektedir. Bununla birlikte prostat kanserinde NKX3.1 mutasyonları belirlenememiştir ve genin mutasyonundan ziyade ifadesinin azaldığı düşünülmektedir. 10q bölgesi kaybı sık rastlanan bir olaydır. Bu bölgedeki aday genler arasında olan ve tümör baskılayıcı bir gen olan PTEN; glioblastoma, meme ve endometrial kanserlerde de kaybı görülen 10q23 bölgesinde bulunur fakat prostat kanseriyle ilgili elde edilen sonuçlar birbirleriyle çelişkilidir (Shen MM et al 2010).

Prostat kanseri ilerlemesinde kromatin modifikasyonları da önemlidir. Prostat kanseri ile ilişkili ana modifikasyonlardan biri, ilerlemiş hastalık ve metastazın onkojenik bileşenlerinden biri olan histon metil transferaz enzimi Ezh2 tarafından histon H3'ün 27. lizininin üçlü metilasyonudur (H3K27me3). H3K27me3 varlığı, ifade baskılanması ile ilişkili olduğu için bunun miktarının prostat kanserinde artması, Ras GTPaz ailesinin bir üyesi olan DAB2IP gibi tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasıyla ilişkilidir (Abate-Shen C et al 2000).

Prostat kanserlerinin büyük çoğunluğunda ETS ailesinden transkripsiyon faktörlerinin (ERG, ETV1 ve ETV4) aktivasyonlarına sebep olan yeniden düzenlemeler belirlenmiştir. Bu yeniden düzenlemelerden en sık görüleni TMPRSS2-ERG füzyon genidir. Bu yeniden düzenlenme N-terminal ucu

budanmış ERG proteininin, TMPRSS2 geninin androjene cevap veren promotorunun kontrolü altına girmesiyle sonuçlanır. Lokalize prostat kanserlerinin yaklaşık %50'sinde bulunmuştur. Yapılan çalışmalarla androjene duyarlı LNPCa hücrelerinde AR bağlanmasının DNA hasarından sonra TMPRSS2-ERG füzyonlarını mümkün kılacak şekilde TMPRSS2 ve ERG gen bölgelerini birbirlerine yaklaştırdığı belirlenmiştir ancak bu füzyon geninin prostat kanserindeki önemi tam olarak anlaşılmış değildir (Shen MM ve Abate-Shen C 2010).

Yetişkin erkek prostatında iki tip östrojen reseptörü (ER) ifade edilir: ER- α ve ER- β . ER- β daha çok bazal epitelde görülürken ER- α esasen stromal bölümde bulunur. Ayrıca androjenlerin östrojene dönüşümünde rol oynayan aromataz enzimi de prostat stromasında ifade edilir. Erkekler yaşlandıkça androjenin östrojene olan oranı azalır. Östrojen seviyeleri sabit kalırken testosteron seviyeleri azalır. Bu olay östrojenlerin prostat kanserinde etkili olabileceğine işaret eder. Hayvan modellerinde testosteron ve östrojenin bir arada verilmesinin yüksek oranda adenokarsinom oluşumu ile sonuçlandığı gözlemlenmiştir (Correa JJ ve Pow-Sang J 2010).

AR, gen ifadesinin ligandla uyarılabilen düzenleyicileri olan nükleer hormon reseptörleri süper-ailesinin bir parçasıdır. Kodlayan gen, X kromozomunun uzun kolunda yer alır. Ligandla aktive olan bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gösterir ve hem normal hem de anormal prostat gelişiminde etkili olan sinyal yollarında yer alan genlerin ifade edilmelerini de tetikler.

2.7. PROSTAT KANSERİNDE TÜMÖR BELİRTECİ OLARAK ÖNE ÇIKAN BİYOMOLEKÜLLER

Kanser tanısı ve tedavi takibinde girişimsel olmayan yöntemler olan, vücut sıvılarından tümör biyobelirteçlerinin tayini gün geçtikçe daha fazla önem kazanan güncel bir konudur. Prostat kanserinde de gerek hastalığın takibi, gerekse erken tanının hayatta kalım üzerindeki belirgin etkisi sebebiyle tanı aşamasında biyobelirteçler kullanılmakta ve araştırılmaktadır.

1930'larda metastatik prostat kanserli hastalarda serum prostatik asit fosfataz (PAP) seviyelerinin yüksek bulunmasıyla hastalık seyrinde bir klinik belirteç

olarak uzun süre araştırılmış, 1980'lerde ise yerini prostat spesifik antijene (PSA) bırakmıştır (Prensner JR, Rubin MA, Wei JT ve Chinnaiyan AM .,2012)

2.7.1. Prostat Spesifik Antijen

Doku kallikrein ailesinin bir üyesi olan PSA, kromozom 19q13.4 yerleşimli bir gen olan kallikrein 3 (KLK3) geni tarafından kodlanan, 33 kDa moleküler ağırlığında, 240 aminoasitlik, prostata özgü bir glikoproteindir (Nelson PS et al 1999). PSA ifadesi androjenlerce pozitif yönde düzenlenir ve dolaşıma katılan androjen seviyeleriyle serum PSA seviyeleri arasında belirgin bir korelasyon vardır (Balk SP, Ko YJ and Bublely GJ 2003).

PSA, prostatta bulunan salgı kesecikleri ve kanallardaki sekretuar epitel hücrelerce üretilir. PSA transkripsiyon başlangıç bölgesinin 156-170 baz çifti uzağındaki ARE'ye AR homodimerinin bağlanmasıyla PSA öncül peptidi olan pre- proPSA oluşturulur ve bunun proteolitik kesimi sonucu meydana gelen proPSA inaktif bir proenzim olarak prostatik kanallara salınır. proPSA'nın N-terminal bölgesinden 7 aminoasidin ayrılmasıyla aktif hale geçen olgun PSA seminal sıvıda 0,5- 2,0 ng/ml konsantrasyonlarda bulunur ve semendeki temel protein yapıyı oluşturur. PSA, yüksek substrat özgüllüğü gösteren bir serin proteazdır ve seminal pıhtıdaki jelleştirici etkiye sahip semenogelin 1 ve 2'leri ayırarak semenin sıvılaştırılmasını sağlar (Balk SP et al 2003). Normal koşullarda PSA kanda düşük seviyelerde bulunmaktadır. Prostat kanserinde erken bir olay olan bazal hücre tabakası ve bazal membranın parçalanmaya başlamasıyla PSA'nın periferel dolaşıma geçişi artar (Bostwick DG, 1994). Bu nedenle prostat biyopsisi uygulaması için minimum eşik değer 4 ng/ml olarak belirlenmiş olup daha yüksek serum PSA değerleri kişide tümör varlığı şüphesi uyandırmaktadır.

Hassas bir biyobelirteç olan PSA, prostat dokusuna özgül olduğu halde prostat kanserine özgül değildir. BPH, prostat enfeksiyonu ve travma gibi tümörden bağımsız sebeplerle de artabilen kandaki PSA seviyesi, 50 yaşını geçmiş erkeklerin yarısından fazlasında BPH geliştiği de göz önüne alındığında yaş ve benzeri fiziksel etmenlere bağlı olarak da değişkenlik (Laxman B Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R 2008). Bununla birlikte PSA, özgüllüğü düşük fakat hassas bir molekül olmasına karşın, bir biyobelirteç olarak

tek başına yeterli değildir. Organla sınırlı hastalığı olan erkeklerin bir kısmında serum PSA değerleri 4 ng/ml'den düşük olabilmekte ve hastalık bu yolla belirlenemeyebilmektedir (Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL et al2004).

2.8. KODLAMA YAPMAYAN RNA'LAR

2.8.1. Prostat Kanseri Antijeni 3

İlk olarak 1999 yılında kanserli ve kanserli olmayan dokular arasındaki farklılıkların gösterilmesi sonucu bulunan ve uzun süredir prostat kanseri biyobelirteci olarak gündemde olan PCA3, vücut sıvılarından belirlenebilen, prostat dokusuna özgü bir uzun kodlama yapmayan RNA'dır (lncRNA) (Day JR, Jost M, Reynolds MA, Groskopf J and Rittenhouse H. 2011).

lncRNA'lar 200 nükleotitten 100 kilobaza kadar değişik uzunluklarda olabilen, protein kodlamayan RNA'lardır ve genellikle mesajcı RNA (mRNA)'lar gibi RNA polimeraz 2 tarafından okunurlar ancak yazılım sonrasında mRNA'lardan farklı olarak çok adımlı işlemlerden geçirilmeden direkt olarak işlev gösterebilmektedirler. lncRNA'ların çoğu poliadenilasyon kuyruğu içermektedir (Gibb EA, Brown CJ and Lam WL. 2011).

İlk belirlenen lncRNA'lardan olan X inaktif spesifik transkript'in (XIST)' X kromozomu sessizleştirilmesinde kilit rol oynadığının belirlenmesi, lncRNA'ların önemli hücresel işlevlerden sorumlu olduklarını göstermiştir (Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R 1991). lncRNA'lar hücrede; transkripsiyonel baskılama, kromatin yeniden modellenmesi ve histon modifikasyonlarının başlatılması, protein aktivitelerinin ve yerleşimlerinin düzenlenmesi, daha küçük RNA'ların öncüllüğü gibi çok çeşitli işlevler gösterebilmektedirler ve işlevlerinde meydana gelen bozulmalar kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Gibb EA et al 2011).

lncRNA'lar uzun nükleotit dizilerinden oluştuğu için hedefleri de son derece özgüdür ve bu nedenle çok hassas bir şekilde işlev gösterebilmektedirler. Transkripsiyon bölgesine RNA-DNA polimeraz 2 kompleksi aracılığıyla bağlanmaktadır ve 3' uçları kompleksin lokusa yaklaşmasını sağlarken, 5' uçları kromatin komplekslerine bağlanmak üzere açıkta olabilir. lncRNA'lar

transkripsiyonun düzenlenmesinde iki farklı şekilde işlev gösterebilmektedirler: Aynı kromozom üzerinde, sentezlendikleri bölgeye yakın bir veya birkaç gen üzerinde etkili olabilirler veya sentezlendikleri bölgeden yayılarak uzak genlerde, hatta farklı kromozomlar üzerindeki genlerde etki gösterebilirler (Lee JT, 2012).

lncRNA'lar farklı dokulara özgü olabildikleri gibi hastalık varlığında değişik ifade seviyeleri de gösterebilmekte ve vücut sıvılarında belirlenebilmektedir. Bu nedenle kanser tanısında ve tedavi takibinde biyobelirteç adayları olarak öne çıkmaktadırlar. MALAT1 gibi prostat kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser tipinde ifade seviyesi artan lncRNA'lar olduğu gibi tek bir kanser tipine özgü olan lncRNA'lar da bulunmaktadır. Kanser tipine özgü lncRNA'lardan; prostat kanseri kodlamayan RNA 1 (PCNCR1), prostat spesifik gen 1 (PCGEM1) ve PCA3 sadece prostat kanseriyle ilişkilendirilmiş olup; PCNCR1'in AR transaktivasyonunda ve prostat kanserinin ilerlemesinde kilit bir role sahip olduğu, PCGEM1'in ise tümör oluşumunu desteklediği belirlenmiştir (Gibb EA et al 2011). Buna karşın PCA3 prostat kanserinde yüksek seviyede ifade edilirken, biyolojik fonksiyonu bilinmemektedir ve homoloji gösterdiği bir gen belirlenmemiştir (De Kok JB, 2002).

PCA3 androjen uyarımına yanıt veren bir molekül olup, androjene duyarlı prostat kanseri hücre soylarında duyarlı olmayanlara göre daha yüksek düzeydedir. Androjen uyarımıyla miktarında görülen artışın mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. PCA3 molekülüne ait ARE bölgeleri tanımlanamamıştır. PCA3 geni kromozom 9q21-22'de bulunmaktadır ve prune homolog 2 (PRUNE2) geninin 6. intronunda ters yönde kodlanmaktadır. PRUNE2 geni hücrel çoğalmada, hücre ölümünde ve hücrel dönüşümde etkiliyken, genin ifadesinin DHT ile tetiklenebildiğini ve prostat kanserinde ifade seviyesinin arttığını gösteren çalışmalar olmasına karşın bu sonuçları desteklemeyen çalışmalar da mevcuttur. 4 ekzon içeren ve 4. ekzonunda 3 farklı noktadan poli-A kuyruk eklenebilen PCA3 geninin oldukça karmaşık olduğu belirlenmiştir; alternatif varyantları daha nadir görülmesine karşın yeni çalışmalarla 4 farklı transkripsiyon başlangıç bölgesi, 2 farklı kırılan ekzon bölgesi ve 4 yeni poliadenilasyon bölgesi bulundurduğu gösterilmiştir (Ferreira LB, 2012). Prostat dokusuna özgü olan PCA3'ün miktarı normal koşullarda çok düşük bir seviyededir ve sadece

prostat kanseri varlığında artmaktadır. Hastaların %90'ından fazlasında bu artış belirlenebilmekteyken, BPH ve enflamasyon varlığından herhangi bir artış meydana gelmemektedir.Öte yandan belirlenen PCA3 miktarları ile tümör evresi ve hastalığın agresifliği arasında bir korelasyon belirlenmemiştir (Auprich M, Bjartell A, Chun FKH, de la Taille A, Freedland SJ, Haese A et al ,2011). Bunun yanı sıra iyi, orta ve az farklılaşmış tümörlerin tamamında yüksek seviyelerde belirlenmesi, PCA3 ifade seviyesinin artışının prostat kanserinin erken evrelerinde gelişen bir olay olduğuna işaret etmektedir (Ferreira LB, Palumbo A, de Mello KD, Sternberg C, Caetano MS, de Oliveira FL et al,2012).

2.8.2. mikroRNA'lar

Doku özgüllükleri, kanser varlığında ifade seviyelerinin değişmesi ve kanda yüksek derecede stabil kalmaları sebebiyle mikroRNA'lar (miRNA'lar) girişimsel olmayan güncel biyobelirteç adayları olarak ön plana çıkmaktadır. miRNA'lar mesajcı RNA'lardan daha kararlı yapıda olup vücut sıvılarındaki ribonükleazlara ve farklı fiziksel koşullara karşı dayanıklıdırlar. Prostat kanseriyle ilgili yapılan çalışmalar sonucunda pek çok aday miRNA belirlenmiş, bir kısmının ifade seviyelerindeki değişimler vücut sıvılarında gösterilebilmiştir. Özellikle miR-141 ve miR-375 ile ilgili dikkate değer bulgular elde edilmiştir. Yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan kısa RNA dizileri olan mikroRNA'lar çoğalma, farklılaşma, hücre döngüsü ve apoptoz gibi pek çok önemli hücrel olayda görev almaktadırlar. Özgül hedefleri olan mRNA'lara (mRNA) bağlanıp bu mRNA'ların okunmalarını engelleyerek, gen ifadesinin transkripsiyon sonrasında kontrol edilmesini sağlamaktadırlar. İnsan genomundaki gen ifadelerinin yaklaşık %30'unun miRNA'lar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir ve kanser de dahil olmak üzere pek çok hastalıkla ilişkilendirilmişlerdir (Coppola V, De Maria R and Bonci D. 2011). Biyogenezlerinin baskılanmasının farelerde embriyonik ölümle sonuçlanması, miRNA'ların yaşamsal öneme sahip moleküller olduklarını göstermektedir. Bugüne kadar 1400'den fazla insan miRNA'sı belirlenmiştir ve idrar,tükrük, semen, gözyaşı, süt ve amniyotik sıvı gibi farklı vücut sıvılarından izole edilebilmişlerdir (Selth LA, 2012).

2.8.3. mikroRNA'ların Biyogenezi

Olgun miRNA'lar daha uzun öncül moleküllerin çok aşamalı işlemlerden geçirilmesiyle oluşturulmaktadır. miRNA genleri transkripsiyonlarını başlatacak bir "Polimeraz II (Pol II) promotör" bölgesine sahip olabilecekleri gibi, genlerin intronik bölgelerinde bulunarak bu genlerin kırılması sonucu da oluşturulabilmektedirler. miRNA'ların RNA polimeraz II tarafından ilk okunmuş halleri olan pri- miRNA'lar, 5'sapka ve 3'poli-A kuyruğu içeren, 1 kilobazdan (kb) daha uzun dizilerdir ve tek bir pri-miRNA transkriptinden birden fazla miRNA oluşturulabilmektedir (Coppola V et al 2011). Pri-miRNA'lardan olgun miRNA'ların oluşturulması iki adımlı bir süreçtir ve ilk adım hücre çekirdeğinde gerçekleştirilir. Çift zincirli RNA'ya bağlanabilen bir protein olan "DGCR8" (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8), bir ribonükleaz (RNaz) III olan "Drosha" enzimi ile bağlanarak pri-miRNA ile etkileşimi sağlar ve kompleksin katalitik olmayan kısmını oluşturur. Bu sayede pri-miRNA'nın her iki zinciri birden Drosha tarafından kesilir ve yaklaşık 70 nükleotit uzunluğa sahip sap-ilmik formundaki ikinci öncül moleküller olan pre-miRNA'lar oluşturulur. İşlenme sürecinin bu ilk basamağının ardından pre-miRNA'lar hücre çekirdeğinden sitoplazmaya taşınır. Bu işlem nükleositoplazmik taşıma faktörlerinden karyoferin ailesinin bir üyesi olan ve fonksiyon kazanabilmesi için kofaktörü olan Ran-GTP'ye ihtiyaç duyan "eksportin-5" tarafından gerçekleştirilir. Sitoplazmada Ran-GTP'nin hidrolizi sonucu serbest kalan pre-miRNA'lar, çift zincirli RNA'ya bağlanabilen "TRBP" (HIV-1 TAR RNA binding protein) proteini ve bir RNaz III olan "Dicer" ile kompleks oluşturur (Dehm SM et al 2006). Dicer enzimi pre-miRNA'nın ilmik formunu keser ve yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda çift zincirli bir RNA yapısı oluşturulur.

Çift zincirli miRNA yapısı işlevsel değildir, bu nedenle zincirlerden biri parçalanırken diğeri Argonaute-2 (Ago2) proteinine yüklenerek, "RNA indüklü susturucu kompleks" (RISC) yapısına katılır. RISC yapısına katılan aktif miRNA hedef mRNA'lara yönlendirilir ve mRNA'nın 3'UTR bölgesindeki nükleotitlerle kısmi eşleşme göstererek mRNA ifadesini baskılar. Eşlenikliğin kısmi olması sebebiyle bir miRNA birden fazla mRNA'yı hedefleyebileceği gibi, bir mRNA'da birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilmektedir. miRNA'ların biyogenezine

dair şematik gösterim şekil 2’de sunulmuştur.

2.9. PROSTAT KANSERİNDE MİKRORNA’LARIN ROLÜ

miRNA genlerinin yaklaşık %50’si kanser ile ilişkilendirilmiş bölgelerde bulunmaktadır ve anlatımı yapılan miRNA’ların kanserli hücrelerde düzenlenmeleri bozulmakta, sağlıklı ve kanserli dokularda seviyeleri farklılık göstermektedir (Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Müller SC ve Ellinger J. 2011). Kanserde düzenlenmeleri bozulan miRNA’ların bir bölümünün hedeflerinin onkogen (tümör baskılayıcı miRNA’lar) ve tümör baskılayıcı genlerin mRNA’ları (onkomiRNA’lar) olduğu belirlenmiştir. Bu şekilde etki gösteren ve bir kemoterapötik hedef olabileceği düşünülen miR-21’in çoğu kanser tipinde miktarının arttığı ve çoğalma, hücre ölümü ve yayılımla ilişkili pek çok tümör baskılayıcı geni hedef alarak onkogenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bunun tersi şekilde let-7 ailesi üyelerinin de tümör baskılayıcı etki gösterdiği ve artmış ifade seviyelerinin akciğer kanserinde hayatta kalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir Öte yandan mRNA üzerindeki miRNA etkileşim bölgeleri olan 3’UTR’lerdeki polimorfizmlerin de miRNA bağlanmasını etkilediği ve bu şekilde, onkogenik özellikteki mRNA’ların baskılanmasının önüne geçilerek kanser riskinin artabileceği yine let-7 ailesi ile gösterilmiştir. Prostat kanseri oluşum ve gelişiminde etkili olabilecek pek çok aday miRNA belirlenmiş olmasına rağmen bunların çok azının işlevleri bilinmektedir. Bunların arasından tümör baskılayıcı olarak işlev gösteren miRNA’lardan olan miR-143’ün pek çok yolakta etkili olarak, miR-200 ailesi ve miR-145’in hücre göçü ve yayılımında engelleyici role sahip olarak, miR-488’in AR-aracılı hücre büyümesindeki durdurucu rolüyle prostat kanserinde etkilerinin olabileceği belirlenmişken; onkomiRNA olarak işlev gösteren miRNA’lardan miR-21’in tümör büyümesi ve yayılımında, miR-125b’nin hücre çoğalmasını arttırırken hücre ölümünü engelleyerek, miR-221 ve miR-222’nin hücre döngüsünde rol alarak etkilerinin olabileceği belirlenmiştir. miR-93’ün ise artmış seviyelerinin, yüksek riskli prostat kanseriyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Kuner R, Brase JC, Sülmann H ve Wuttig D 2013). Gerek hücre hatları gerekse klinik örneklerle yapılan çalışmalar sonucunda prostat kanseriyle ilişkili bulunan ve ifade değişimleri rutin olarak kullanılan biyobelirteçlerle tutarlılık gösteren az sayıda miRNA belirlenebilmiştir.

Ön plana çıkan moleküllerden olan miR-107 ve miR-574-3p'nin hastalık varlığında serumdaki seviyelerinin arttığı ve idrardaki seviyelerinin de PCA3'ten daha bilgilendirici olduğu bulunmuştur (Selth LA, 2012). Buna karşın tekrarlanan çalışmalarla ortak bir gen ifade profili ortaya konamamıştır; ancak çalışmaların çoğunda prostat kanserinde biyobelirteç adayı olarak ön plana çıkan miR-141 ve miR-375 molekülleri için tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir.

Sylvestre ve arkadaşları insan prostat kanseri hücre soyundan miR-20a ekspresyon düzeylerinde artışın olduğunu gözlemlemişlerdir (Sylvestre et al 2007). Prostat kanser dokusunda benzer sonuçlar elde etmişlerdir (Volinia et al 2006). miR-20a'nın fonksiyonu E2F2 ve E2F3 mRNA'nın 3'translasyona uğramamış bölgelerindeki bağlanma siteleri üzerinden translasyonun düzenlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu durum miR-20'nin onkojenik davranışını desteklemektedir. Volinia ve arkadaşlarının miR-20a'nın aşırı ekspresyonunun PC3 hücre hattında apoktozu azalttığını belirlemişlerdir (Volinia et al 2006).

2.9.1.Dolaşıma Katılan mikroRNA'lar

Tümör kökenli miRNA'ların tümör dokusundan ayrılıp ölçülebilen miktarlarda dolaşıma katıldıkları ve mRNA'ların aksine, RNaz ve diğer çevresel faktörlerden yüksek derecede korunarak kandan ve diğer vücut sıvılarından izole edilerek biyobelirteç olarak kullanılabilirler gösterilmiştir. Bu korunmanın sebebinin miRNA'ların diğer proteinlerle birlikte ribonükleoprotein kompleksleri oluşturmasının yanı sıra eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimciklerin yapısına katılarak hücre dışına salınmaları olduğu düşünülmektedir (Selth LA, 2012). Vücut sıvılarından elde edilen total miRNA'ların yanı sıra sadece eksozomlardan izole edilen miRNA'ların da hastalık konusunda yeterince bilgilendirici olduğu gösterilmiştir. Metastatik prostat kanserli hastalarda miR-141 ve miR-375 moleküllerinin seviyelerindeki belirgin artış eksozomlardan izole edilen miRNA'lar ile de doğrulanmıştır. Bu yönde yapılan çalışmalarla prostat kanserli erkeklerin idrar, plazma ve serumlarından elde edilen miRNA'ların hastalığın varlığı ve seyri açısından önemli moleküller oldukları belirlenmiştir (Bryant RJ et al 2012). Yapılan çalışmalarla prostat kanseri varlığında miR-141 ve miR-375 moleküllerinin ifade seviyelerinin arttığı görülmüş ve tümör dokusundan

kana salındıkları düşünülmüştür. Serum, plazma ve dokulardan elde edilen miRNA'larla yapılan farklı çalışmalarda ise miR-141 ve miR-375 ifade seviyelerinin metastatik hastalıkta metastatik olmayan hastalığa göre daha fazla artmış olduğu belirlenmiştir. Metastatik hastalıkta serumda en yüksek seviyede bulunan bu iki miRNA PSA'ya ek birer parametre olarak önerilmişlerdir(Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, Steuber T et al 2011).

2.9.2 Prostat Kanserinde miRNA

miRNA'ların komplementer mRNA'lara bağlanarak gen ifadelerinin bir negatif regülatörü olarak işlev gördüğü, translasyonel represyona ve mRNA degradasyonuna sebep olduğu gittikçe daha açık bir hale gelmektedir. miRNA'ların disfonksiyonu sonucu mRNA ve protein ekspresyonunun bozulduğu bilinmektedir. miRNA'ların prostat kanseri (PCa) dahil çeşitli insan kanserlerinde rol oynadığı tespit edilmiştir (Matin F, 2016) 4 PCa hücre hattında (LNPCa, DU145, PC3 ve MDA-2A) uzun mesafe epigenetik susturmanın yaklaşık % 26'sının (47'de 12) miRNA genleri içerdiği bulunmuştur (Volinia S, 2016). Ayrı ayrı yüzlerce öngörülen hedefe sahip olan miRNA'ların (miRNome'da (miRbase.org) 2000'den fazla eşsiz insan miRNA'sı olduğu için, PCa karsinogenezi ve terapötik direncindeki rolleri yaygındır ve anlaşılması güçtür (Porkk KP, 2007). Yakın zamanda yapılan bir derlemede, PCa tanısı ile ilişkili 30 miRNA çalışmasının ve PCa prognozu ile ilişkili 30'dan da fazla miRNA çalışmasının olduğu gösterilmiştir (Sun T, 2014). Volinia ve ark. bir çalışmada, miRNome analizi ile, normal prostat dokularına kıyasla 45 insan PCa primer tümör örneği için 39 up-regüle miRNA ve 6 down-regüle miRNA tanımlanmıştır. Başka bir çalışmada, Porkka ve ark. tarafından Benign prostat hiperplazisi (BPH) ve PCa dokuları arasında diferansiyel ekspresyon saptanmıştır; PCa örneklerinde 51 ayrı miRNA'nın 37'sinin down-regülasyon ve 14'ünün ise up-regülasyon gösterdiği bulunmuştur. Sun ve diğ. miR-221'in, androjen reseptörü (AR) sinyal yolağını yeniden programladığını ve kastrasyona dirençli prostat kanserine (CRPC) geçişi hızlandırdığını göstermiştir. Daha yakın zamanda tümör baskılayıcı miR-221/222 genleri; CRPC'ye yol açan PCa hücrelerinde miR-221/222'nin down-regülasyonu sonucunda göçün ve invazyonun arttığını gösteren bir çalışma ile tanımlanmıştır (Goto Y, 2015).

Çeşitli çalışmalardaki farklılıklar, miRNA'ların PCa karsinogenezinde ve progresyonunda düzenleyici rolünün hala ikna edici olmadığına işaret etmektedir. Bunun nedeni miRNAnom'un kompleks olması ve her miRNA için mRNA hedeflerinin çeşitliliği olarak açıklanabilir. Ayrıca genetik ve mikroçevresel tümör heterojenliği, miRNA ekspresyon paternlerinin tanımlanmasında yanıltıcı olabilir (Korpela E, 2015). Çelişkili sonuçlara rağmen, miRNA'ların çeşitli çalışmalarda PCa'nin prognozu için bir biyomarker olduğu kanıtlanmıştır. Guan ve ark. ileri derece PCa'li hastalarda miR-21'in up-regülasyonunu, ilerlemesiz sağkalımın (PFS) bağımsız bir öngörücüsü olarak keşfetmişlerdir. (Guan Y, 2016). Spahn ve diğ. 92 PCa hastasının takibi boyunca, miR-221'in down-regülasyonunun, Gleason skoru ve klinik nüksü de dahil olmak üzere klinikopatolojik parametreler ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Spahn M, 2010). 22Rv1 PCa hücrelerinde ektopik miR-145 uygulanması, AR'nin hem transkript ve protein seviyeleri üzerinde hem de aktivitesi ve prostat-spesifik antijen (PSA) downstream hedefleri üzerinde inhibitör etki yaratmıştır, dolayısıyla ölümcül CRPC'ye dönüşümü azaltmaktadır (Larne O, 2015). Bununla beraber, ameliyat sonrası biyokimyasal nüksü olan PCa hastalarının nüksü olmayan hastalara kıyasla formalinle fikse edilen parafine gömülü prostatektomi örneklerinde 16 miRNA'nın farklı bir ekspresyon profili gösterdikleri rapor edilmiştir (Tong AW, 2009). Benzer şekilde miR-145 ekspresyonunun, neoadjuvan RT'ye iyi yanıt (PSA < 2.0 ng/mL/yıl) gösteren hastalarda anlamlı olarak arttığı; buna karşın miR-145 ile düzenlenmiş γ -H2AX geninin ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Gong P, 2015). Ayrıca, up-regüle miR-135b, miR-194, miR-222 ve miR-125b'nin prostat kanserinde erken nüks riskini öngördüğü gözlenmiştir (Tong AW - Singh PK, 2014). PCa doku örneklerinde spesifik miRNA'ların ekspresyonunu değerlendiren birkaç farklı çalışma, miR-205, miR-224, miR-21, miR-126, miR-34b ve miR-15/16 dahil olmak üzere miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin, lenf düğümünde veya kemik metastazlarında ve klinik sonuçlarla ilişkili olarak, giderek deregüle edildiğini göstermiştir (Kalogirou C, 2013 – Hangman Z, 2013). Böylece bu miRNA'ların prognostik biyomarker'lar ve yeni terapötik hedefler olarak olası rolünü desteklemektedir (Doldi V, 2016).

Birlikte ele alındığında, değişken miRNA ekspresyonu PCa'de oldukça yaygındır ve miRNA ekspresyon profillerinin PCa'deki özgün patofizyolojik özellikler ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur, yine de uygulanabilir hedef popülasyonların açık bir tanımına ek olarak kesin bir biyolojik ve istatistiksel doğrulama gerektirmektedir. Farklı olarak ifade edilen miRNA'ların açığa çıkarılması, yeni PCa prognostik göstergelerinin ve terapötik hedeflerin geliştirilmesine yönelik ilgi çekici bir yol sunmaktadır.

2.9.3. Prostat Kanserli Hastaların Radyasyona Yanıtında miRNA'ların Rolü
İyonize radyasyona verilen yanıtta miRNA'ların değişimlerini tanımlamak için yapılan yaklaşımlarından biri, IR sonrasında kontrollerle karşılaştırıldığında önemli değişikliklerin hangisinde olduğunu belirlemektir (Metheetraitut C et al 2016). Elde edilen bulgular IR'ye maruz kalmanın, PCa dahil kanser hücrelerinde miRNA ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde değiştirebileceğini göstermektedir (Weidhaas JB, 2007). Leung ve diğ. PC-3 PCa hücrelerini radyasyonun farklı doz seviyelerine maruz bırakarak parental hücreler ile karşılaştırıldığında, 6 artmış miRNA'yı (miR-9, miR-22, miR-25, miR-30a, miR-550a ve miR-548h) ve 16 azalmış miRNA'yı (let-7c/d/e, miR-15a, miR-17, miR-30d, miR-92a, miR-125a, miR-197, miR-221, miR-320b, miR-342, miR-361, miR-374a, miR-501 ve miR-671) tanımlamıştır (Leung CM, 2014).

miR-106b, konak gen MCM7'nin 13. intronunda, 7q22 kromozomunda, 515-bp bölgesinde yer alan miR-106b-25 genindeki yüksek oranda korunan 3 miRNA'dan biridir. Gen ailesinin üyeleri MCM7'nin birincil transkripti ile birlikte transkribe edilir; aşırı ekspresyonu PCa'de kötü prognoz ile ilişkilendirilir (Zhao ZN, 2012). LNPCa PCa hücrelerinde miR-106b'nin ekspresyonunun, radyasyon ile muamele edilmemiş (Li B, 2011) parental hücrelerine kıyasla radyasyon sonrası grupta 3,3 kat azaldığı bulunmuştur, bu da miR-106b ifadesinin IR ile modüle edildiğini göstermektedir. miR-449a, PCa dahil çeşitli kanser türlerinde deregüle edilen miR-449 ailesinin (miR-449a, miR-449b ve miR-449c) en iyi tanımlanmış üyesidir (Noonan EJ et al 2009). Mao ve ark. LNPCa hücrelerinde miR-449a'nın IR sonrasında önemli derecede up-regüle olduğunu, (Mao A, 2016) ekspresyonun 4 GyX-ray ile IR'den sonra 24 saatte maksimuma ulaştığını; aşırı ekspresyonun da c-Myc'yi down-regüle ederek radyosensitivitenin artmasına sebep olduğunu

bulmuşlardır (Josson S, 2008). Bu durum PCa radyorezistansındaki rolünün önemini ortaya koymaktadır. PCa radyasyon tedavisine yanıtta miR-521'in de önemli ölçüde değiştiği bulunmuştur. miR-521'in aşırı ekspresyonunun LNPCa ve C4-2 PCa hücrelerini RT'ye önemli ölçüde duyarlı hale getirdiği; miR-521'in ektopik inhibisyonunun ise radyorezistans ile sonuçlandığı gözlenmiştir. Daha ileri çalışmalar miR-521'in Cockayne sendromu protein A (CSA) (bir DNA tamir proteini) ile radyosensitiviteyi düzenlediğini ve miR-521 düzeylerinin CSA düzeyleri ile ters orantılı olduğunu göstermiştir (Josson S, 2008).

let-7 başlangıçta *Caenorhabditis elegans*'ta *lin-4*'ten sonra ikinci miRNA olarak bulunmuştur (Reinhart BJ, 2000). İnsan *let-7* ailesi, -7a, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *let-7i* ve miR-98'den oluşur. Bu aile çoğunlukla Ras ve c-Myc gibi onkojenlerin down-regülasyonu ile tutarlı bir tümör süpresörü olarak görülür, bu hedef mRNA'ların 3'-UTR bölgesine bağlanırlar (Kim HH, 2010). Üstelik, PCa dahil olmak üzere birçok kanserde *let-7* ifadesi azalmış olarak bulunmuştur (Barh D, 2010). John Aryankalayil ve ark. mikroarray teknolojisi kullanarak, fraksiyone radyasyon ile muamele edilmiş LNPCa, PC-3 ve DU145 PCa hücreleri ile tek doz radyasyon ile muamele edilmiş hücrelerin miRNA ekspresyonunu karşılaştırmış; sonuç olarak fraksiyone radyasyonun tek doz radyasyona kıyasla daha fazla miRNA'yı önemli ölçüde değiştirdiğini gözlemlemişlerdir (John M, 2012). Tümör baskılayıcı miR-34a ve *let-7*'nin, radyosensitif LNPCa (p53-pozitif) ve PC-3 (p53-sıfır) hücrelerinde fraksiyone radyasyon ile up-regüle edildiği bulunmuştur. Bu durum radyasyona bağlı miRNA ekspresyonun, tek başına bir faktörle (p53) değil, ancak potansiyel olarak birden fazla yolla düzenlenebildiğini göstermektedir. Küresel bir analiz ve bir miRNA PCR dizisi veri analizi kullanılarak çalışma grubumuz tarafından PCa-radyosensitif hücre hatlarıyla (yayınlanmamış veriler) karşılaştırıldığında, PCa-radyorezistan (RR) hücre hatlarında miR-200 ailesinin (miR-200a/b/c, miR-141 ve miR-429), miR-4474, miR-7641 ve miR-4521'in ifadelerinin baskılandığı bulunmuştur. Bu bulgular söz konusu miRNA'ların PCa radyorezistansında yer aldığını önermektedir. PCa'de IR ile değiştirilen miRNA ifadeleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Birçok durumda, bir çalışmada rapor edilen miRNA değişikliklerinin başka bir çalışmada vurgulanmadığını belirtmek gerekir. Bu, değişikliklerin tutarlı veya

ortak olmadığına işaret etmektedir. Ayrıca diğer potansiyel hedeflerin var olabileceğinin, diğer çelişen faktörlerin de daha fazla açıklığa kavuşturulması gerektiğinin bir göstergesidir. Bildiğimiz kadarıyla, PCa'de IR tarafından indüklenen miRNA profili değişimleri sadece in vitro hücre hattı çalışmaları ile sınırlıdır. Bu nedenle, hayvan modelleri ya da insan numunelerinde IR sonrası miRNA değişikliklerinin, PCa radyasyon yanıtındaki ve radyodirençteki rollerinin derinlemesine araştırılması gerekmektedir.

2.9.4.Kanser Radyodirencindeki Sinyal Yollarının Düzenleyicisi Olarak miRNA'ların Kabul Edilen Roller

2.9.4.1.PI3K/Akt/mTOR Yolağı

PI3K / Akt / mTOR sinyal yolu; sağkalım, büyüme, proliferasyon, farklılaşma, kök hücre benzeri özellikler, metabolizma ve anjiyogenez dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevler dizisini kapsamaktadır (Chang L, 2015). Bu yolak, intrinsik radiosensitivite, tümör hücre proliferasyon kabiliyeti ve hipoksi mikroçevresi dahil olmak üzere 3 ana radyasyon direnci mekanizması ile yakından ilişkilidir ve birtakım farklı seviyelere sahip miRNA tarafından düzenlenir (Zhao L, 2013). Bu yolakta bir anahtar downstream molekül olan Akt, miRNA regülasyonu tarafından doğrudan etkilidir. Bulgular, miR-302a'nın radyorezistan göğüs kanseri hücrelerinin radyoterapi uygulamasında in vitro ve in vivo duyarlı hale getirdiğini, Akt1'in ekspresyonunu azalttığını göstermekte ve bu miRNA'nın PCa hücresinin sağkalımındaki rolünü ve RT sonrası hücre sinyalini araştırmak için bir gerekçe sağlamaktadır (Liang Z, 2013). Aynı zamanda, sentetik inhibitörler tarafından miR-21'in susturulmasının sonucu olarak, U373 malign glioma hücrelerinde de radyasyon ile indüklenmiş Akt aktivasyonunun baskılandığı gözlenmiştir (Gwak HS, 2012).

PI3K / Akt / mTOR sinyal yolu, Akt ifadesinin negatif bir regülatörü olan fosfataz ve tensin homologu (PTEN) tarafından düzenlenir. IR'den sonra artmış miR-21'in uyarıldığı, PTEN'in baskılanmasını ve U251 glioblastoma hücre dizisinde DNA hasar onarımını ve hücre sağkalımını teşvik etmek için Akt aktivasyonunu kolaylaştıracağı ve birkaç makalenin miR-21'i antagonize ederek IR'ye karşı duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir (Li Y, 2011). Nihayetinde malign

glioma hücre dizileri ve özofagus kanseri hücre hatlarında PI3K/Akt yolunu inhibe ederek, PCa-RR hücrelerinde miR-21'i test etmeye değer olduğunu düşündürmektedir (Huang S, 2013). Benzer şekilde miR-205 ve miR-221/222'nin, mide ve nazofarenks kanserinde PTEN'in doğrudan modülasyonu üzerinden radyosensitiviteyi düzenlediği bulunmuştur (Qu C, 2012). Prostat kanserinde PC-3 hücrelerinde SGPP1'in siRNA ile "knockdown" edilmesi fosfo-Akt seviyelerini up-regüle etmiş ve hücreye radyasyona karşı direnç kazandırılmıştır. Bu durumda miR-95 aşırı eksprese edilmiştir (Huang X, 2013). Bununla birlikte, PCa radyorezistansındaki miRNA'lar ve PI3K/Akt sinyal yolu arasındaki doğrudan bağlantı şimdiye kadar rapor edilmemiştir. Gelecek çalışmalarda PI3K/Akt yolunun düzenlenmesinde miRNA'ların rolünün araştırılması yoğun ilgi çekecektir. PI3/Akt sinyal yolunu baskılamak için miRNA'ları hedeflemek, PCa'yi tedavi etmek ve radyodirençlerini aşmak için yerinde bir yaklaşım olabilir.

2.9.4.2.MAPK/ERK Yolağı

MAPK yolunun, büyüme faktörü aracılığıyla proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrel olayların düzenlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lyng FM, 2006). Özellikle "klasik" MAPK yolu olarak da bilinen MAPK / ERK yolu, IR ile yakından ilişkilidir. EGFR ailesi reseptörleri radyasyon ile uyarıldıktan sonra, MAPK yolu downstream protein Ras'ı harekete geçirerek RAF proteinlerinin plazma membranına translokasyonuna yol açar. RAF'ın aktif formu olan RAF-1, MAPK kinaz 1/2 (MEK1/2)'yi fosforile eder ve o da daha sonra ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2)'yi fosforile eder (Valerie K, 2007) bu sayede transkripsiyon faktörü fonksiyonu ve hücrelerin apoptotik eşiği değiştirilir. RAF/MEK/ERK yolu, etkili DNA tamiri için kritik öneme sahiptir (Golding SE, 2007). PI3K/Akt yolağına benzer şekilde, MAPK yolunda da bir dizi miRNA regülatörü bulunur. Let-7 ailesi üyeleri için K-Ras (Ras ailesindeki bir protein) ekspresyonunu down-regüle ettikleri, let-7a'nın aşırı ekspresyonunun ise K-Ras ekspresyonunu azalttığı ve A549 akciğer karsinom hücrelerinin radyosensitivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Oh JS, 2010). Başka bir çalışma let-7 ailesinin aşırı ekspresyonunun hücrel radyasyon yanıtını arttırdığını A549 akciğer kanseri hücrelerinde in vitro ve bir *Caenorhabditis elegans* modelinde in vivo olarak göstermiştir, halbuki seviyelerinin azaltılması,

kısmen DNA hasarı cevap yolundaki genlerin ve proto-onkogen homologu perm-60/Ras'ın kontrolü aracılığıyla, radyorezistansa neden olur (Weidhaas JB, 2007). Bu iki çalışma, let-7'nin akciğer kanseri hücrelerinde Ras proteini ve radyasyon yanıtı açısından önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. miR-17-5p genellikle aşırı eksprese edilmektedir ve p38 MAPK yolunu etkin biçimde aktive etmek, ısı şok proteini 27 (hsp27)'nin fosforilasyon seviyesini yükseltmek için tümörde bir oncomiR olarak görev yapmaktadır (Zhao L, 2013). P38-MAPK yolunun, miR-17-5p ile indüklenen hsp27'nin fosforilasyonunda rol oynadığı; Huh-7 ve HepG2 hepatosellüler karsinoma hücrelerinde in vivo ve in vitro olarak tümör invazyonunu ve metastazı desteklediği bulunmuştur (Yang F, 2010). Dolayısıyla, miR-17-5p'nin ekspresyonunun düzenlenmesi ve MAPK/ERK sinyal yolu ile etkileşiminin engellenmesi, radyodirençliliğinin olası mekanizmalarından yararlanma ve PCa radyasyon yanıtını geliştirme potansiyeline sahip olabilir.

2.9.5.Prostat Kanserinde Radyorezistansındaki Farklı Hücresel Biyolojik Olayların Regülatörü Olarak miRNA'ların Kabul Edilen Roller

2.9.5.1.DNA Hasar Yanıtı (DDR)

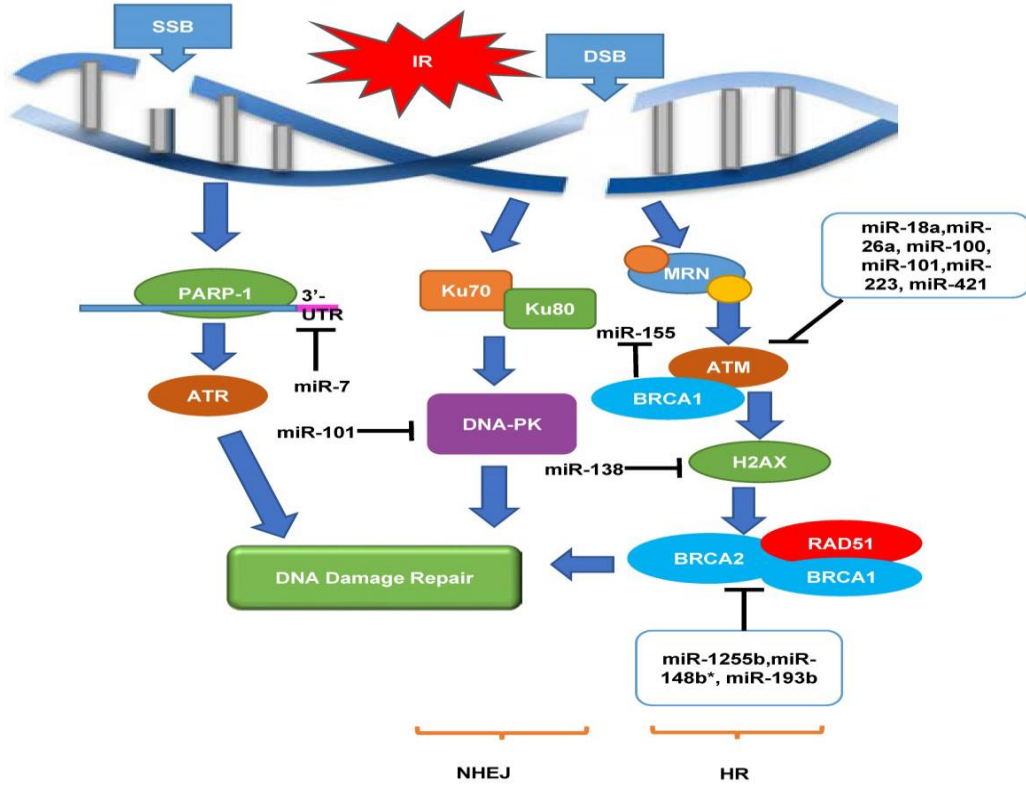
DNA hasar yanıtı, IR boyunca ekzojen ve endojen DNA hasarını tersine çevirerek hücrelerde genom bütünlüğünü koruyabilen ve DNA replikasyonu sırasında hücre sağkalımı açısından mecburi olan elzem bir işlemdir (Gonfloni S, 2013). Hücreler, yüksek konservatif fakat çeşitli DDR yolları geliştirmiştir. Bu yollar üç ana bileşen içerir: sensörler, sinyal dönüştürücüler ve efektörler. IR tarafından verilen hasarın ardından ilk adım, DNA hasar algılama ve hücre döngüsü kontrol noktasının aktivasyonudur. SSB'nin algılanması çoğunlukla poli [ADP-riboz] polimeraz-1 (PARP-1) tarafından gerçekleştirilirken, IR kaynaklı hasarda daha yaygın olan DSB'nin algılanması MRN kompleksi (MRE11/RAD50/NBS1) tarafından gerçekleştirilir. Bugüne kadar PARP-1 veya MRN kompleksini hedefleyen onaylanmış miRNA bulunmamaktadır (Şekil 1) (Ni J et al 2017). Transdüserler seviyesinde, ATM ve ATR (ATM-Rad3 ilişkili) DDR'nin tam merkezinde proksimal kinazlardır ve çeşitli hasarlı DNA formlarını tespit etmek ve downstream DDR kaskadlarını harekete geçirmek için kullanılabilirler (Lopez AJ, 2010). ATM, DSB'lerden sonra DDR'nin ana aktivatörü iken ATR genellikle

SSB'lere yanıt verir. DSB, IR kaynaklı hasarda daha yaygın olduğundan, ATM'nin miRNA düzenlemesi ayrıntılı olarak ele alınacaktır. ATM, tümör hücrelerinde birkaç miRNA tarafından doğrudan düzenlenir; miR-18a kalın bağırsak kanserinde, miR-26a gliyoblastomda (Guo P, 2014), miR-100 gliomada (Ng WL, 2010), miR-101 akciğer kanserinde ve gliyoblastomda (Yan D, 2010), miR-223 gliyoblastomda ve miR-421 nöroblastomda regülatördür (Wu CW, 2013). Hu ve diğ. miR-421'in, in vitro LA-N-1 ve LA-N-5 nöroblastom hücrelerinde ATM transkriptlerinin 3'-UTR bölgesini hedefleyerek ATM ekspresyonunu baskıladığını keşfetmişlerdir. MiR-421'in ektopik ekspresyonu, S-fazı kontrol noktasında değişikliklere, LA-N-1 ve LA-N-5 nöroblastoma hücrelerinin IR'ye karşı duyarlılaşmasına neden olmuştur (Hu H, 2010). Ancak miR-421 ve ATM 3'-UTR arasındaki etkileşimin engellenmesi ile miR-421 aşırı ifadesinin neden olduğu defektif fenotip kurtarılmıştır. Bu da ATM'nin miR-421'in radyosensitiviteye hücre döngüsü kontrol noktası üzerindeki etkisine aracılık ettiğini göstermektedir. miR-421'in in vitro SKX baş ve boyun skuamöz hücreli kanserde klinik belirtili radyosensitiviteye neden olduğunu ve miR-421'in radyasyon cevabının düzenlenmesindeki ve ATM'deki varsayılan rolünü doğrulayan bir başka çalışma, Hu ve arkadaşlarının çalışmasındaki bulguları desteklemektedir (Mansour, 2013). ATM; DNA tamir proteinlerini hasar bölgesine toplayan, DSB tamirinin bir mediyatörü olan histon H2AX da dahil olmak üzere birçok downstream efektörün fosforilasyonundan sorumludur. MiR-138'ün U2OS osteosarkom hücre hattında DNA hasarından sonra, histon H2AX 3'-UTR'sini doğrudan hedeflediği, histon H2AX'in ekspresyonunu azalttığı ve kromozomal instabiliteye neden olduğu bulunmuştur (Wang Y, 2011). U2OS osteosarkom hücre hattında miR-138'ün aşırı ekspresyonu, HR yolunu inhibe edip IR'ye hücre sel duyarlılığı arttırarak, DNA hasarından sonra kromozomal instabilitenin artmasına sebep olmuştur (Wang Y, 2011).

DNA-bağımlı protein kinaz (DNA-PK), DDR'deki (NHEJ yolu) bir başka önemli efektördür. Yan ve diğ. miR-101'in DNA-PK'yı ve ATM mRNA'sının 3'-UTR bölgelerini hedefleyebileceğini, U87MGD malign gliyoma hücrelerinde ve 95C akciğer kanseri hücrelerinde up-regüle miR-101'in DNA-PKcs ve ATM'nin

protein düzeylerini etkin bir şekilde azalttığını, tümör hücrelerini IR'ye duyarlılaştırdığını in vitro ve in vivo'da göstermiştir(Liang L, 2010).

ATM ve DNA-PK dışında BRCA1 ve BRCA2 genleri de önemli tümör baskılayıcı genlerdendir. Yakın zamanda yapılan bir genomik analiz, BRCA1 veya BRCA2 veya DNA tamirinin HR yolunda yer alan diğer genlerdeki inaktive edici mutasyonların, PCa'nin % 20-25'inde oluştuğunu ortaya koymuştur (Dhawan M, 2016), bu da BRCA1 ve BRCA2'nin DNA hasar tamiri yollarında, özellikle HR yolunda, önemli bir rol oynadığının göstergesidir. Metastatik CRPC dahil olmak üzere, BRCA mutant ve HR eksikliği ile ilişkili kanserler için PARP inhibitörü kullanılarak sentetik letal terapötik bir yaklaşım geliştirilmiştir ve çoklu Faz I ve Faz II klinik testlerle (NCT01972217, NCT02861573 ve NCT01682772) araştırılmaktadır. Chang ve ark. BRCA1'in miR-155 ekspresyonunu promotordaki H2A ve H3 histonlarını deasetilleyen HDAC2 ile ilişkisi aracılığıyla epigenetik olarak baskıladığını ve miR-155'in aşırı ekspresyonu görülmüştür. Ayrıca BRCA1, BRCA2 ve RAD51 dahil olmak üzere HR faktörlerinin transkriptlerinin miR-1255b, miR-148b * ve miR-193b * ile hedeflenebildiği, bu miRNA'ların inhibe edilmesinin özellikle G1 fazında BRCA1/BRCA2/RAD51 ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur (Chang S, 2016). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, iki güçlü IR duyarlılaştırıcı olan miRNA'nın (miR-890 ve miR-744-3p) PCa'de IR ile indüklenen DNA hasar tamirini önemli ölçüde geciktirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada miR-890 doğrudan MAD2L2'yi, WEE1 ve XPC'yi hedeflerken, miR-744-3p doğrudan RAD23B'yi hedef almıştır. PCa radyodirencinde DDR'deki miRNA'ların varsayılan düzenleyici rolleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Birlikte ele alındığında, miRNA ve DDR genleri arasındaki düzenleyici mekanizmaların araştırılmasının, PCa radyorezistansının üstesinden gelmek için yeni ve umut verici hedeflerin keşfine yol açabileceğini söylenebilir.



Şekil 1: Kanserlerde radyasyona yanıt olarak DNA hasar yanıtının düzenleyicisi olarak miRNA'ların rollerine genel bir bakış (Ni J et al 2017)

2.9.5.2. Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Aktivasyonu

Ökaryotik hücre döngüsü dört fazdan oluşur ve birinden diğerine geçiş, Siklinler ve Siklin-bağımlı kinazlar (CDK'ler) tarafından düzenlenir. DNA hasarının indüklenmesinin ardından, hücre döngüsü kontrol noktaları DNA hasar tamirine zaman sağlamak için harekete geçer, hücre döngüsü ilerlemesini engellemek üzere Cyclin/CDK komplekslerini hedefler. Hasar onarıldıktan sonra, hücreler hücre döngüsüne yeniden girer; eğer hasar çok geniş veya şiddetli ise, hücreler apoptoza ya da yaşlanmaya devam edecektir (Medema RH, 2012). Hücre döngüsü kontrol noktası aktivasyonu, genomik stabiliteyi korumak için çok önemlidir. Aksi halde, genomik instabilite derecesinin artması, tümör oluşumuna neden olur. Hücrenin, hücre döngüsü boyunca genomik stabiliteyi korumak için iki ana kontrol noktası vardır; biri G1/S interfazında ve diğeri de G2/M interfazındadır. Bu noktalarda DNA hasarı varlığında, hücrelerin sırasıyla replikasyonunun veya mitoz geçirmesinin önlenemediği düşünülmektedir (Deckbar D, 2011). Hücre döngüsü sürecine müdahale etmek, tümör radyasyon yanıtına katkıda bulunur (Gogieni, 2011). G1/S kontrol noktasında birçok miRNA, Siklinleri ve CDK'leri düzenler.

MiR-29c'nin 5 skuamöz hücreli özofagus kanser hücre hattında (KYSE150, KYSE410, KYSE450, KYSE510 ve EC9706) in vitro ve ileri skuamöz hücreli özofagus kanseri olan 60 insan doku örneğinde çoğunlukla down-regüle edildiği bulunmuştur(Ding DP, 2011). MiR-29c'nin aşırı ekspresyonu, esas olarak Cyclin-E ekspresyonunun modülasyonu ile hücre döngüsü G1/G0 tutulmasını indükleyerek in vitro ortamda EC9706 ve KYSE150 skuamöz hücreli özofagus kanser hücrelerinin büyümesini durdurmuştur(Ding DP, 2011). Başka bir araştırma, miR-16 ailesinin Cyclin-D3, Cyclin-E1 ve CDK6 dahil olmak üzere birçok hücre döngüsü genini eşzamanlı olarak susturarak, A549 akciğer kanser hücrelerini G1'de durdurup birikimini tetiklediğini gösterdi(Liu Q, 2008). Bu çalışmalar hücre döngüsünün düzenlenmesinde miRNA'ların anahtar rol oynadığını desteklemektedir.

CHK1 ve CHK2 en yaygın iki hücre döngüsü kontrol noktası proteindir ve her ikisi de PCa-RR hücrelerinde aktif halde bulunmuştur (Chang L, 2013). Yeni bulgular, RR AGS ve MKN45 mide kanseri hücrelerinde miR-195 ve miR-503'ü içeren bir post-transkripsiyon regülasyon mekanizması ile CHK1'in ekspresyonunun ters orantılı olduğunu göstermiştir (Bargiela J,2016). Bir başka araştırma miR-15 ailesinin ekspresyonunun CHK1 3'-UTR bölgesini hedefleyerek MCF-7 ve MDA-MB-231 göğüs kanseri hücrelerinde radyoduyarlılığın artırılmasına katkıda bulunduğunu belirtmiştir (Mei Z, 2015). MiR-3928'in, 786-O renal hücreli kanserde ve HeLa servikal kanser hücrelerinde IR'ye yanıt olarak doğrudan Dicer mRNA'nın 3-UTR'sine bağlandığı gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak G1fazında durmasıyla DNA hasarı indüklenmiş, ATR aktive edilmiş ve CHK1 fosforillenmiş olur(Chang L 2012). Xu ve ark. tarafından miR-424'ün ekspresyonunun CHK1'in 3'-UTR'sini hedefleyerek CHK1 ve fosforillenmiş CHK1'in ekspresyonunu baskılamasının yanı sıra hem apoptozu arttırarak hem de G1/S geçişini bloke ederek SiHa ve CaSki servikal kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu da miR-424'ün kanser ilerlemesinde tümör süpresör ve hücre döngüsü kontrol noktası regülatörü olarak işlev gördüğüne işaret etmektedir (Xu J, 2013). CDC25A başka bir hücre döngüsü kontrol noktası efektörüdür, kontrol noktası arrestini kaldırmak için CDK'leri aktive ederek kontrol noktalarında rol oynayan önemli bir fosfatazdır (Wang P,

2009). DDR'de CDC25A, kolon kanserinde miR-21'in, akciğer kanserinde let-7'nin ve osteosarkomda miR-449a/b'nin doğrudan hedefidir (Johnson CD, 2007). Wang ve ark. RKO ve DLD1 kolon kanseri hücre hattında miR-21'in, 3'-UTR'sindeki belirli bir dizi yoluyla CDC25A ekspresyonunu baskıladığını ve yine miR-21'in DNA hasarı tarafından indüklendiğini, G1/S geçişini negatif olarak düzenlediğini ve CDC25A'nın down-regülasyonu yoluyla G2/M kontrol noktasına katıldığını bulmuşlardır. Li ve ark. miR-21 ekspresyonunun U251 glioblastoma hücrelerinde IR'ye yanıt olarak up-regüle edildiğini belirlemişlerdir. Bu da miR-21'in glioblastoma kanser hücrelerinin radyasyona yanıtına dahil olabileceğini ve RT yanıtını öngörmek için bir biyomarker olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Li Y, 2011). CDC25A tarafından yürütülen hücre döngüsü arresti geçici iken, p53 ile daha uzun süreli arrest etkisi elde edilmektedir. P53-bağımlı G1/S kontrol noktası sadece hasarlı hücreleri kalıcı olarak tutuklamakla kalmaz, aynı zamanda onarım süresini de geçici olarak uzatır(Deckbar, 2011). p53 iyi çalışılmış bir tümör süpresördür. Aynı zamanda miRNA'lar tarafından da regüle edilen PCa dahil (Suatens A, 2016) çeşitli kanserlerde radiosensitivite ile yakından ilişkilidir (Hermeking 2012). Yeni birkaç yayında, miRNA'ların, TP53 mRNA 3'-UTR'si ile doğrudan etkileşerek p53'ün sıkı kontrolüne katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Hermeking 2012). Bu miRNA'ların arasında miR-125b, miR-504, miR-33, miR-380, miR-1285, miR-25 ve miR-30d bulunmaktadır (Le MT, 2009). Le ve ark. tarafından, IR'nin zebrafish embriyolarında miR-125b ifadesini baskılayabildiği; bu baskının p53'ün radyasyon kaynaklı ekspresyonuna katkıda bulunduğu ve stres kaynaklı apoptoza yol açtığı bulunmuştur. Buna karşılık U2OS osteosarkoma ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde in vitro olarak p53'ün miRNA'ların; Drosha ve Dicer tarafından işlenmesi ve RNA-bağlayıcı-motif proteini 38 ile etkileşim yoluyla mRNA hedef seçimi dahil olmak üzere, prosesine ve işlevine aracılık ettiği gösterilmiştir (Leveille N, 2011). p53'ün downstream'indeki bir anahtar bileşen olan p21, kanser radyorezistansında miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir. miR-17-5p oral skuamöz hücreli karsinomda, miR-208a ve miR-132/212 akciğer kanserinde, miR-106b kolon kanserinde ve PCa'de (Li B, 2011), let-7 serviks kanserinde düzenleyicidir (Wu SY, 2013). İlginç bir şekilde miR-106b'nin, p21'in aracılık ettiği radyasyonla uyarılan hücre döngüsü durdurmasını geçersiz kılabildiği gösterilmiştir. miR-

106b seviyesinin sürekli yüksek olması LNPCa ve MDA-PCa-2b PCa hücrelerinde radyorezistansa neden olduğundan potansiyel bir terapötik hedef olarak kullanılabilir(Li B, 2011). Ayrıca G2/M kontrol noktasında, miR-95 aşırı ekspresyonunun agresif bir fenotipi tekrarladığı bildirilmiştir. PC-3 PCa ve MDA-MB-231 göğüs kanseri hücre hattında in vitro, s.c. fare modellerinde in vivo deneylerle sfingosin-1-fosfat sinyalinin bir antagonisti olan sfingolipid fosfataz SGPP1'i hedefleyerek, IR sonrası G2/M kontrol noktasının ve invaziv potansiyelin arttığı gözlenmiştir. Bu da G2'den M fazına geçişin miRNA regülasyonuna bağımlı olduğunu göstermektedir. PCa dahil olmak üzere kanser radyasyon tedavisinde hücre döngüsünün düzenleyicisi olarak miRNA'ların rolleri Şekil 2'de gösterilmiştir.

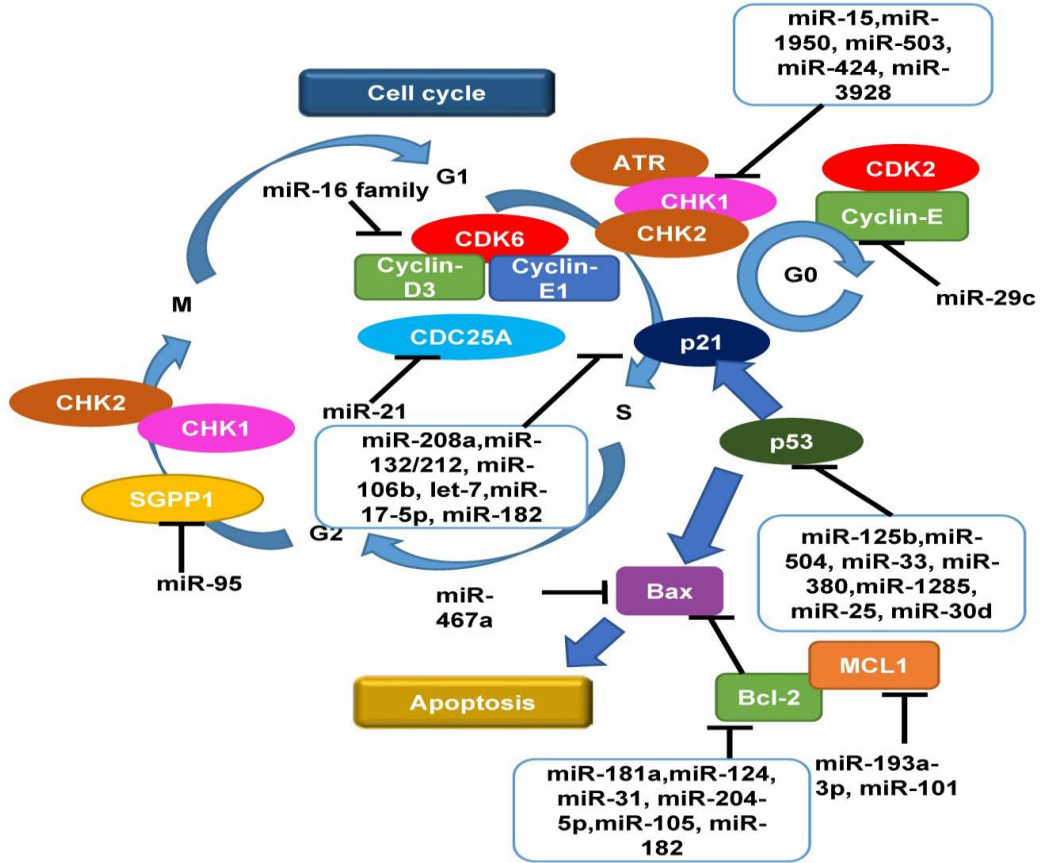
2.9.5.3. Apoptoz ve otofaji

Radyasyonun neden olduğu DNA hasarının onarılmaması hücre ölümünü apoptoz, mitotik katastrof veya yaşlanma ile doğrudan veya dolaylı olarak tetikler. Karsinomlarda hücre ölümünün majör biçimi olarak kabul edilmemekle birlikte apoptoz, malign transformasyona karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır. Aslında, normal apoptotik yollardaki bozukluklar karsinogeneze katkıda bulunur ve tümör hücreleri apoptozdan kaçmak için çeşitli moleküler mekanizmalar kullanır. Bu nedenle, normal hücreleri etkilemeden malign hücrelerde apoptotik hücre ölümünü artırabilen bir ajan, kanser tedavisi için ideal bir seçim olacaktır. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, miRNA apoptotik hücre ölümlerinde düzenleyici bir rol oynar. Kanser hücresi apoptozunu indüklemek için iki ana yol (ekstrinsik ölüm reseptörü yolu ve intrinsik mitokondriyal yol) mevcuttur(Eum KH, 2011). Ekstrinsik yol, esas olarak hücre dışı ligand olan Fas-L'nin Fas plazma membran ölüm reseptörüne bağlanmasıyla tetiklenir. Fas/FasL kompleksi, pro-kaspaz-8'i aktive eder, aktif kaspaz-8 de pro-kaspaz-3'ü aktive ederek apoptotik sürecin yürütülmesini sağlar(Kerr JF, 1972). Gao ve ark. miR-467a'nın radyasyon ile uyarılan timik lenfoma hücrelerinde onkojenik olduğunu, miR-467a'nın aşırı ekspresyonunun Fas ve Bax'ın ektopik ekspresyonu yoluyla timik lenfoma tümör hücreleri için büyüme avantajı sağlayabileceğini önermektedir(Gao F , 2015). Radyasyon ile uyarılmış timik lenfoma doku örneklerinde miR-23a/b'nin up-regüle olduğu ve miR-23a/b inhibitörü (antisense oligolar) ile hücre ölümü ve

apoptozun arttığı ve miR-23a/b mimikleri ile azaldığı EL4 lenfoma hücrelerinde in vitro olarak gösterilmiştir (Gao F, 2015). OCI-AML3 akut miyeloid lösemi hücrelerinde anti-miR155 miRCURY LNA™ problemleri kullanılarak miR-155'in knockdown'u, apoptoz kaskadının aktivasyonuna yol açan bölünmüş kaspaz-3'ün ifadesinin artmasına neden olmuştur (Palma CA, 2014). MiR-155'e ek olarak, let-7a'nın aşırı ekspresyonu, A431 insan skuamöz karsinoma ve HepG2 hepatosellüler karsinoma hücrelerine in vitro'da radyodirenci kazandırmıştır (Tsang WP, 2008).

İntrinsik yol da apoptoza yol açar, ancak mitokondriyal pro-enzimlerin kontrolü altındadır. Bu yolun en önemli regülatörlerinden biri, miyeloid hücre lösemi 1 (MCL1) ve Bcl-2'nin kendisi de dahil olmak üzere Bcl-2 protein ailesidir (Kwon JE, 2013). MCL1, U251 glioblastoma ve HeLa servikal kanser hücrelerinde miR-193a-3p'nin, HepG2 hepatosellüler karsinom hücrelerinde ise miR-101'in doğrudan hedefidir. Bcl-2, insan U87MG malignan glioma hücrelerinde radiosensitiviteyi modüle eden miR-181a'nın hedefidir (Chen G, 2010). Ayrıca miR-124'ün OCI-Ly1 B-hücresi lenfoma hücre hattında MYC ve Bcl-2 ekspresyonunun negatif regülatörü olduğu da gösterilmiştir (Jeong D, 2015). (Jeong. Körner ve ark. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Bcl-2'nin down-regülasyonu ile radyosensitivitenin artışında rolü olan miR-31'in, yeni doğrudan hedefi olarak protein kinaz C epsilon tanımlamıştır (Körner C, 2013). Prostat kanserinde miR-204-5p direkt olarak PC-3, 22Rv1 ve LN PCa hücre hatlarında apoptozun artmasına yol açan Bcl-2 mRNA'sının 3'-UTR bölgesini hedef almıştır (Lin YC, 2016). Bununla beraber, PC-3 PCa hücrelerinde, TargetScan ve PicTar kullanılarak hem Bcl-2 hem de p21'in, miR-182 için potansiyel hedef genler olduğu tespit edilmiştir (Peng X, 2013). PC-3 PCa hücrelerinde miR-205'in, DNA hasarına yanıtta Bcl-2'yi hedefleyerek apoptozu teşvik ettiği bulunmuştur (Verdoodt B, 2013). Hepsi birlikte düşünüldüğünde, çeşitli miRNA'lar PCa dahil olmak üzere farklı insan kanser türleri için apoptoz modülasyonunda fonksiyonel bir rol oynamaktadır. PCa radyasyon yanıtında apoptozda miRNA'ların düzenleyici rolleri Şekil 2'de özetlenmiştir (Ni J et al 2017).

Otofaji, düzenlenmiş ve katabolik bir süreçtir; IR'ye yanıtta önemli bir rol oynamaktadır (Paglin S, 2001). Otofaji ve kanser arasındaki ilişki açığa çıkarılırken, otofajinin hücre sağkalımını mı koruduğu yoksa hücre ölümüne katkıda mı bulunduğu bilinmeyen ortak bir sorundur. BxPC3 ve PANC-1 pankreatik kanser hücrelerinde, düşük düzeydeki miR-23b'nin, radyodirençliliği arttırmak için otofaji seviyelerini artırdığı bulunmuştur (Wang P, 2013). Bu bulgu doğrultusunda Liao ve ark. aşırı eksprese edilen miR-32'nin, DU145 ve PC-3 PCa hücrelerinde otofajiyi artırarak IR ile indüklenen hücre apoptozunu azalttığı (Liao H, 2013), Wang ve ark. ise NDRG2'yi düşürerek, miR-301a ve miR-301b'nin hipokside PCa hücrelerinin otofajisini azaltabildiğini ve radyorezistansı desteklediğini buldu (Wang W, 2016). Buna karşılık, yüksek oranda invaziv MDA-MB-231 göğüs kanseri hücrelerinde miR-199a-5p'nin aşırı ekspresyonunun, IR ile indüklenen otofajiyi arttırdığı ve hücreleri IR'ye karşı duyarlılaştırdığı gösterilmiştir (Yi H, 2013). Flux analizi kullanılarak Schaaf ve ark. tarafından, DU145 PCa hücre hattı da dahil olmak üzere 8 hücre hattında IR sonrası otofaji aktivitesindeki değişiklikler incelendi ve standart otofajinin hücrel radyorezistansa katkıda bulunmadığı sonucuna varıldı (Schaaf MB, 2015). MiRNA'lar, otofaji ve tümör radyodirenci arasındaki ilişkinin uyumsuzlukları, genlerin hücre hattına özgü bir tutum veya promotor bölgeleri arasındaki etkileşime dayandırılabilir. miRNA'lar RT'de otofajinin düzenlenmesinde çift yönlü bir rol oynar ve daha kapsamlı araştırmalar gerekmektedir.



Şekil 2: PCa dahil olmak üzere kanserlerde radyasyon cevabında hücre döngüsünün ve apoptozun bir regülatörü olarak miRNA'ların rollerine genel bir bakış. (Ni J et al 2017)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

2014-2016 yılları arasında İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Kliniğine radyoterapi uygulamaları yapılan prostat adenokarsinom tanısı konan 35 hasta çalışmamıza dahil edildi. Hastaların yaş ortanca değeri 72 (En düşük -En yüksek: 60-87). Hastaların vücut kitle indeksi ortalama değeri 26.96 (En düşük-En yüksek: 20-35) olarak belirlendi. Amerika Kanser Komitesi (AJCC)'ne ve TNM evreleme sistemine göre 7'si (%20) T2a evresinde, 7'si (%20) T2b evresinde, 21'i (%60) T2c evresindeydi (Cannistraci et al 2014). Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) kılavuzuna göre risk grupları hastaların; 7'si (%20) düşük risk grubunda (T1-T2a, GS \leq 6 ve PSA < 10 mg/ml), 28'i (%80) orta risk grubunda (T2b-T2c, GS = 7, PSA 10 – 20 mg/ml) yer almaktaydı. Orta risk grubundaki hastalara radyoterapiden önce neoadjuvan olarak başlayıp radyoterapi esnasında ve sonrasında adjuvan olarak toplam 6 ay bicalutamide 50 mg (oral) ve LHRH analogu 1., 3. ve 6. aylarda subkutan olarak uygulandı (Öğüt S, 2017).

Çalışmada tedavi öncesi ve tedavinin tüm seansları tamamlandıktan sonra rutin tetkikler için alınan kan örneklemeleri esnasındaki tam kanda, iyonize radyasyon ile ilişkisi bilinen hedef mikroRNA'lardan (miR-20a ve miR-106b) ekspresyon düzeyleri ölçümü yapıldı. Tez çalışmasında miR-20a ve miR-106b in nicel analizi için U6 RNA molekülü referans olarak kullanıldı.

3.1. KİMYASAL MADDELER VE MALZEMELER

- Leysin Buffer
- Merkaptoetanol
- İzopropanol
- Distile su
- Blood Wash Buffer
- Etenol
- Elution Buffer

- miRNA-34a ve miRNA-521
- Dilution buffer
- RNase free su
- RT Master Mix
- dNTP
- mir-RT Primer
- MMLV Enzim
- RNA ürün
- ROX
- PCR enhancer
- Taq DNA polimeraz
- cDNA ürün

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

- Santrifüj (Hettich Mikro 200R)
- Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu cihazı (Bio Rad CFX-96)
- Polimeraz zincir reaksiyonu cihazı (Techne)
- Bidistile su üretim cihazı (İncekaralar)
- Otomatik pipetler (Eppendorfresearch: 100-1000 µl, 20-200 µl; Pipetman:P2,

P20,P200;Genex Beta: 20-200 µl, 10-100µl)

- -20 °C derin dondurucu (Arçelik)
- -80 °C derin dondurucu (Nuaire)
- Falkon tüp (Greiner)
- Eppendorf tüp (Greiner)
- Çeker ocak

3.3. RADYOTERAPİ TEDAVİSİ

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar haftada 3 seans olmak üzere 8 haftalık bir radyoterapi presüdürü uygulandı. Prostat kanseri nedeniyle radyoterapi planlanan hastalara Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi (IMRT; Intensive Modulated Radiotherapy) ile tedavi planları oluşturuldu. Hastalara planlama BT'leri (Bilgisayarlı Tomografi, Siemens Somatom Sprit Computed Tomography, Erlangen, Almanya) mesane ve rektum hazırlıkları yapıldıktan sonra çekildi. Tedavi sırasında riskli organların korunması açısından mesanenin dolu, rektumun boş olmasına dikkat edildi.

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

Yapılan planların kabulü için hedef hacimlerin ve kritik organların DVH eğrileri değerlendirilip kabul kriterlerinin sağlanması koşulu arandı (Öğüt S, 2017).

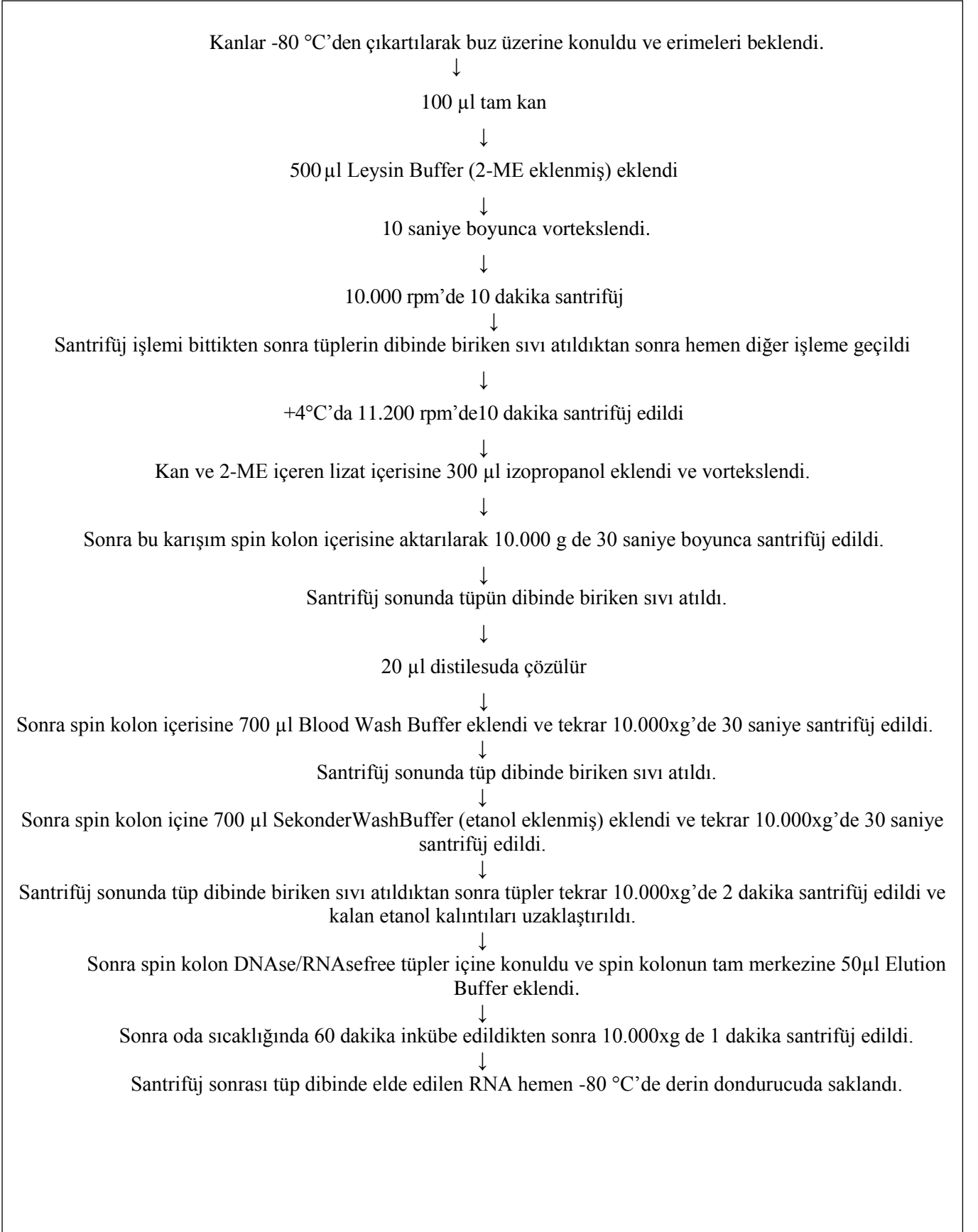
3.4. TAM KANDAN TOTAL RNA ELDESİ

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

3.4.1. Total RNA İzolasyon Yöntemi

Çalışmaya başlamadan önce tüm kan örnekleri buz içine alındı. Tam kan örneklerinden total RNA izolasyonu için spin kolon yöntemine dayalı hazır ticari kitler kullanılarak yapıldı (Cat. no: PP-210S; Jena Bioscience Building Blocks of Life, Thüringen, Almanya) (Tablo 1) (Öğüt S, 2017).

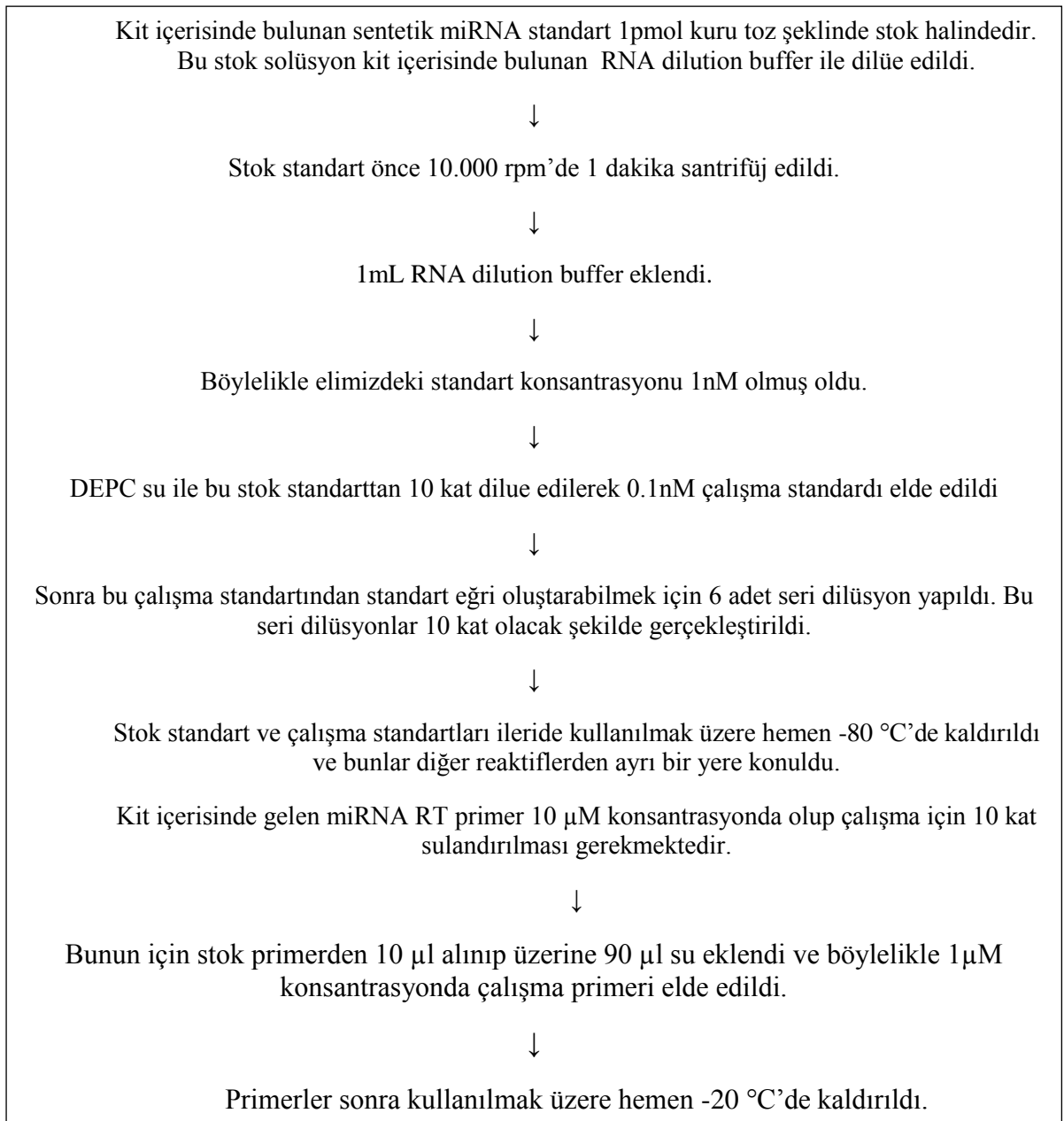
Tablo 1. RNA İzolasyonu Yönteminin Akışı



3.4.2. miRNA Ekspresyon Düzeyleri Analizi

Total RNA izolasyonu yapılan tüm örneklerin RNA konsantrasyonları ve saflıkları Thermo Scientific Nanodrop 2000 cihazı ile ölçüldü. 1µl RNA örneği alınıp cihaza konularak konsantrasyon miktarı ve 260/280 ve 260/230 oranlarına bakılarak saflıkları belirlendi. Total RNA elde edilen örneklerin cDNA işlemi için ticari miRNA Real Time RT-PCR detection kiti kullanıldı (Cat No: miRNA-34a CPK1027 ve miRNA-106b CPK1076; Cohesion Biosciences, Londra, İngiltere). Bütün işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi.

Tablo 2. miRNA PCR reaksiyonu



Tablo 3. miRNA RT primer hazırlanması

Kit içerisinde gelen miRNA RT primer 10 μ M konsantrasyonda olup çalışma için 10 kat sulandırılması gerekmektedir.

↓

Bunun için stok primerden 10 μ l alınıp üzerine 90 μ l su eklendi ve böylelikle 1 μ M konsantrasyonda çalışma primeri elde edildi.

↓

Primerler sonra kullanılmak üzere hemen -20 °C'de kaldırıldı.

Tablo 4. cDNA Sentezi Reaksiyon Bileşenleri. Toplam hacim 20 μ l olacak şekilde reaksiyon örnek başına aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

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

*Bileşenler: Mg²⁺, dNTP'ler ve primerler

Enzim eklemeyen önce tüpe konulan tüm reaktifler birkaç kez pipet ile karıştırıldı. Tüm reaktifler ve örnek tüpe konulduktan sonra tüpler Bio-Rad termal cycles cihazına (CA, USA) konularak cDNA reaksiyonu aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirildi.

25 °C	————→	30 dakika
42 °C	————→	30 dakika
85 °C	————→	5 dakika

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

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

Kantitatif Real Time PCR Reaksiyonu aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi. CohesionBioscience (Cat No: miRNA-34a CPK1055 ve miRNA-521 CPK2381, Londonra, İngiltere) firmasının microRNA Real Time RT-PCR Detection kiti kullanıldı (Tablo 6). Yine tüm işlemler buz üzerinde yapıldı. Şekil 3 ve 4 sırasıyla mir-34 a ve mir-521 için standart eğri grafiği ve örnek değerleri grafikte belirtilmiştir.

Tablo 5. Real Time PCR Reaksiyonu Bileşenleri. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon örnek başına aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

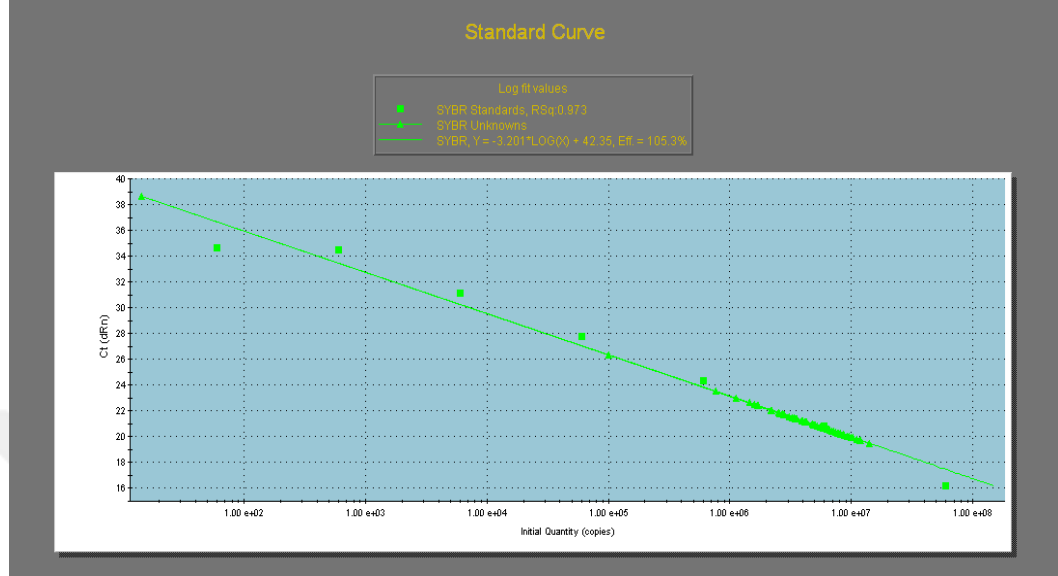
Real Time PCR Reaksiyonu Bileşenleri	1 Örnek
distile su	5.5 µl
2X Real Time Master Mix	10 µl
Primer	0.4 µl
ROX (50 kat sulanmış)	0.4 µl
PCR enhancer	1.5 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.2 µl
cDNA ürün	2 µl

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

95 °C	————→	3 dakika	} 40 döngü
95 °C	————→	12 saniye	
62 °C	————→	40 saniye	

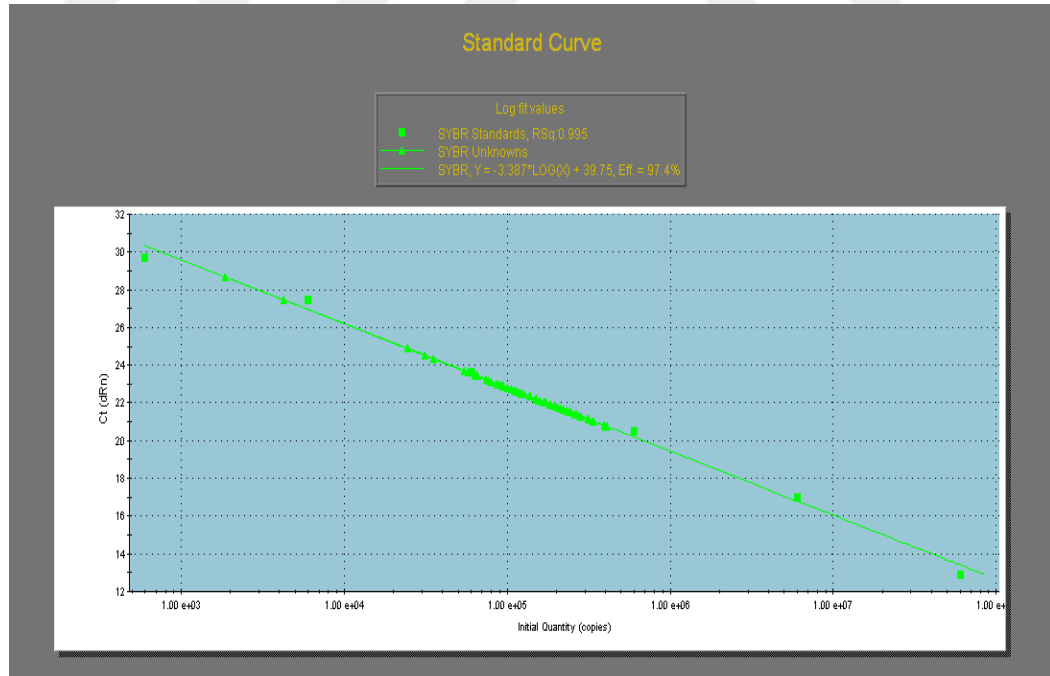
Cihaz üzerinde SYBR gren deteksiyon seçildi ve detection step olarak 62 °C

belirlendi. Şekil 5 ve 6 sırasıyla mir-20a ve mir-106b için amplifikasyon grafiği eğrileri örnek değerleri grafikte belirtilmiştir. Küçük nükleer U6 RNA molekülü kontrol molekül olarak kullanıldı (Şekil 7).



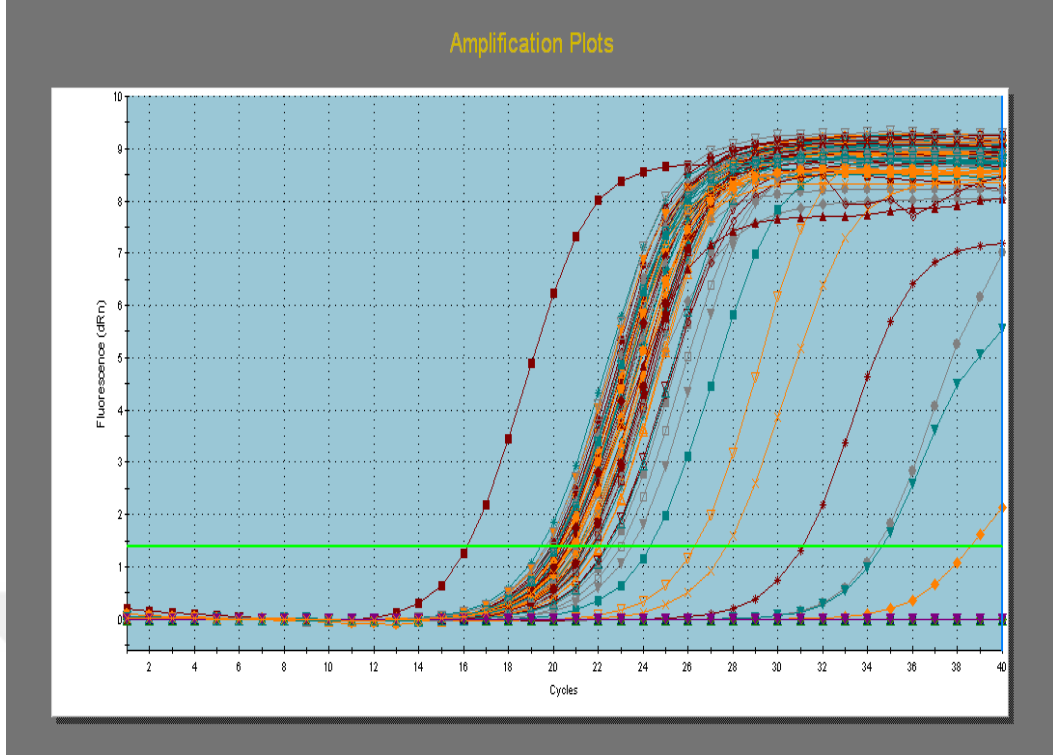
Şekil 3. mir-20a için standart eğri grafiği ve örnek değerleri grafikte belirtilmiştir.

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

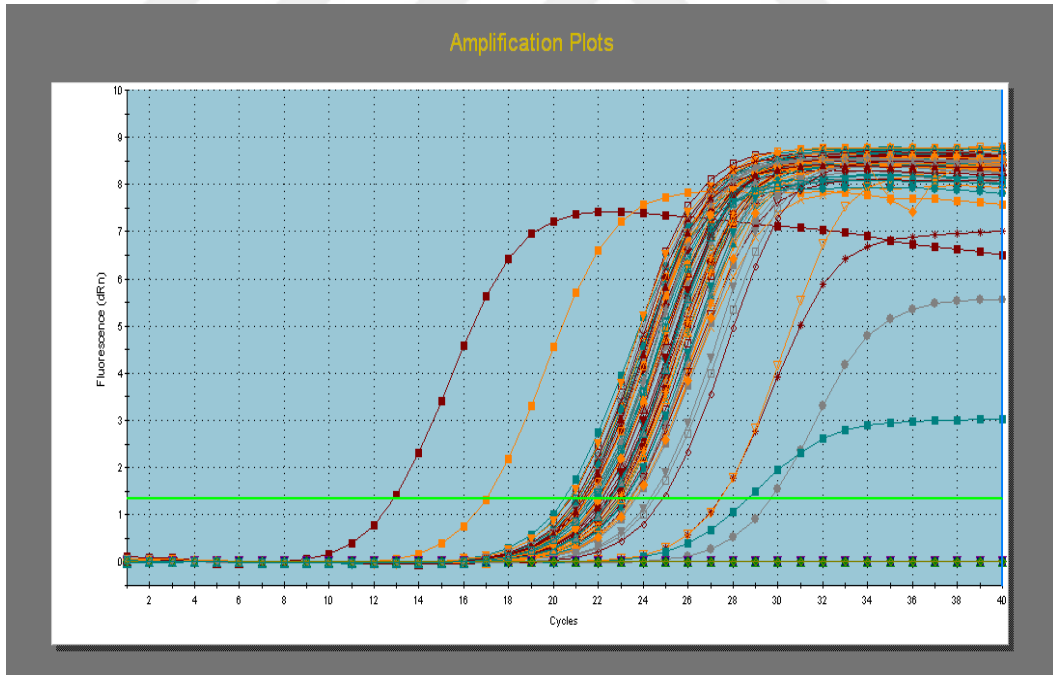


Şekil 4. mir-106b için standart eğri grafiği ve örnek değerleri grafikte belirtilmiştir.

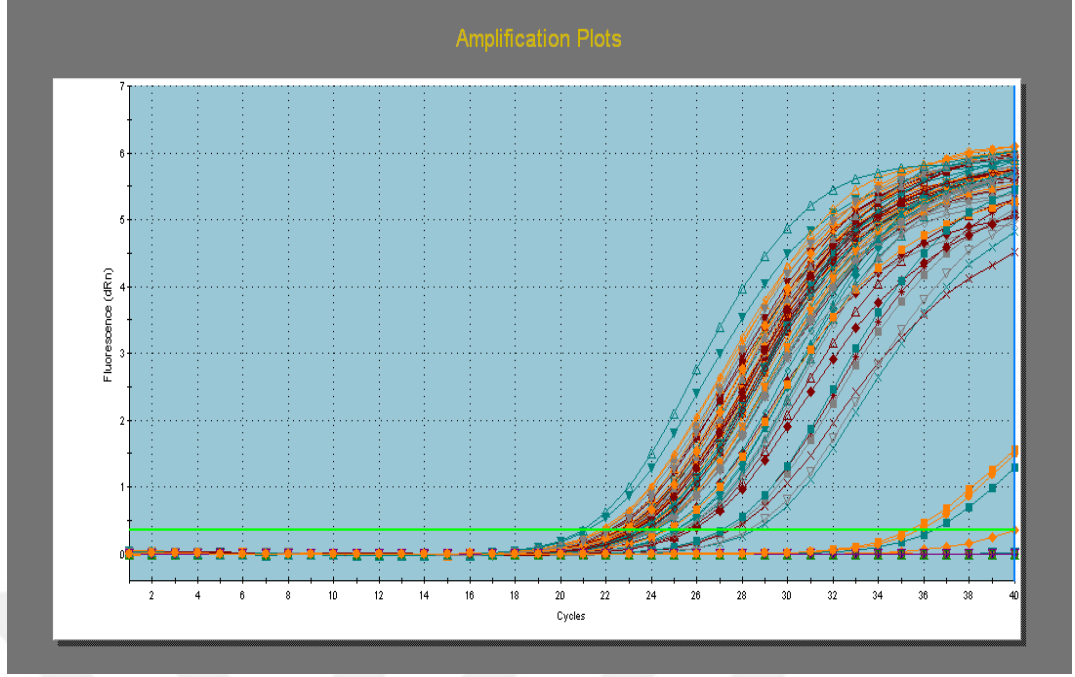
Kare ile olanlar standart değerler. Üçgen olanlar ise örnek gruplarıdır.



Şekil 5. mir-20a Amplifikasyon grafiği yukarıda gösterilmiştir.



Şekil 6. mir-106b Amplifikasyon grafiği yukarıda gösterilmiştir.



Şekil 7. U6 RNA Amplifikasyon grafiği yukarıda gösterilmiştir.

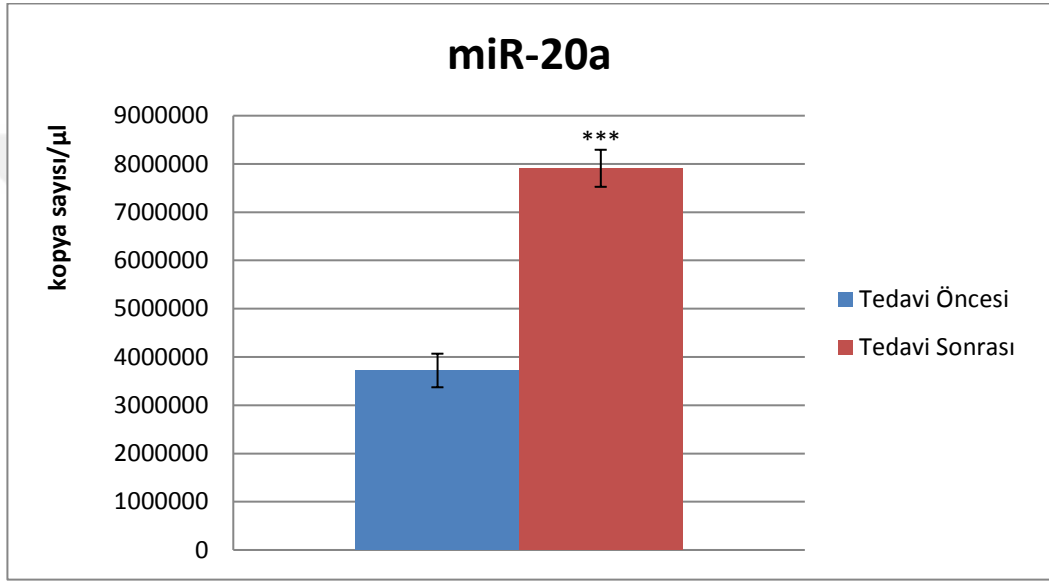
Real time sonrası standart eğriye göre her bir örneğin kopya sayıları belirlendi. Hazırlanan z çalışma standartından 0.1 μ M sentetik RNA' nın kopya sayısı 6×10^7 olup örneklerin kopya sayıları standart eğriye göre sistemin bilgisayarında hesaplandı.

3.5. İSTATİKSEL ANALİZ

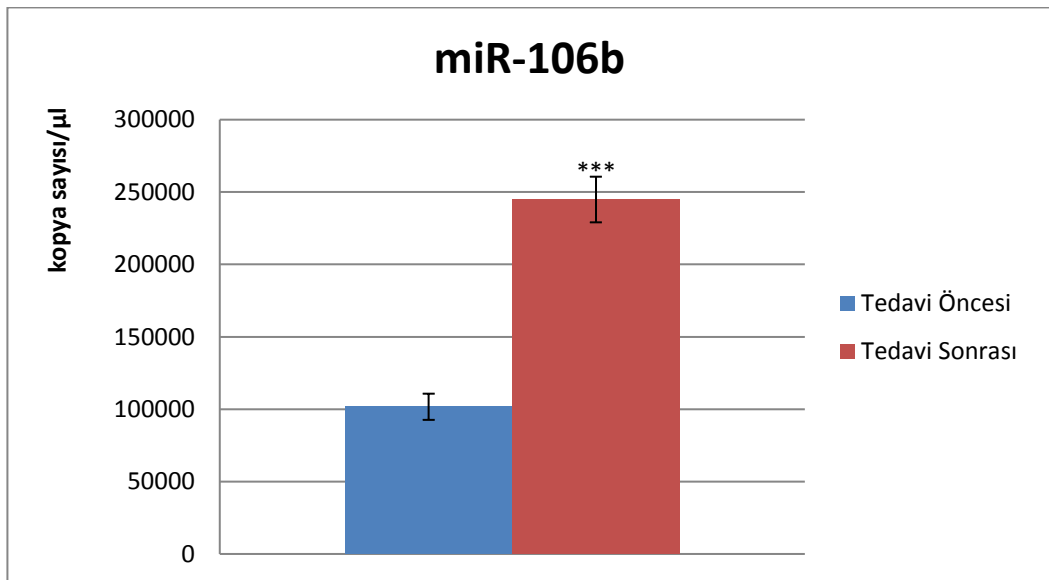
Çalışmamıza ait tüm verilerin istatistiksel analizi SPSS 17.0 (Statistics Package of Social Science, Chicago, IL, USA) paket programı ile yapıldı. Kategorik ölçümler sayısal olarak ortalama ve standart sapma (en düşük-en yüksek değerler) olarak verildi. Tedavi öncesi ve sonrası iki grup arasında bazı hematolojik parametreler, PSA ve serbest PSA değerleri ve mikroRNA ekspresyon düzeyleri açısından fark olup olmadığını belirlemek için eşleştirilmiş örneklem t- testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. miRNA ekspresyon düzeyleri ile biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık $p \leq 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya radyoterapi uygulaması uygulanan adenokarsinom prostat kanserli 35 hasta dahil edildi. Hastaların yaş ortanca değeri 72 (en düşük-en yüksek: 60-87), vücut kitle endeksleri ortalama 26.96 (en düşük-en yüksek: 20-35) idi. Radyoterapi öncesi ve sonrası hasta gruplarına ait mir20a ve mir-106b ekspresyon düzeyleri Şekil 8 ve 9 gösterilmektedir. Radyoterapi sonrası grupta radyoterapi öncesi gruba göre mir20a ve mir-106b ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu belirtildi (p=0.001 ve p=0,001).

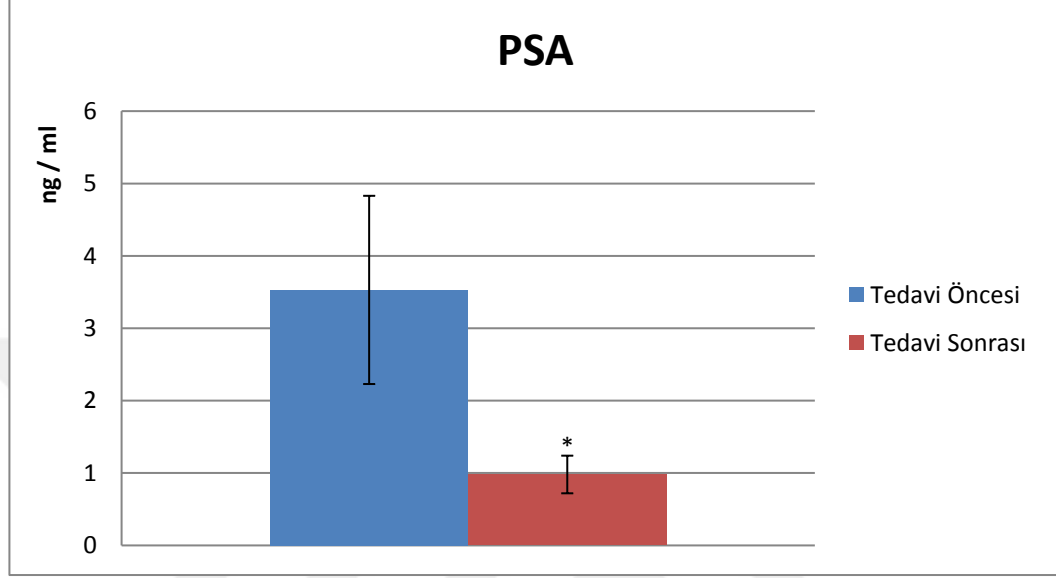


Şekil 8. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-20a ekspresyon değerleri (ortalama±standart hata)

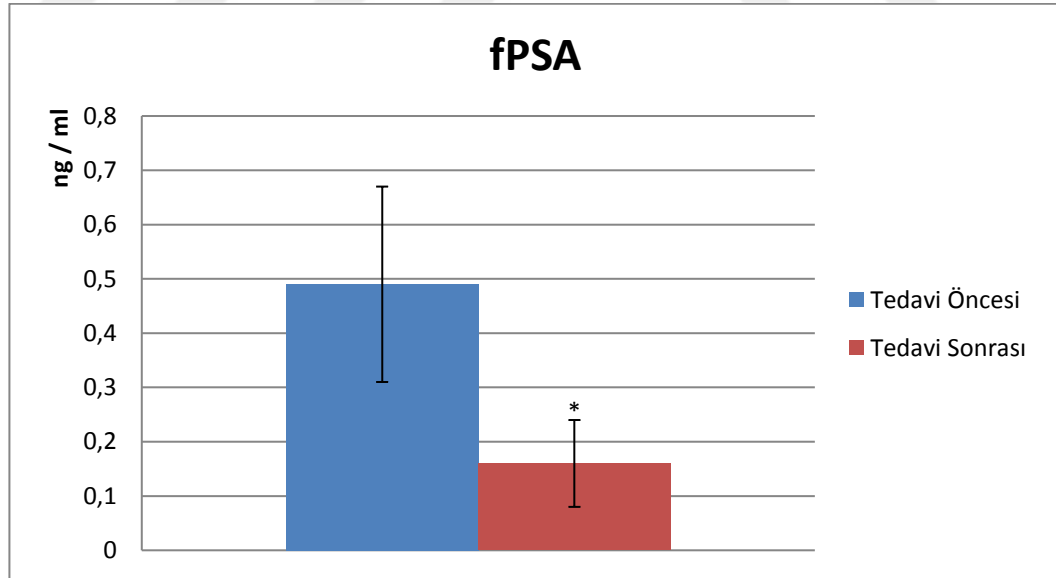


Şekil 9. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-106b ekspresyon değerleri (ortalama±standart hata)

Radyoterapi sonrasındaki grupta total PSA ve serbest PSA değerlerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0,05$ ve $p<0,05$)(Şekil 10 ve 11).



Şekil 10. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların PSA değerleri (ortalama±standart hata)



Şekil 11. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların serbest PSA değerleri (ortalama±standart hata)

Radyoterapi öncesi ve sonrası grupların bazı kan sayımı verileri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında lökosit sayısı, nötrofil ve lenfosit oranlarının anlamlı olarak değiştiği ($p=0.12$, $p=0.006$ ve $p=0.07$), eritrosit ve trombosit sayılarının anlamlı olarak değişmediği tespit edildi ($p>0,05$) (tablo 6).

Tablo 6. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların tam kan sayımı değerleri (ortalama±standart sapma)

Parametreler	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	p
Lökosit ($10^3/\text{mm}^3$)	7.02±2.02	5.51±1.11	0.012
Eritrosit ($10^6/\text{mm}^3$)	4.84±0.36	4.62±0.59	0.065
Trombosit (mm^3)	256.353±61.977	231.706±70.826	0.069
Nötrofil (%)	60.93±8.09	50.58±5.89	0.006
Lenfosit (%)	23.19±7.84	17.08±3.84	0.007

mir20a ve miR-106b ile kan hücreleri arasında korelasyon varlığı olup olmadığı Pearson Korelasyon analizi ile yapıldı. Tedavi öncesi grupta mir20a ile lökosit sayısı arasında negatif bir korelasyon olduğu görüldü ($r=-0.474$, $p<0.05$). Diğer kan hücreleri ile tedavi öncesi miR-106b ve tedavi sonrası miR-20a ve miR-106b arasında korelasyon olmadığı tespit edildi ($p>0.05$) (Tablo7).

Tablo 7. Radyoterapi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastaların miR-20a ve miR-106b ekspresyon değerleri ile tam kan sayımı parametreleri arasındaki korelasyon değerleri

Parametre	Tedavi Öncesi miR-20a	Tedavi Öncesi miR-106b	Tedavi Sonrası miR-20a	Tedavi Sonrası miR-106b
Lökosit ($10^3/\text{mm}^3$)	-0.474*	-0.306	0.114	0.174
Eritrosit ($10^6/\text{mm}^3$)	-0.081	-0.018	0.150	0.310
Trombosit (mm^3)	0.077	0.113	-0.056	0.345
Nötrofil (%)	-0.112	-0.077	-0.076	-0.236
Lenfosit (%)	-0.029	-0.068	0.283	0.263

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, radyoterapi uygulamalarında tedavi öncesi ve sonrası prostat kanserli hastalarda miR-20a ve miR-106b gibi miRNA ekspresyon düzeyleri değişiminin iyonize radyasyona yanıtı araştırılmıştır. Literatürde, bu miRNA'lar prostat kanseri hücre hatlarında çalışılmıştır. Ancak prostat kanseri olan hastalarda radyoterapiden önce ve sonraki miR-20a ve miR-106b ekspresyon düzeyleri ilk kez araştırılmıştır. Ayrıca aynı hasta grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri ile bazı biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki incelenmiştir. Literatürde, iyonize radyasyonun prostat kanserinde miRNA ekspresyon düzeyleri ve hematolojik parametreler üzerindeki etkilerini inceleyen hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Prostat kanseri hücre hatlarına ait miRNA profillerindeki değişiklikler hakkında bazı bilgiler olmasına rağmen, insan çalışmaları oldukça sınırlı sayıdadır. Bu çalışmalarda miRNA ekspresyon seviyeleri çelişkili sonuçlar vermektedir. Bu çelişkili bulguların kaynağı olarak çok çeşitli faktörler ileri sürülmüştür.

İyonize radyasyon (IR), kanser tedavisinde kullanılan ana yöntemlerden biridir. IR, önemli DNA hasarları oluşturur. Bu hasarlar tamir edilmediği takdirde, kanser hücrelerinin apoptoza gitmesine ve hücre döngüsünün durmasına neden olur. Bazı kanser hücreleri, ErbB, nükleer faktör B (NF B), MAPK, PI3K / AKT ve transforme edici büyüme faktörü (TGF) sinyal yolları da dahil olmak üzere, bu hasara karşı koyan kompleks sinyal yollarının aktivasyonu sayesinde radyasyon tedavisine dirençlidir. Radyasyon cevabını oluşturan sinyal yolağını modüle ederek kanser hücrelerinin iyonize radyasyon duyarlılığına katkıda bulunan, çeşitli radyasyonla ilişkili miRNA'lar tanımlanmıştır. miRNA'ların, gen susturucu fonksiyonları bilinmektedir ve apoptoz, hücre döngüsü, çok sayıda kanser türünün metastazı gibi biyolojik fonksiyonların modüle edilmesinde rol oynarlar. miRNA'lar genellikle hedef genleri tarafından hafifçe bastırıldığından, tek bir miRNA'nın değiştirilmesi biyolojik bir işlevin tamamlanması için yeterli değildir. Çeşitli çalışmalarda, prostat kanseri tedavisini geliştirmek için miRNA'ların rolü araştırılmıştır; oldukça az sayıda çalışmada prostat kanserinde iyonize radyasyona yanıtında miRNA'ların rollerini belirlemiştir (Runkle EA et al 2012, Zhao L et al 2012, John-Aryankalayil M et al 2012)

Prostat kanserinde kapsamlı miRNA profili prostat kanserinin ilerlemesi ile ilişkili olarak, prostat kanseri ile komşu sağlıklı prostat dokularında birkaç miRNA ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerle gösterilmektedir. Prostat kanserinde iyonize radyasyona maruziyette miRNA'ların ekspresyon seviyeleri çoğunlukla değişmiş olduğu saptanmıştır. Bazı miRNA'ların ifadeleri, radyasyona dirençli veya duyarlı olmaları nedeniyle artar ya da azalır. Bu durumda, mikroRNA'lar prostat kanserinde radyoterapinin etkinliğini belirlemede önemli bir rol oynamışlardır. Dolayısıyla miRNA'ların işlevini anlamak, çok sayıda kanser tipinin klinik tedavisi için pratik faydalar sağlayabilir. Kanser tedavisinin neticesini öngörmek miRNA'ların en umut verici kullanımı olabilir.

Sylvestre ve ark. insan prostat kanseri hücre hattında miR-20a ekspresyon düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir (Sylvestre Y et al 2007). Ayrıca, Volinia ve ark. prostat kanseri dokularında miR-20a'nın yukarı regülasyonunu kaydetmişlerdir (Volinia S et al 2006). miR-20a'nın fonksiyonu E2F2 ve E2F3 mRNA'larının 3' translasyona uğramamış bölgelerindeki bağlanma siteleri üzerinden translasyonunun düzenlenmesi olarak tanımlanmış olması nedeniyle, miR-20a'nın onkojenik rolü olduğunu desteklemektedir. Aynı araştırmacılar, miR-20a'nın aşırı ekspresyonunun PC3 hücre hattında apoptozisi azalttığını da gözlemlemişlerdir. Pesta ve ark. fazla diferansiye kanser hücrelerinin (Gleason skoru 7-10) yüksek onkojenik miR-20a ifadesine sahip olduklarını göstermişlerdir (Pesta M et al 2010). Ayrıca, PCa doku örneklerinde, BPH doku örnekleri ile karşılaştırıldığında miRNA ekspresyonlarında (mir-20a, let-7a, miR-15a ve miR-16) istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır. Çalışmamızın radyasyon öncesi grubunda fPSA düzeylerinin miR-106b ekspresyon düzeyleri ile negatif korelasyon gösterdiği, lökosit sayısının miR-20a ekspresyon düzeyleri ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Buna ek olarak radyoterapi sonrası grubunda miR-20a ekspresyon düzeylerinin miR-106b ekspresyon seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Bu hasta gruplarında belirlenen, miRNA'lar ile fPSA ve lökosit sayıları arasındaki bu korelasyonlar kanser hücrelerinin radyoterapiye cevap verebilirliğini yansıtıyor olabilir. Bu çalışmada radyoterapi sonrasında PCA'lı hastalarda miR-20a ve miR-106b ekspresyon düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. mikroRNA ekspresyon seviyeleri açısından,

radyoterapi öncesi ve sonrası iki grup arasında miRNA'ların insan prostat kanseri radyoterapisinde rol oynadığını öneren önemli bir fark bulunmaktaydı. Bu rolün altında yatan mekanizmalar açık değildir; bu bir sebep veya sonuç olabilir. miRNA ekspresyon değişikliklerindeki bu özgün farklılıkların, radyoterapiye karşı oluşturulan yanıtta özgün farklılıklardan sorumlu olabileceği unutulmamalıdır. Kemik iliği sisteminin ve kan hücrelerinin iyonize radyasyon hasarına karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir. Birçok çalışmada iyonlaştırıcı radyasyonun, kan hücrelerinin sayısında bir azalmaya ve pıhtılaşma mekanizmasının bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamıza ait bulgularda lökosit, nötrofil, lenfosit sayıları azalmış olarak bulunmuştur. Bulgularımız radyoterapi sonrasında prostat kanseri hastalarında miR-20a ve miR-106b gibi bazı miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin değişmiş olduğunu göstermektedir. Bu değişiklikler kanser tedavisi ve metastaz için önemli bir etmen olabilir. Radyoterapinin etkinliği ve hastanın sağ kalımı belirlenirken, bu mikroRNA düzeylerinin mekanizmaları daha ayrıntılı çalışmalarla desteklenmelidir.

EKLER

1. ETİK KURULU ONAYI



T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi

Sayı : 16214662 /050.01.04 / 112

01/10/2014

Konu : Etik kurul Başvuru Dosyası Hk.

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

İlgi: 24.09.2014 tarihli ve 110 sayılı başvurunuz

Destekleyicisi olduğunuz 'Prostat kanserli hastalarda radyoterapi uygulamalarında miRNA-20a ve miRNA-106b ekspresyon düzeylerinin incelenmesi' isimli klinik araştırma başvuru dosyanız ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup; etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına etik kurul üyelerince karar verilmiştir ve uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Pelin TANYERİ
Etik Kurul Başkanı

EK: 01.10.2014 tarih ve 1 sayılı Etik Kurul Kararı (3 sayfa)



KAYNAKLAR

- Abate-Shen C ve Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* 2000; **14**(19): 2410-2434.
- Alvarez MA. Prostate cancer biomarkers. *Ultrasound Clin.* 2014; **9**(1): 95-98.
- Andersen RJ, Mawji NR, Wang J, Wang G, Haile S, Myung JK ve ark. Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. *Cancer Cell.* 2010; **17**(6): 535-546.
- Auprich M, Bjartell A, Chun FKH, de la Taille A, Freedland SJ, Haese A ve ark. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. *Eur Urol.* 2011; **60**(5): 1045-1054.
- Balk SP, Ko YJ ve Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol.* 2003; **21**(2): 383-391.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; **116**(2): 281-297.
- Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW ve Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; **42**(6): 813-827.
- Bolton EC, So AY, Chaivorapol C, Haqq CM, Li H ve Yamamoto KR. Cell- and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor. *Genes Dev.* 2007; **21**(16): 2005-2017.
- Bostwick DG. Prostate-specific antigen. Current role in diagnostic pathology of prostate cancer. *Am J Clin Pathol.* 1994; **102**(4Suppl1): 31-37.
- Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, Steuber T ve ark. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2011; **128**(3): 608-616.
- Brosnan CA ve Voinnet O. The long and the short of noncoding RNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; **21**(3): 416-425.
- Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R ve ark. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991; **349**(6304): 38-44.

Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JWF, Marsden G, Vessella RL, Rhee B ve ark. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer*. 2012; **106**(4): 768-774.

Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N ve ark. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol*. 2000; **31**(5): 578-583.

Bunz F. *Principles of Cancer Genetics*. NY: Springer Science and Business Media; 2008.

Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA ve ark. DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999; **59**(23): 5975-5979.

Cai X, Hagedom CH ve Cullen BR. Human microRNAs are processed from PCapped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004; **10**(12): 1957-1966.

Cannistraci A, Di Pace AL, De Maria R, Bonci D. MicroRNA as new tools for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention: results from clinical data set and patients' samples. *Biomed Res Int*. 2014;146170. doi: 10.1155/2014/146170

Casey G, Neville PJ, Plummer SJ, Xiang Y, Krumroy LM, Klein EA ve ark. RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nat Genet*. 2002; **32**(4): 581-583.

Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC ve ark. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*. 1994; **151**(5): 1283-1290.

Centenera MM, Harris JM, Tilley WD ve Butler LM. Minireview: the contribution of different androgen receptor domains to receptor dimerization and signaling. *Mol Endocrinol*. 2008; **22**(11): 2373-2382.

Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O ve ark. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol*. 2012; **61**(6): 1079-1092.

Chan SC, Li Y ve Dehm SM. Androgen receptor splice variants activate androgen receptor target genes and support aberrant prostate cancer cell growth independent of canonical androgen receptor nuclear localization signal. *J Biol Chem*. 2012; **287**(23): 19736-19749.

cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_8556/6-11.pdf. Erişim Tarihi: 26.10.2018

cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_10459/136-143.pdf. Erişim Tarihi: 26.10.2018

Coen JJ ve Dahl DM. Localized prostate cancer. İçinde Chabner BA, Thomas JL ve Longo DL, editor. *Harrison's Manual of Oncology*. NY: The McGraw Hill Companies; 2007. pp.357-364.

Coppola V, De Maria R ve Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2010; **17**(1): 1-17.

Correa JJ ve Pow-Sang J. Mechanisms of carcinogenesis in prostate cancer. İçinde Coppola D, editor. *Mechanisms of Oncogenesis*. Netherlands: Springer; 2010. pp. 295-304.

Day JR, Jost M, Reynolds MA, Groskopf J ve Rittenhouse H. PCA3: from basic molecular science to the clinical lab. *Cancer Lett*. 2011; **301**(1): 1-6.

De Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeneij LA, Aalders TW ve ark. DD3 PCA3, a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res*. 2002; **62**(9): 2695-2698.

Dehm SM ve Tindall DJ. Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocr Relat Cancer*. 2011; **18**(5): 183-186.

Dehm SM ve Tindall DJ. Ligand-independent androgen receptor activity is activation function-2-independent and resistant to androgens in androgen refractory prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2006; **281**(38): 27882-27893.

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K ve ark. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001; **412**(6849): 822-826.

Estebanez-Perpina E, Moore JM, Mar E, Delgado-Rodriguez E, Nguyen P, Baxter JD ve ark. The molecular mechanisms of coactivator utilization in ligand-

dependent transactivation by the androgen receptor. *J Biol Chem.* 2005; **280**(9): 8060-8068.

Feldman BJ ve Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001; **1**(1): 34-45.

Ferreira LB, Palumbo A, de Mello KD, Sternberg C, Caetano MS, de Oliveira FL ve ark. PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. *BMC Cancer.* 2012; **12**(1): 507.

Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol.* 2002; Gibb EA, Brown CJ ve Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer.* 2011; **10**(1): 38-55.

Grayhack JT, Keeler TC ve Kozlowski JM. Carcinoma of the prostate. Hormonal therapy. *Cancer.* 1987; **60**(S3): 589-601.

Gregory CW, He B, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS ve ark. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res.* 2001; **61**(11): 4315-4319.

Haese A, de la Taille A, Van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF ve ark. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol.* 2008; **54**(5): 1081-1088.

Hammerich KH, Ayala GE ve Wheeler TM. Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer. İçinde Hricak H ve Scardino P, editor. *Prostate Cancer.* Cambridge: Cambridge University Press; 2009. pp.1-10.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H ve Kim VN. The drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004; **18**(24): 3016-3027.

Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S ve ark. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; **348**(2): 411-417.

Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y ve Inoue S. Identification and functional analysis of consensus androgen response elements in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; **325**(4): 1312-1317.

İnan Y. *Patoloji.* İstanbul: Klinisyen Tıp Kitabevleri; 2006.

IUBMB Life. 2006; **58**(9): 508-514.

Jariwala U, Prescott J, Jia L, Barski A, Pregizer S, Cogan JP ve ark. Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Mol Cancer*. 2007; **6**(39): 10-1186.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E ve Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; **61**(2): 69-90.

Jemal A, Center MM, DeSantis C ve Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; **19**(8): 1893-1907.

John-Aryankalayil M, Palayoor ST, Makinde AY, Cerna D, Simone CB 2nd, Falduto MT, Magnuson SR, Coleman CN. Fractionated radiation alters oncomir and tumor suppressor miRNAs in human prostate cancer cells. *Radiat Res*. 2012 Sep; **178**(3):105-117.

Klecka J, Holubec L, Pesta M, Topolcan O, Hora M, Eret V ve ark. Differential display code 3 (DD3/PCA3) in prostate cancer diagnosis. *Anticancer Res*. 2010; **30**(2): 665-670.

Kuner R, Brase JC, Sülmann H ve Wuttig D. microRNA biomarkers in body fluids of prostate cancer patients. *Methods*. 2013; **59**(1): 132-137.

Larson BT, Magi-Galluzzi C, Casey G, Plummer SJ, Silverman R ve Klein EA. Pathological aggressiveness of prostatic carcinomas related to RNASEL R462Q allelic variants. *J Urol*. 2008; **179**(4): 1344-1348.

Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R ve ark. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res*. 2008; **68**(3): 645-649.

Lee C, Keefer M, Zhao ZW, Kroes R, Berg L, Liu X ve Sensibar J. Demonstration of the role of prostate-specific antigen in semen liquefaction by two-dimensional electrophoresis. *J Androl*. 1989; **10**(6): 432-438.

Lee JT. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science*. 2012;

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S ve Kim VN. microRNA maturation: stepwise processing and subcellular localication. *EMBO J*. 2002; **21**(17): 4663-4670.

Liang SL, Quirk D ve Zhou A. RNase L: its biological roles and regulation.

Lilja H, Oldbring J, Rannevik G ve Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest.* 1987; **80**(2): 281.

Lonergan PE ve Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog.* 2011; **10**(1): 20.

Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Müller SC ve Ellinger J. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology.* 2011; **77**(5): 1265e9-1265e16.

Malathi K, Paranjape JM, Ganapathi R ve Silverman RH. HPC1/RNASEL mediates apoptosis of prostate cancer cells treated with 2',5'-oligoadenylates, topoisomerase I inhibitors, and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 2004; **64**(24): 9144-9151.

McEwan IJ. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr Relat Cancer.* 2004; **11**(2): 281-293.

McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol.* 1988; **12**(8): 619-633.

Montgomery BT, Young CYF, Bilhartz DL, Andrews PE, Thompson NF, Tindall DJ ve ark. Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNPCa. *Prostate.* 1992; **21**(1): 63-73.

Murtha P, Tindall DJ ve Young CY. Androgen induction of a human prostate-specific kallikrein, hKLK2: characterization of an androgen response element in the 5' promoter region of the gene. *Biochemistry.* 1993; **32**(25): 6459-6464.

NCCN Guidelines version 2.2017 for Prostate Cancer. National Comprehensive Cancer Network; Fort Washington, PA: [accessed June 1, 2017]. Available at: <http://bit.ly/2xtJD8v>. Erişim Tarihi: 20.04.2017

Nelson PS, Gan L, Ferguson C, Moss P, Gelinas R, Hood L ve ark. Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; **96**(6): 3114-3119.

Netter FH. *Atlas of Human Anatomy*. 5th ed. United Kingdom: Elsevier Limited; 2010.

Nguyen HCN, Xie W, Yang M, Hsieh CL, Drouin S, Lee GSM ve ark. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate*. 2013; **73**(4): 346-354.

Nupponen NN, Wallen MJ, Ponciano D, Robbins CM, Tammela TL, Vessella RL ve ark. Mutational analysis of susceptibility genes RNASEL/HPC1, ELAC2/HPC2, and MSR1 in sporadic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004; **39**(2): 119-125.

Öğüt S, Prostat kanserli hastalarda radyoterapi uygulamalarında mir-34a ve miRNA-521 ekspresyon düzeylerinin incelenmesi, yüksek lisans tezi, Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017.

Özcan F. Ürolojik ve erkek genital kanserleri. İçinde Topuz E, Aydın A ve Karadeniz AN, editor. *Klinik Onkoloji*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 2000. pp.140-156.

Pesta M, Klecka J, Kulda V, Topolcan O, Hora M, Eret V, Ludvikova M, Babjuk M, Novak K, Stolz J, Holubec L. Importance of miR-20a expression in prostate cancer tissue. *Anticancer Res* 2010; 30(9):3579-83.

Pienta KJ ve Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; **12**(6): 1665-1671.

Prensner JR, Rubin MA, Wei JT ve Chinnaiyan AM. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med*. 2012; **4**(127): 127rv3-127rv3.

https://www.researchgate.net/.../228939362_MANYETIK_REZONANS_GORU_NTULEME. Erişim Tarihi: 26.10.2018

Reid KJ, Hendy SC, Saito J, Sorensen P ve Nelson CC. Two classes of androgen receptor elements mediate cooperativity through allosteric interactions. *J Biol Chem*. 2001; **276**(4): 2943-2952.

Roche PJ, Hoare SA ve Parker MG. A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol*. 1992; **6**(12): 2229-2235.

Roudier MP, True LD, Higano CS, Vessella H, Ellis W, Lange P ve ark.

Phenotypic heterogeneity of end-stage prostate carcinoma metastatic to bone. *Hum Pathol.* 2003; **34**(7): 646-653.

Runkle EA, Zhang H, Cai Z, Zhu Z, Karger BL, Wu SL, O'Rourke DM, Zhou Z, Wang Q, Greene MI. Reversion of the ErbB malignant phenotype and the DNA damage response 2012 Dec;93(3):324-33. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.09.007.

Salah Z, Maoz M, Cohen I, Pizov G, Pode D, Runge MS ve ark. Identification of a novel functional androgen response element within hPar1 promoter: implications to prostate cancer progression. *FASEB J.* 2005; **19**(1): 62-72.

Schmidt LJ ve Tindall DJ. Steroid 5 α -reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; **125**(1): 32-38.

Schröder FH, van der Crujisen-Koeter INGRID, de Koning HJ, Vis AN, Hoedemaeker RF ve Kranse R. Prostate cancer detection at low prostate specific antigen. *J Urol.* 2000; **163**(3): 806-812.

Selman SH. The McNeal prostate: a review. *Urology.* 2011; **78**(6): 1224-1228.

Selth LA, Tilley WD ve Butler LM. Circulating microRNAs: macro-utility as markers of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2012; **19**(4): 99-113.

Selth LA, Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ ve ark. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *Int J Cancer.* 2012; **131**(3): 652-661.

Shaffer PL, Jivan A, Dollins DE, Claessens F ve Gewirth DT. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; **101**(14): 4758-4763.

Shen MM ve Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 2010; **24**(18): 1967-2000.

Stenman UH, Leinonen J, Hakama M, Knekt P, Aromaa A ve Teppo L. Serum concentrations of prostate specific antigen and its complex with α 1-antichymotrypsin before diagnosis of prostate cancer. *Lancet.* 1994; **344**(8937): 1594-1598.

Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, Ferbeyre G, Chartrand P.. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop , *J Biol Chem* 2007 Jan 26;282(4):2135-43.

Şahinkanat T, Küçükdurmaz F, Efe E, Koluş E, Ekerbiçer HÇ, Bitiren M. Prostat Adenokarsinomlarında İğne Biyopsileri ve Radikal Prostatektomi Materyallerinin Gleason Skoru Açısından Karşılaştırılması. *KSU Medical Journal* 2017;12(1):25-30.

Tanagho EA, McAninch JW. Prostat neoplazileri. Çeviri: Kazancı G. Smith Genel Üroloji. 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1999: 392-434.

Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK ve ark. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med.* 1995; **332**(21): 1393-1398.

Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL ve ark. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per mililiter. *N Engl J Med.* 2004; **350**(22): 2239-2246.

Van Royen ME, van PCapellen WA, de Vos C, Houtsmuller AB ve Trapman J. Stepwise androgen receptor dimerization. *J Cell Sci.* 2012; **125**(8): 1970-1979.

Villers A, Steg A ve Boccon-Gibod L. Anatomy of the prostate: review of the different models. *Eur Urol.* 1990; **20**(4): 261-268.

Wilusz JE, Sunwoo H ve Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 2009; **23**(13): 1494-1504.

Young CY, Andrews PE, Montgomery BT ve Tindall DJ. Tissue-specific and hormonal regulations of human prostate-specific glandular kallikrein. *Biochemistry.* 1992; **31**(3): 818-824.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM., A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2257-2261.

Zhang W, Edwards A, Fan W, Flemington EK ve Zhang K. miRNA-mRNA correlation-network modules in human prostate cancer and the differences between primary and metastatic tumor subtypes. *PLoS One.* 2012; **7**(6): e40130.

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

10.1016/j.cellsig.2013.04.004

Zhu YS, Cai LQ, You X, Cordero JJ, Huang Y ve Imperato-McGinley J. Androgen-induced prostate-specific antigen gene expression is mediated via dihydrotestosterone in LNPCa cells. *J Androl.* 2003; **24**(5): 681-687.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Nazlı Eyvan ÖZDEN

Doğum yeri ve tarihi: Eyüp/11.11.1987

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Arabacıalanı Mahallesi 588. Sokak No:4 Tezkent
Sitesi Daire: 46 Serdivan/Sakarya

Yabancı dili: İngilizce

II-Eğitimi

Sakarya Üniversitesi Fizik Bölümü 2013

Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilimdalı Yüksek
Lisans 2013-

Yayımları:

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Aydemir B., Gurol G., Ekici F., Cinemre F.B., Kiziler A.R., **Topcu N.E.**, et al. "The role of selenium level and oxidative stress markers in pathophysiology of absence epilepsy" 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Süleyman Demirel University, Isparta Turkey, Cell Membranes and Free Radical Research 6(1), P 83, s 369, Sep 9-12, 2014

Gurol G., Aydemir B., Kiziler A.R., Sarı S., **Topcu N.E.**, et al. "Effects of YC-1 on zinc, copper, lipid peroxidation, nitric oxide levels and superoxide dismutase activities in single-dose pentylenetetrazole-induced epileptic seizures" 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Süleyman Demirel University, Isparta

Turkey, Cell Membranes and Free Radical Research 6(1), P 82, s 368-369, Sep 9-12, 2014.

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

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

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan özgün araştırma makalesi

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

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

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

Aydemir B., Gürol G., Ekici F., Cinemre FB., Kızıler AR., Kılıç MA., **Topçu NE**. Genetik absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarda bazı oksidan ve antioksidan

parametrelerin incelenmesi. P-19, S:29, 8. Hücresel Sinirbilim Günleri, Sakarya Üniversitesi Kültür ve Kongre Merkezi, Esentepe Kampüsü, Sakarya, 29-30 Kasım, 2014.

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

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

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

III- Ünvanları

IV- Mesleki Deneyimi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

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

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Ödüller

Projeleri

Verdiği konferans ya da seminerler

Katıldığı paneller (panelist olarak)

VIII- Diğer Bilgiler