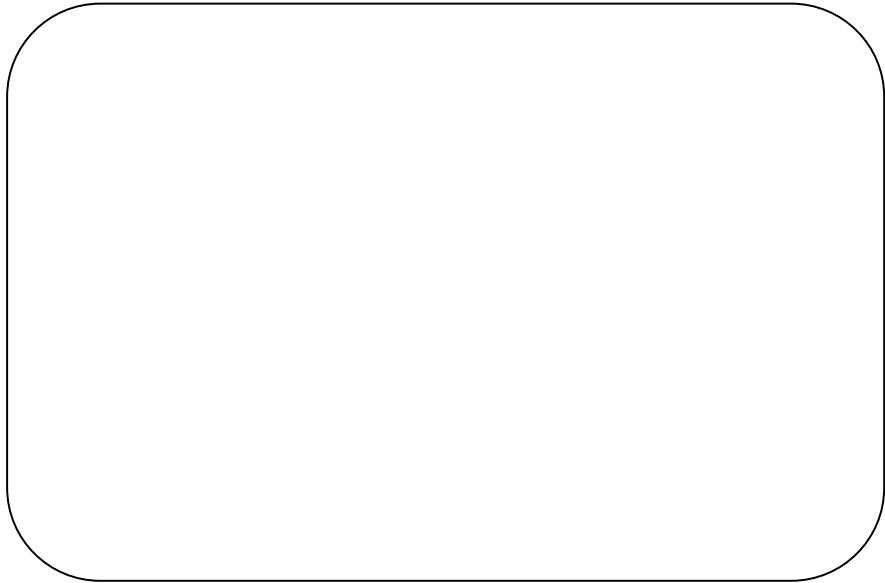




**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**SERUM TOTAL PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN (PSA)
DÜZEYİ 4-10 NG/ML ARASI (GRAY ZONE PSA DÜZEYİ)
OLAN HASTALARDA MİKRO RNA-141 SEVİYELERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Arş. Grv. Dr. Abdulkadir ÇAT

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülay KÖKEN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AFYONKARAHİSAR 2015

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SERUM TOTAL PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN (PSA)
DÜZEYİ 4-10 NG/ML ARASI (GRAY ZONE PSA DÜZEYİ)
OLAN HASTALARDA MİKRO RNA-141 SEVİYELERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Arş. Grv. Dr. Abdulkadir ÇAT

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay KÖKEN

AFYONKARAHİSAR-2015

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Başlığı : Serum Total Prostat Spesifik Antijen (PSA) Düzeyi 4-10 ng/ml Arası (Gray Zone PSA Düzeyi) Olan Hastalarda Mikro RNA-141 Seviyeleri

Tezi Hazırlayan : Arş. Grv. Dr. Abdulkadir ÇAT

Tez Savunma Tarihi: 23.01.2015

Tez Kabul Tarihi : 23.01.2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Tülay KÖKEN

İş bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan
Prof. Dr. Tülay KÖKEN

Üye
Prof. Dr. Özkan ALATAŞ

Üye
Yrd. Doç. Dr. Mustafa KARALAR

DEKAN
Prof. Dr. Ahmet SONGUR

Bu tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 13.TUS.13 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve birikimleri ile bana her konuda yol gsteren, tez konumun belirlenmesi ve tezimin hazırlanması sırasında deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Tulaı KÖKEN'e, eğitimim boyunca her konuda desteğini gördüğüm bilgi ve deneyimlerinden sürekli faydalandığım Sayın Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a ve tez ile ilgili çalışmalarım da bana gerekli materyalleri sağlayan Yrd. Doç. Dr. Mustafa KARALAR hocama teőekkürü bir borç bilirim.

Yoğun çalışma temposuna rağmen desteklerini esirgemeyen Arş. Grv. Dr. H.Buğra Koca, Arş. Gör. Ayhan Vurmaz, Arş. Grv. Dr. Mehmet Cem SABANER'e sabır, hoşgörü ve iyi niyetleri için tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ.....	V
TABLolar ÇİZELGESİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
I.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. PROSTAT BEZİ ANATOMİSİ.....	3
2.2. PROSTAT KANSERİ.....	3
2.2.1. İNSİDANS.....	3
2.2.2. TANI SIRASINDA YAŞ.....	5
2.2.3. TANI ZAMANINDA EVRE.....	5
2.2.4. MORTALİTE.....	6
2.2.5. ETYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ.....	6
2.3. PROSTAT KANSERİNDE TANI VE TARAMA.....	7
2.3.1. PROSTAT KANSERİNDE SEMPTOMLAR.....	7
2.3.2. TANI VE TARAMA YÖNTEMLERİ.....	7
2.3.3.KLİNİK KARAR VERMEYİ GELİŞTİRMEK İÇİN RİSK FAKTÖRLERİNİ MARKERLARLA ENTEGRE EDEN KARAR ANALİZ ARAÇLARI.....	8
2.3.4. PARMAKLA REKTAL MUAYENE.....	8
2.3.5.TRASREKTAL ULTRASONOGRAF (TRUS) VE TRUS EŞLİĞİNDE BİYOPSİ.....	9
2.6. PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN.....	10
2.6.1. PSA BİYOLOJİSİ.....	11
2.6.2. PSA FİZYOLOJİK FONKSİYONU.....	12
2.6.3. PSA EŞİK DEĞERİ.....	12
2.6.4. YAŞA ÖZGÜ PSA REFERANS ARALIKLARI.....	14
2.6.5. PSA VELOSİTESİ.....	15
2.6.6. PSA DENSİTESİ.....	16
2.6.7. PSA KİNETİKLERİ.....	17
2.6.8. PSA FLUKTASYONLARI.....	17
2.6.9. TOTAL PSA.....	17
2.6.10. SERBEST PSA.....	18
2.6.11. KOMPLEKS PSA.....	21
2.6.12. ProPSA.....	21
2.6.13. BENİGN PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN.....	22

2.6.14. İDRARDA PSA.....	22
2.7. PROSTAT KANSERİNDE PSA DIŞI TÜMÖR BİYOMARKERLARI.....	23
2.7.1. PROSTAT SPESİFİK MEMBRAN ANTİJENİ.....	23
2.7.2. E-CADHERİN.....	23
2.7.3. PROSTAT KÖK HÜCRE ANTİJENİ.....	24
2.7.4. HEPİN.....	24
2.7.5. ERKEN PROSTAT KANSER ANTİJENİ.....	24
2.7.6. PROSTAT KANSER GENİ 3.....	25
2.7.7. ALFAMETİLAÇİL- CoA RACEMASE.....	26
2.7.8. İNSAN KALLİKREİN İLİŞKİLİ PEPTİDAZ 2.....	26
2.7.9. P53.....	27
2.7.10. PROSTATİK ASİT FOSFATAZ.....	27
2.7.11. GEN FÜZYONLARI (TMPRSS2-ERG).....	27
2.7.12. TRANSFORMİNG GROWTH FACTOR-BETA 1 (TGF-B1) VE INTERLEUKİN-6 (IL-6).....	28
2.7.13. PROSTAT HASTALIKLARINDA MİKRO RNA'LAR.....	28
2.8. MİKRO RNA'LAR.....	29
2.8.1. KODLANMAYAN RNA'LAR.....	29
2.8.2. MİKRO RNA'LAR VE TARİHÇESİ.....	30
2.8.3. MİKRO RNA'LARIN FONKSİYONU.....	30
2.8.4. MİKRO RNA'LARIN BİYOGENEZİ.....	31
2.9. MİKRO RNA REGÜLASYONU.....	33
2.9.1. miRNA GENLERİNİN TRANSKRİPSİYONEL KONTROLÜ.....	33
2.9.2. miRNA GENLERİNİN EPİGENETİK KONTROLÜ.....	35
2.10. ONKOGENİK VE TÜMÖR SÜPRESÖR MİKRO RNA'LAR.....	36
2.11. KARARLILIK VE TERAPÖTİK HEDEF OLARAK MİKRO RNA'LAR.....	36
2.12. MİKRO RNA'LARIN KULLANIMI VE ÖLÇÜMÜYLE İLGİLİ PROBLEMLER.....	38
2.13. KANSER VE MİKRO RNA.....	39
2.14. PROSTAT KANSERİ VE MİKRO RNA'LAR.....	40
2.15. MİKRO RNA-141.....	42
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE MUHAFAZASI.....	44
3.2. İŞLEMLERDE KULLANILAN MALZEMELER VE CİHAZLAR.....	44
3.3. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI.....	45
3.4. SERUM ÖRNEKLERİNDEN TOTAL RNA İZOLASYONU.....	45
3.5. TOTAL RNA İZOLASYON PROSEDÜRÜ.....	45
3.6. TOTAL RNA'LARDAN cDNA ELDESİ.....	46
3.7. RT-PCR AŞAMASI.....	47

3.8. SERUM tPSA ve sPSA ÖLÇÜMÜ.....	48
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	49
IV. BULGULAR.....	50
V. TARTIŞMA.....	55
VI. SONUÇ.....	59
VII. ÖZET.....	60
VIII. ABSTRACT.....	61
IX. KAYNAKLAR.....	62

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil 1. Erkeklerde en sık görülen ilk 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızlarının dağılımları.....	4
Şekil 2. Türkiye’de 2008 yılına ait erkeklerde en sık görülen beş kanserin yaşa özel hızları (yüz binde).....	5
Şekil 3. PSA’nın değişik moleküllerinin popülasyon içindeki dağılımı....	20
Şekil 4. PSA’nın farklı moleküler formlarının oluşumu ve dağılımı.....	20
Şekil 5. Mikro RNA Biyogenezi.....	33
Şekil 6. Grupların serum PSA düzeyleri.....	51
Şekil 7. Grupların fPSA/PSA% düzeyleri.....	51
Şekil 8. Grupların serum miR141 düzeyleri.....	52
Şekil 9. BPH ve PCa gruplarında miR141’in ROC eğrisi.....	53

TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo I. PSA’ya ait farklı eşik değerlerin sensitivite ve spesifiteleri.....	14
Tablo II. Yaşa özgü PSA referans aralıkları.....	15
Tablo III. cDNA eldesi reaksiyon bileşenleri.....	46
Tablo IV. RT-PCR’da miR-141 çoğaltma işlemi için reaksiyon bileşenleri.....	47
Tablo V. Gruplara ait parametre ve yaş verileri.....	50
Tablo VI. Kontrol grubuna ait korelasyon.....	52
Tablo VII. Üç gruba ait korelasyon.....	53

KISALTMALAR

A2M	: Alpha 2-macroglobulin.
AFP	: Alpha Fetoprotein
Ago	: Argonaute
AKT	: Alpha 1-antichymotrypsin.
AMACR	: Alphametilaçil- CoA Racemase
API	: Alpha1-protease inhibitor
BPH	: Bening Prostat Hiperplazisi
BPSA	: Benign Prostat Spesifik Antijen
CEA	: Carcinoembryonic Antigen
cPSA	: Kompleks PSA
DHT	: Dihidrotestosteron
EPCA	: Erken Prostat Kanseri Antijeni
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Birliği
hK	: İnsan Kallikrein İlişkili Peptidaz
HRCP	: Hormon Dirençli Prostat Kanseri
İPSA	: İnaktif Prostat Spesifik Antijen
miR-141	: Mikro RNA-141
miRNA	: Mikro RNA
nt	: Nükleotit
ncRNA	: Kodlanmayan RNA'lar
PAP	: Prostatik Asit Fosfataz
PCa	: Prostat Kanseri
PCA3	: Prostat Kanseri Geni 3
PIN	: Prostat İntraepitelyal Neoplazi
Pol	: Polimeraz
PRM	: Parmakla Rektal Muayene

PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PSAD	: PSA Dansitesi
PSADT	: PSA Doubling Time
PSAV	: PSA Hızı
PSCA	: Prostat Kök Hücre Antijeni
PSMA	: Prostat Spesifik Membran Antijeni
qRT-PCR	: Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction
RISC	: RNA-İnduced Silencing Complex
RNAi	: RNA İnterference
sPSA	: Serbest Prostat Spesifik Antijen
tPSA	: Total Prostat Spesifik Antijen
TRUS	: Transrektal Ultrasonografi
US	: Ultrasonografi

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri (PCa) her yıl rapor edilen 899,000 yeni vaka (Tüm kanserlerin %14'ü) ile erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür (1). PCa erkeklerde kanser nedeni ölümlerde ikinci sırada gelmektedir (2). PCa'nın seyri tam olarak aydınlatılamamış olup hastalığın uzun bir latent faz ile genellikle sessiz olduğu bilinmektedir (3).

Uzun yıllar boyunca parmakla rektal muayene (PRM), PCa tespiti için birincil tanı testini temsil etmekteydi. 1980'lerin sonlarında prostat spesifik antijen (PSA), PCa tanısı için hızlı ve yaygın olarak kabul edilen bir tarama testi oldu (4). PSA, PCa tanısı ve prognozunda önemli bir ilerleme sağlamıştır (5). Bununla birlikte bu yöntemin özgüllüğü sınırlıdır çünkü benign prostatik hadiselerde; benign prostat hiperplazisi (BPH), prostatit ve idrar yolu manipülasyonlarında da serum PSA konsantrasyonu önemli ölçüde yükselebilmektedir (6). Yapılan ilk çalışmalarda 4 ng/ml eşik değeri olarak kabul edilmiştir. Ancak, PCa'lı olguların yaklaşık %20-25'inde total PSA (tPSA) değerlerinin 4 ng/ml'nin altında olduğu gösterilmiştir (7). PSA değeri 4-10 ng/ml arasında olan erkeklerin %65-70'in de ise negatif biyopsi sonucu bulunmuştur (2). tPSA değeri 4-10 ng/ml iken PCa oranı %25, 10 ng/ml üstünde ise %67'lere ulaşmaktadır. tPSA eşik değeri 4,0 ng/ml olarak alındığında PCa için duyarlılık %20, özgüllük ise %60-70 arasında değişmektedir (7). Ayrıca, serum PSA testinin geniş kullanımı her yıl yapılan biyopsi sayısında artışa yol açmıştır ki bunların çoğu kanser yönünden negatiftir. PSA, radikal prostatektomi sonrası hastaların takibinde iyi bir marker olduğu halde tanısız bir marker olarak kullanımı optimallikten oldukça uzaktır. Bu nedenle, tanı doğruluğunun iyileştirilmesi ve PCa progresyonunun ön görülmesi için acilen yeni ve daha spesifik biyomarkere ihtiyaç duyulmaktadır (8).

Son yıllarda ortaya çıkan bir araştırma alanı mikro RNA'lardır (miRNA). miRNA'lar küçük 17-27 nükleotit (nt) uzunluğunda, kodlayıcı olmayan tek sarmallı RNA molekülleridir (8). İlk olarak 1993'te keşfedilen miRNA'lar, hedef mRNA'da komplementer sekanslara genellikle 3'UTR bölgesine bağlanarak post transkripsiyonel regülatörler olarak işlev görürler (9). miRNA'ların disregülasyonu kanser gelişimiyle ilişkilendirilmektedir ve buna paralel olarak miRNA genlerinin %50 kadarı kanserle ilişkili genomik lokasyonlarda bulunmaktadır (10). Malign süreçlerde miRNA'ların sıklıkla aşırı eksprese olduğu veya down regüle olduğuna ve bu sebeple onkomirler, tümör büyüme veya süpresyon araçları gibi işlev görebileceklerine dair giderek artan ve ikna edici olan kanıtlar mevcuttur (9). PCa dahil çeşitli kanserlerin büyüme, gelişme, invazyon, metastaz ve prognozunun düzenlenmesinde yer aldıkları gösterilmiştir. Ayrıca, son çalışmalarda miRNA ekspresyon paternlerinin farklı kanserlerin fenotipik işaretleri olarak hizmet ettikleri ve diagnostik, prognostik ve terapötik araçlar olarak kullanılabilceği gösterilmiştir (8). PCa hastalarında miR-141'in up-regülasyonu idrar çökeltilerinde ve doku örneklerinden hazırlanan sellüler RNA'larda gösterilmiş ve miR-141'in PCa için diagnostik ve prognostik özelliğe sahip olduğu ileri sürülmüştür (11).

Çalışmamızda; tPSA düzeyleri 4-10 ng/ml arasında (gray zone PSA düzeyi) olan hasta grubunda miR-141 seviyesinin noninvaziv bir test olarak hekimin bu hasta grubu ile ilgili vereceği kararlardaki etkinliğini belirlemeyi amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. PROSTAT BEZİ ANATOMİSİ

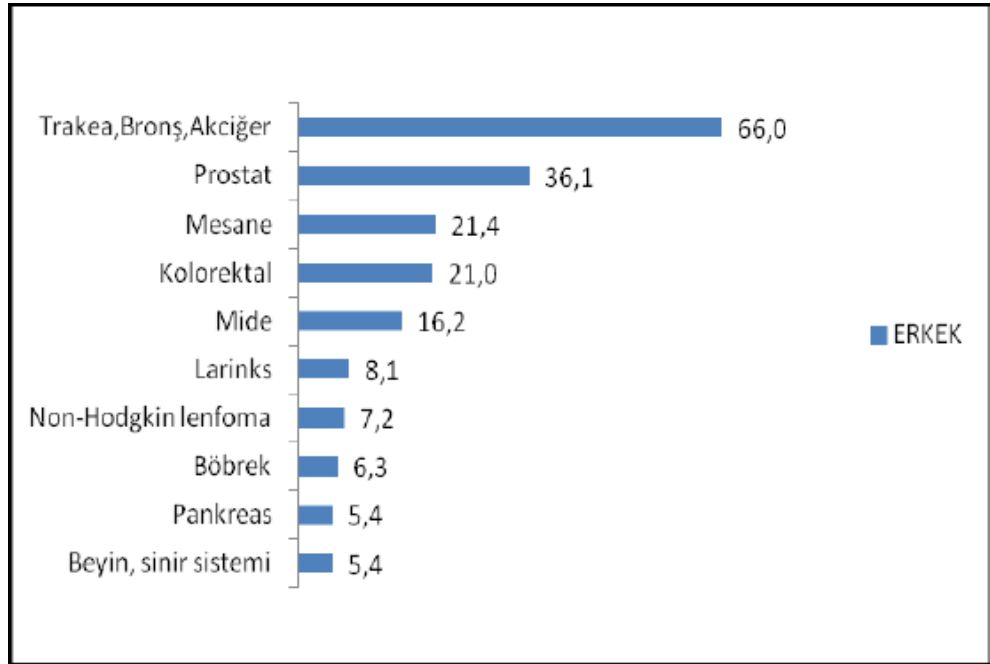
Prostat mesanenin hemen alt bölümünde bulunan fibromüsküler ve glandüler bir organdır. Normal prostat yaklaşık 20 gram ağırlığındadır ve aşağı yukarı 2,5 cm uzunluğundaki posterior üretrayı içerir. Önden puboprostatik bağlar, alt yüzden ürogenital diyaframla desteklenir (12). Prostat bezi . periferal bölge, transizyonel bölge ve santral bölge olmak üzere üç glandüler bölgeye ayrılmıştır. Aynı zamanda anterior fibromüsküler stroma adı verilen glandüler olmayan bir bölgede mevcuttur. Bölgeler arasında kanser oluşum oranları açısından belirgin farklılıklar olup, en sık periferal bölgede (%70-75) olmak üzere, transizyonel bölgede %20-25 ve sadece %10 kadarında santral bölgede ortaya çıkmaktadır. Ayrıca transizyonel bölge kanserleri periferal bölge kanserlerine göre daha az agresif ve daha düşük biyokimyasal nüks oranına sahiptir (13).

2.2. PROSTAT KANSERİ

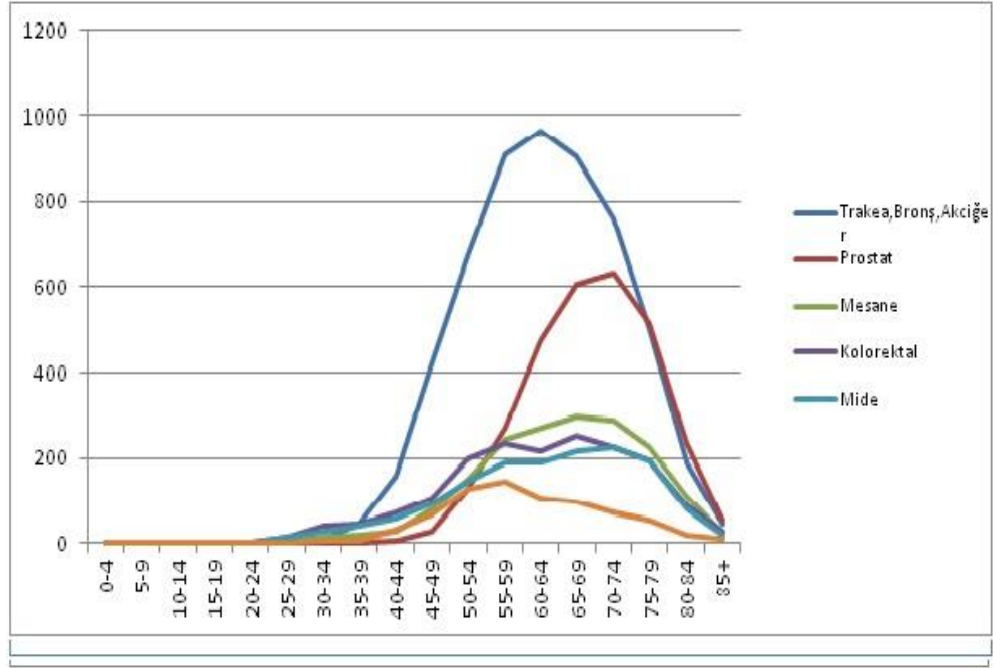
2.2.1. İNSİDANS

PCa üroloji alanındaki en önemli patolojilerden birisidir (14). PCa Birleşik Devletler'deki erkekler arasında deriyle ilgili olmayan en sık tanı alan kanser türüdür (15,16). Bununla birlikte PCa erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (17-19). 2008 yılında, dünyada 899.000 erkeğe PCa tanısı konulmuş ve bu sayının 2/3 'ü gelişmiş ülkelerde görülmüştür (20). Yalnızca kendi ırklarından oluşan nüfuslarıyla karşılaştırıldığında, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerine olan göç nüfuslarında bu hastalığın görülme sıklığı daha fazladır (21). Amerikalılar dünyadaki en büyük PCa'ne sahip olma oranına sahiptirler (22). Ancak, Chu ve ark. tarafından Afrika boyunca hastalığın görülme sıklığını karşılaştıran araştırmalarında, bölgelere göre ciddi oranda değişkenliklere rağmen PCa

oranının Afrikan Amerikalıların dışında önemli düzeyde düşük olduğunu bulmuşlardır (23). PCa'nın T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun ülkemizdeki 2009 verilerine göre %36.1'lik oranla erkeklerde görülen kanser türleri arasında 2. sırada yer almaktadır (şekil 1 ve 2) (24).



Şekil 1. Erkeklerde en sık görülen ilk 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızlarının dağılımları (Birleşik Veri Tabanı, 2009) (Dünya Standart Nüfusu 100.000 Kişide) (24).



Şekil 2. Türkiye’de 2008 yılına ait erkeklerde en sık görülen beş kanserin yaşa özel hızları (yüz binde) (25).

2.2.2. TANI SIRASINDA YAŞ

PCa, esas olarak yaşlı erkeklerin hastalığıdır. Yeni PCa tanısı konulmuş erkeklerin %75’i 65 yaşın üstündedir. 50-59 yaş arası erkeklerde PCa insidansı 1970’lerden bugüne belirgin bir şekilde artmıştır. İnsidans, 1973’te 100.000’de 35 iken, 1989’da 100.000’de 70’e yükselmiştir. İnsidans 1989’dan 1992’ye kadar olan dönemde, 100.000’de 105’e ulaşmıştır. Önemli bir nokta da, 50 yaşlarındaki erkeklerde PCa insidansı, 60 yaşındaki erkeklerden farklı olarak, 1992’den bu yana azalma göstermemiştir. Hem de, her yıl %1,9’dan daha yavaş oranda olmasına rağmen, yükselmeye devam etmektedir. Bu eğilim, tarama çalışmalarının bir özelliğidir; yeni PCa’ye daha erken yaşta tanı konulur hale gelmiştir. Açıkçası, PCa giderek orta yaş hastalığı olmaya başlamıştır (26).

2.2.3. TANI ZAMANINDA EVRE

PCa insidansındaki dramatik değişikliklere ek olarak, tanı zamanındaki PCa evresinde de bir değişiklik olmuştur. PSA’nın

uygulamaya girmesinden bugüne, lokal-bölgesel hastalığın insidansı artarken, metastatik hastalığın insidansı azalmıştır. Lokal-bölgesel hastalığın tanısı, (hem klinik hemde patolojik evreleme kullanılarak) 1988 ile 1992 yılları arasında beyaz erkeklerde yıllık olarak %18,7 oranında artmış ve 1995 süresince, yıllık ortalama %9,8 oranında azalmıştır. Bunun aksine metastatik hastalık insidansı, 1988'den 1992'ye yıllık olarak %1,3 azalmış ve 1995 süresince yıllık olarak, belirgin bir şekilde %17,9 oranında azalmıştır. Bu değişikliklere paralel olarak, klinik lokalize PCa'nden dolayı radikal prostatektomi ile tedavi edilmiş erkeklerin yüzdesi, 1983'te %7 'den, 1992'de %32 'ye yükselmiştir (26).

2.2.4. MORTALİTE

ABD'de PCa mortalitesi 1970 ve 1980'ler süresince yavaş bir şekilde artmıştır. Bu artış yıllık olarak, beyazlar ve Afrikalı Amerikalılarda sırasıyla, %0,7 ve %1,6 oranında görülmüştür. PCa mortalitesi, 1987 ve 1991 arası (Afrikalı Amerikalı için 1992) yıllık oran ortalama %3,1'e yükselmiş, daha sonra 1995 süresince yıllık %1,9'a gerilemiştir. Dikkat çekici bir bulgu, 85 yaşından daha yaşlı erkeklerin bulunduğu bir alt grupta mortalitede artış olurken, tüm yaşlı grup ele alındığında azalma görülmektedir. PCa mortalitesinin, yaşlı popülasyonun artmasına rağmen bile azalmakta olduğu görülmektedir (26).

PCa'nde PSA ile yaygın olarak yapılan taramalar sonucunda, metastatik hastalığı ve PCa tanısı alan erkekler için ölüm oranlarında önemli bir azalmaya yol açmıştır (27). Bu sonuç, PCa mortalite oranlarının, PSA testi henüz rutin olarak kullanılmaya başlanmamış ülkelerde azalmadığı göz önüne alındığında, özellikle inandırıcı gözükmektedir (26).

2.2.5. ETYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

PCa'ndeki pek çok tedaviye rağmen, hastalığın gelişimi ve ilerleyişi ile ilgili etyolojik faktörler hakkında çok az şey bilinmektedir (28). Prostat

karsinogenez oluşumuna katkı sağlayan hem kalıtsal hem de çevresel faktörler vardır ancak şurada yalnızca yaş, ırk ve aile geçmişi tanımlanmış risk faktörleridir (29). PCa'ndeki diğer potansiyel risk faktörleri arasında hormon, vazektomi, diyet ve çevresel faktörler, enfeksiyon, boy-kilo, seksüel aktivite, sigara ve alkol sayılmaktadır (30).

2.3. PROSTAT KANSERİNDE TANI VE TARAMA

2.3.1. PROSTAT KANSERİNDE SEMPTOMLAR

Çoğunlukla biyolojik davranışı düşük olup yavaş ilerleyen bir hastalık olduğundan PCa geç semptom verir. Ancak hepsi aynı şekilde seyretmez. Bazı formları agresif olabilir ve vücudun diğer bölümlerine hızlıca yayılabilir. PCa'ne neyin neden olduğu ve bazı tiplerinin neden farklı olduğu bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar aile hikayesinin, etnik kökenin, hormonların, diyet veya çevre koşullarının rollerinin olabileceğini göstermektedir (30).

PCa'ndeki problem, kanserin kolayca tedavi edilebildiği erken evrede herhangi bir belirti vermemesidir. Bu yüzden PCa'lerinin %40'ına prostat dışına yayıldıktan sonra tanı konur. Dizüri, idrar akımında yavaşlama, pollaküri ve idrar retansiyonu gibi prostatizm semptomları ile beraber kemik ağrılarının olması PCa için spesifik olamamasına rağmen, kanser şüphesi olan hastalarda en önemli bulgulardır (30).

2.3.2. TANI VE TARAMA YÖNTEMLERİ

PCa'nın değerlendirilmesinde ilk olarak, primer yada tekrarlayan tümörün prostat bezi içindeki boyutu, multifokalitesi, ekstrakapsüler uzantısı, seminal vezikül uzantısı, nörovasküler demet tutulumu ve mesane tutulumunun belirlenmesi gerekir. İkinci olarak, lenf düğümlerine ve kemiklere yayılım gibi uzak metastazları değerlendirmek için görüntüleme

yöntemleri kullanılabilir. Üçüncü olarak, prostat biyopsisi gibi müdahalelerde görüntüleme yöntemleri kullanılabilir (31).

PCa'lı hastaların prognozunun iyileştirilebilmesi için hastalığın erken teşhisi gereklidir. Günümüzde tanı amaçlı kullanılan yöntemler tPSA testi, PRM, transrektal ultrasonografi (TRUS) ve TRUS eşliğinde iğne biyopsisidir (32-36).

2.3.3. KLİNİK KARAR VERMEYİ GELİŞTİRMEK İÇİN RİSK FAKTÖRLERİNİ MARKERLARLA ENTEGRE EDEN KARAR ANALİZ ARAÇLARI

PSA ve PRM bulgularına ek olarak yaş, ailede PCa öyküsü, etnisite, diğer herediter ve çevresel faktör ve özellikler (örn; diyet, vücut kitle indeksi, suplement kullanımı gibi) ve kanser için negatif sonuçlara sahip olan önceki bir biyopsi gibi önemli başka risk faktörleri de mevcuttur. Tarihsel olarak, doktorlar bir hastanın risk faktörünü medikal literatürle klinik ve anektodal deneyimlerini kombine ederek belirlemiştir ancak böyle bir yaklaşım açık şekilde önyargılı olmaktadır. İstatistiksel modelleri baz alan yazılı prediktif/prognostik araçlar daha doğru tahminler sağlarlar ve geniş ölçüde ulaşılabilirlerdir. Bu modeller rutin olarak klinik görüşten daha iyi veya eşit seviyede işe yaramaktadır. Risk hesaplaması ve potansiyel sonuçları, bu bilginin avantaj ve dezavantajları ve sonraki tedavi seçenekleri biyopsiden veya biyopsinin tekrarlanmasından önce hasta ile tartışılabilir. Hasta daha sonra ilişkin hastalık, tedavi ve tedavi sonrasındaki fonksiyonel değişiklikleri göz önüne alarak biyopsi yapılıp yapılmamasına karar verebilir. Sonuçta bu danışma süreci bir biyopsi yapılacaksa daha iyi bilgilendirilmiş bir hasta oluşmasını sağlayacaktır (37).

2.3.4. PARMAKLA REKTAL MUAYENE

PCa taramasında kullanılan iki major yöntem olan PRM ve serum PSA testlerinin taramadaki kısıtlı özellikleri gerçeği ışığında tartışma konularıdır

(38). PCa taraması için yapılan PRM kullanımı ile ilgili çalışmaların çoğu gözlemsel olmuş ve hastalığın sensitivite ve sağ kalımla ilgili önlemler vermiştir. Fakat hiçbiri PRM taramasının PCa'dan ölümü azalttığını göstermemiştir (39).

PRM prostatın tam büyüklüğünü belirlemede nispeten zayıf bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (40). Bazı tarama çalışmalarında PSA'nın bir tamamlayıcısı olarak PRM kullanılmıştır (41).

PCa için incelemelerin (endurasyon veya nodüleritenin) yaklaşık %3-6'sında anormal sonuçların bulunmasıyla şüpheleri kaldırması beklenmektedir. Muayenenin prediktif değeri hastanın yaşı, ailede PCa hikayesi ve PSA konsantrasyonu ile önemli ölçüde değişir. PSA düzeyleri düşük olan (<4.0 ng/ml) erkeklerde, yapılan PRM elde edilen anormal sonuçların pozitif prediktif değerinde düşük olup gereksiz prostat biyopsilerinin yapılmasına neden olmaktadır. Bu hastalarda tespit edilen tümörlerin çoğunun tesadüfen bulunan, şüpheli ve düşük klinik önemi vardır (42).

2.3.5. TRASREKTAL ULTRASONOGRAFİ (TRUS) VE TRUS EŞLİĞİNDE BİYOPSİ

TRUS prostat bezi görüntülenmesi için en sık kullanılan yöntemdir (31,43). TRUS prostat büyüklüğünün doğru olarak tespit edilmesini ve 'PSA yoğunluğu' (PSA/prostat hacmi) değerinin belirlenmesinde yararlıdır, ancak kanser odaklarını belirlemede sınırlılıkları mevcuttur (43).

TRUS eşliğinde yapılan prostat iğne biyopsisi PCa'nın tanısında altın standarttır (44). TRUS eşliğinde biyopsi düşük komplikasyon ve iyi tolerans oranlarını sunuyor olsada, invaziv bir prosedür olduğu için komplikasyon, zorluk ve hasta için ağrı işlemin doğasında vardır. Tüm bu nedenlerden

dolayı işlemin yapılırken prosedürün hızlı, güvenli ve etkili yapılmasına dikkat edildiğinde komplikasyon oranları önemli oranda azalmaktadır (45).

Hastalar tarafından iyi tolere edilebilen ve nispeten güvenli olan bu yöntemin ağrı, hematüri, hematospermi ve rektal kanama gibi minör komplikasyonlar ile nadiren görülebilen sepsis, hematom ve üriner retansiyon gibi majör komplikasyonları görülebilmektedir (46).

2.6. PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN

PCa ciddi ve yaygın olarak görülen, genellikle yavaş seyirli bir hastalık olup tüm tanı ve tedavi işlemlerinin yeterli olması için prelinik fazda hastalığın taranması gerekmektedir (47). PCa için ideal bir tarama testi 'kansere mevcut' yada 'kansere mevcut değil' şeklinde sonuçlar verebilmelidir (48). PCa'da taramanın mortalite ve yaşam kalitesi üzerine etkisi belirsizliğini korumaktadır (49).

PSA'yı ilk tarifleyen yayın 1960 yılında yayınlanmıştır (50). 1986 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) tarafından PCa'lı hastaların tedavi yönetimine yardımcı bir test olarak onay almıştır (50-52). 1994 yılında yine FDA tarafından PCa'nın erken tanısında kullanılabilecek bir tarama aracı olarak onay almıştır (50,52). PSA başlangıçta PCa'nde tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde bir marker gibi lanse edildi. 1991 yılında Catalona ve ark. PSA ölçümünü PCa'nın taramasında kullanılmasını ve üst sınırın 4 ng/ml olmasını önermişlerdir (53).

PSA prostat bezine spesifik olmasına karşın PCa'ya spesifik değildir. Serum PSA düzeyi çeşitli ilaçlar, BPH, prostatit, ve ürolojik manipulasyonlarla değişebilmektedir (54). Buna rağmen tPSA düzeyi gelecekteki PCa riskinin güçlü bir göstergesidir. 1995 yılında yapılan bir çalışmada, Gann ve ark. bazal PSA düzeyinin daha sonraki PCa riski ile ilişkisini göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada özellikle, bazal PSA düzeyi

2-3 ng/ml arasında olan erkeklerle bazal PSA düzeyi <1 ng/ml olan erkekler karşılaştırıldığında kanser riskinin rölatif olarak 5.5 kat arttığını belirtmişlerdir (55). PSA sadece PCa için geçerli bir biyomarker değil aynı zamanda hastalığın agresifliği ile de ilgilidir. Yapılan analizlerde kanser tanısı alan hastalarda düşük PSA düzeyi olanların organa sınırlı olması daha muhtemel olmakla birlikte, kötü patolojik tümör özelliklerinin PSA türevleri dahil PSA yoğunluğu, PSA artış hızı ve gleason skoru ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (56).

2.6.1. PSA BİYOLOJİSİ

PSA prostat epitelyum hücrelerinden üretilen insan kallikrein ailesinden bir serin proteazdır (57). 19. Kromozomun uzun kolunda q13.2-q13.4 lokalizasyonunda yer alır (7). PSA %93 aminoasit ve %7 karbonhidrat içeren tek zincirli glikoprotein yapısındadır (58). 237 aminoasit içeren PSA yaklaşık olarak 33 kDa ağırlığındadır (59). PSA inaktif proenzim (proPSA) olarak seminal sıvı içerisine salgılanıp, İnsan Kallikrein ilişkili Peptidaz 2 (hk-2) ve prostat tarafından üretilen diğer endopeptidazlar tarafından aktif hale getirilir (57,60). Hem normal hem de kanseröz prostat dokusunda üretilir ve seminal sıvı içine sekrete edilir (61). tPSA'nın yarılanma ömrünü, Stamey ve arkadaşları 2,2±0,8 gün olarak hesaplamışlardır. Buna göre radikal prostatektomi gibi PCa'yı tedavi etmek üzere uygulanan girişimlerden sonra PSA'nın serum seviyesinin azalması birkaç hafta sürebilir (62). Serbest PSA (sPSA)'nın yarılanma ömrünün 2 saat olduğu ve boyutunun daha küçük olması nedeniyle böbrekler tarafından elimine edildiği bilinmektedir. PSA-alpha 1-antichymotrypsin (AKT) ve PSA-alpha 2-macroglobulin (A2M) kompleksleri, boyutlarının büyük olmasından ötürü reseptör bağımlı endositoz yoluyla karaciğer tarafından vücuttan uzaklaştırılır (63). Normal prostat yapısı PSA'yı beze sınırlı tutar ve yalnızca çok ufak bir miktarı dolaşıma sızdır. PSA serbest ve kompleks formlarda dolaşımda bulunur. Serbest formlar tPSA'nın %5-35'ini oluşturur. Kompleks formlar (%65-95) proteaz inhibitörlerine bağlıdır. İnaktif proteazlarla PSA'nın bağlanması katalitik bir aktiviteye sahip

değildir. Serum PSA yükselmeleri PSA'nın dolaşıma girmesine müsaade eden prostat yapı bozukluklarında görülür. Bu durum hastalıklarda (PCa, BPH, veya prostatit) veya prostat manipülasyonu (masaj, biyopsi veya transüretal rezeksiyon) sonrasında görülebilir. PCa hastalarındaki yüksek seviyeler artmış sentezle açıklanamaz. Aslında kanser dokusunda PSA ekspresyonu hafif derecede azalmaktadır. PSA ekspresyonu androjenlerden güçlü şekilde etkilenmektedir. Finasteride ve dutasteride gibi 5 α -redüktaz ajanları kullanılan hastalarda PSA seviyelerinde % 50 azalma gösterilmiştir ve gerçek PSA seviyesinin hesaplanması için değerlerin ikiyle çarpılması önerilmiştir (61).

Etnisite, yaş ve vücut kitle indeksinde PSA seviyesini etkileyebilir. PCa olmayan siyah erkeklerde muhtemelen benign prostat dokusunda daha yüksek ekspresyona bağlı olarak beyazlara kıyasla daha yüksek PSA seviyeleri görülmektedir. Obez erkeklerde estrogen etkisine bağlı olması muhtemel olan daha düşük PSA seviyeleri belirgin bir kanserin varlığını maskeleyebilir (61).

2.6.2. PSA FİZYOLOJİK FONKSİYONU

PSA prostat dokusunun kolumnar epitelyum hücrelerinden üretilir. Oluşan PSA, bu kolumnar hücrelerin etrafındaki bazal hücre tabakasını, bazal membranı, düz kas ve fibroblastları, kapiller membranı ve endotelial hücreleri aşarak sistemik dolaşıma katılır. Seminal sıvının jel kıvamını sağlayan semenogelin ve fibronektin proteinleri üzerine etki ederek seminal sıvının likefaksiyonunu sağlar (7). Fizyolojik fonksiyonu jel formda olan semeni sıvılaştırmaktır (61).

2.6.3. PSA EŞİK DEĞERİ

PCa riski serum PSA seviyesine göre değişkenlik gösterir. İlk olarak, bir erkekte biyopsi uygulanması için eşik değer olarak 4.0 ng/ml seviyesi belirlenmiştir. Bu değer 40 yaşın üzerindeki erkeklerin %97'sinde ≤ 4.0

ng/ml değerlerin bulunduğunu gösteren çalışmalar baz alınarak belirlenmişti. Bu eşik değerinin sensitivite ve spesifitesi sırasıyla % 20 ve % 94 idi. 4.0 ng/ml eşik değeri yalnızca %37 pozitif prediktif değere ve % 91 negatif prediktif değere sahipti (61). PSA ölçüm eşiği 4 ng/ml olarak kabul edilip, PSA değerinin 10 ng/ml altındaki spesifikliğin kötü olmasına rağmen 4 ng/ml eşiğini aşan durumlarda prostat biyopsisi yapılmalıdır. PSA düzeyi 4-10 ng/ml arasındaki erkeklerin %25-40'ı PCa olup, %60-75'ine de gereksiz biyopsi yapılmaktadır (53,64).

Düşük PSA seviyeli erkeklerde prostat biyopsileri nadiren yapıldığından PSA'nın spesifite ve sensitivitesinin tam belirlenmesi güçtür. "The Prostat Cancer Prevention Trial" düşük PSA seviyesine ve normal PRM bulgularına sahip erkeklerde PCa insidansı ve agresifliğini değerlendiren ilk çalışmadır. Plasebo grubundaki tüm erkeklere 7 yıllık çalışmanın sonunda prostat biyopsisi önerilmiş. Genel olarak, plasebo grubunda kanser tespit oranı %15 olduğu ve bu hastaların %15'inde yüksek dereceli prostat kanseri bulunmuş. PSA seviyeleri ≤ 0.5 , 0.6-1.0, 1.1-2.0, 2.1-3.0, ve 3.1-4.0 ng/mL olan erkeklerde prostat kanseri insidansı sırasıyla %7, %10, %17, %24 ve %27 idi. 2.0 ng/ml üzerinde PSA seviyesi olan hastalarda kanser insidansı PSA seviyesi 4.0 ve 10.0 ng/ml olanlardan çok az farklıydı. Bu çalışma PCa'nın 4.0 ng/ml altındaki PSA seviyelerinde nadir görülmediğini ve agresif PCa'nın 1.0 ng/ml altındaki PSA değerlerine sahip hastalarda bile bulunabileceğini göstermiştir (61).

Tablo I, farklı PSA eşiklerinin sensitivite ve spesifitelerini göstermektedir. PSA eşiğini düşürerek tespit oranını artırma çalışmaları daha yüksek yanlış negatiflik oranına neden olmaktadır. Örneğin eşiği 2.6 ng/ml'ye düşürmek sensitiviteyi % 40'a artırırken yalancı pozitifliği de % 18.9'a artırmaktadır ve daha fazla gereksiz biyopsiye neden olmaktadır. 4.0 ng/ml üzerindeki eşik değerleri bazı agresif kanserleri atlayabilir (61). Anterior ve ark. PSA değeri 4.0 ng/ml üzerinde tespit edilen PCa'ların üçte birinin ekstrakapsüler hastalıklarının bulunduğunu ve PSA seviyeleri 2.6-

4.0, 4.1-7.0, ve 7.1-10.0 olan hastalarda radikal prostatektomide organa sınırlı hastalık tespit ihtimalinin sırasıyla %81, %74 ve %72 olduğunu göstermiştir (65).

Pozitif aile PCa öyküsü de önemlidir. Bu erkeklerde PSA seviyesi < 0.5, 0.5-1.0, 1.1-2.0, 2.1-3.0, ve 3.1-4.0 olanlarda PCa tanısı olasılığı sırasıyla % 20, % 13, % 17.9, % 29.4 ve % 77.8 bulunmuştur (61).

4.0 ng/ml eşik değeri hem kanseri belirleyememesi (yüksek dereceliler dahil) hem de gereksiz prostat biyopsilerine yol açması nedeniyle eleştirilmektedir. Yalnızca bir PSA değeri ile biyopsi önerilmesi uygun olmayabilir. Tek bir değer erkekleri kesin şekilde yüksek veya düşük risk grubuna koyamaz. PSA tanısız değildir; bir erkeğin PCa riskini değerlendirmeye yardımcı olur ve biyopsinin ne zaman yapılmasının uygun olacağını belirlemek için diğer parametrelerle birlikte kullanılmalıdır (61).

Tablo I. PSA'ya ait farklı eşik değerlerin sensitivite ve spesifiteleri (61).

PSA(ng/mL)	Sensitivite(%)	Spesifite(%)
1.1	83.4	38.9
2.1	52.6	72.5
2.6	40.5	81.1
3.1	32.2	86.7
4.1	20.5	93.8
6.1	4.6	98.5

2.6.4. YAŞA ÖZGÜ PSA REFERANS ARALIKLARI

Serum PSA seviyesi ile hasta yaşı arasında bir korelasyon çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Oesterling ve ark. 60 yaşındaki bir erkekte PSA seviyesinin yılda 0.04 ng/ml ile %3.2 arttığını göstermişlerdir. Normal serum PSA seviyesini belirlemek için 95 persentil kullanarak farklı yaş grupları için referans aralıkları belirlemişlerdir (Tablo II) (66). Diğer

araştırmacılar da benzer şekilde yaşa özglü referans aralıkları öne sürmüştür. Ancak kanser tespitinde yaşa özglü aralıkların kullanımına ilişkin çelişkili veriler bildirilmiştir (67). 1726 erkekte yapılan bir tarama çalışmasında Bangma ve ark. biyopsi endikatörü olarak yaşa özglü PSA referans aralıklarının ve PRM kullanımı ile biyopsilerde %37 azalma sağlanacağını ancak kanserlerin de %12'sinin tespit edilemeyeceğini bildirmiştir (68).

Tablo II. Yaşa özglü PSA referans aralıkları (66).

Yaş (yıl)	PSA aralığı(ng/ml)
40–49	0.0–2.5
50–59	0.0–3.5
60–69	0.0–4.5
70–79	0.0–6.5

Oesterling ve ark. yaşa özglü referans değerlerinin kullanımı ile çoğu klinik olarak önemsiz olan %0.6 oranında tümörün tespit edilememesine rağmen 1686 biyopsinin %5.5'inin önlenebileceğini göstermişler (69). Yaşa özglü referans değerlerine ilişkin çelişkili veriler olması ve kullanımlarının genç erkeklerde daha yüksek gereksiz biyopsi oranına yol açarken yaşlılarda ise potansiyel iyileşme olasılığı bulunan hastalıklarda tanıyı geciktireceği endişesi klinik pratikte kullanımlarını tartışmalı hale getirmektedir (67).

2.6.5. PSA VELOSİTESİ

PCa olan ve olmayan erkekleri ayırt etmek için PSA hızı ilk olarak Carter ve ark. tarafından ortaya atılmıştır. Retrospektif bir çalışmada PSA yükselmesindeki artış hızının PCa'lerde BPH hastalarına kıyasla daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Yılda 0.75 ng/ml'nin üzeri olarak belirtilen yüksek PSA hızı PCa'lı hastalarda hastalık klinik olarak belirginleşmeden 9 yıl öncesine kadar gözlenebilmiştir (70). Bu tekniğin uygulanabilirliği PSA testinin intrinsek biyolojik değişkenliği ve aynı üreticinin ürettiği testlerin sürekli kullanımı zorunluluğu nedeniyle kısıtlıdır. Bir çalışmada erkeklerin

%12.5'inde tek bir yılda 0.75 ng/ml üzerinde PSA artışı görülürken, 2 yıllık tüm gözlem periyodu ele alındığında yalnızca bir kişide yılda 0.75 ng/ml üzerinde persistan PSA artışı görülmüştür. Bu açıdan bakıldığında en az 18 aylık bir periyotta en az 3 farklı zamanda PSA ölçümü yapmak gerekmektedir. Genel olarak, PSA hızı ilk taramada serum PSA seviyesi normal sınırlar içinde olan hastalarda en çok fayda sağlayabilir ancak, PSA seviyesi 4-10 ng/ml olan hastalara biyopsi yapılıp yapılmayacağını belirlemede çok faydalı değildir (67).

2.6.6. PSA DENSİTESİ

PSA prostatik epitelyal hücrelerde üretildiği için daha büyük prostat bezinin daha çok PSA üretmesi mantıklıdır. Bu nedenle, PCa'yı benign büyümeden ayırt etmede PSA seviyesinin prostat boyutuyla ilişkili şekilde değerlendirilmesi başka bir faydalı yoldur (71). BPH ve prostat büyüklüğünü kompanse etmek için, TRUS prostat hacmi ölçümünde kullanılmaktadır (72). PSA densitesini (PSAD) hesaplamak için PSA seviyesi basitçe tipik olarak TRUS ile ölçülen prostat hacmine bölünür. Benson ve ark. ortalama PSAD değerinin PCa'lı erkeklerde BPH hastalarına kıyasla hafif derecede yüksek olduğunu bulmuştur. PSAD kullanımına ilişkin bir güçlük PRM ile prostat hacim değerlendirmesinin özellikle güvenilir olmaması nedeniyle US kullanımını zorunlu kılmıştır. US basit bir serolojik testten daha invaziv olduğu için tipik olarak yalnızca prostat biyopsisi sırasında yapılmaktadır ve bu nedenle prostat biyopsisi gereksiniminin belirlenmesinde kullanışlı olmayabilir. Buna karşın pozitif prostat biyopsisi olan erkeklerde PSAD prognozun belirlenmesinde faydalıdır (71). Radikal prostatektomi ile tedavi edilen 773 erkeği kapsayan çok merkezli bir çalışmada preoperatif PSAD değeri <0.15 olan erkeklerin % 74'ünde olumlu patoloji bulunurken yüksek PSAD seviyelerine sahip olanların ise yalnızca %36'sında olumlu patoloji saptanmıştır (73). Bu nedenle, PSAD PCa agresifliğinde aktif araştırmanın mantıklı bir yaklaşım olup olmadığının belirlenmesinde bir marker olarak kullanılmaktadır (71).

2.6.7. PSA KİNETİKLERİ

PSA hızı (PSAV) ve PSA doubling time (PSADT) lokalize ve ilerlemiş PCa'lı erkeklerde PSA veya PSA kinetiklerindeki değişimleri tanımlamak için en sık kullanılan ölçütlerdir. PSAV ve PSADT farklıdır. PSAV PSA değişim hızı veya genellikle ng/ml olarak belirtilen yıllık değişim iken PSADT PSA'nın ikiye katlanması için geçen süredir ve genellikle ay veya yılla ifade edilir. PSADT PSA ile zaman arasında üstel bir ilişki olduğunu varsayar ve PSA'nın zamanla logaritmik değişiminin regresyonu ile hesaplanır. Carter tarafından yapılan orjinal PSAV tanımı için kullanılan başka bir yaklaşım ise iki zaman arasındaki ortalama PSAV'nin ölçümü, bir sonraki iki zamanda tekrar ölçümü ve toplamın ikiye bölünmesidir. Bu yaklaşım PSA ile zaman arasında doğrusal bir ilişki olmadığını varsaymaktadır. PSAV ölçümü için zaman aralığı da tartışmalı bir konudur (74).

2.6.8. PSA FLUKTASYONLARI

Erkeklerde PSA zaman zaman dalgalanmalar göstermektedir. Bu dalgalanmalar çoğu erkekte göreceli olarak ılımlı olmasına rağmen PSA düzeyi eşik değer üzerinde olanlarda test tekrar edildiğinde PSA düzeyinin eşik değerin altında olduğu görülebilir. Artık rutin olarak PSA düzeyi yüksek olan bir erkekte birkaç ay bekleyip testin tekrar edilmesi, sadece PSA düzeyi yüksek olarak devam edenlerde biyopsi uygulanmaktadır (75).

2.6.9. TOTAL PSA

Serumda ölçülebilen tPSA; proteolitik olarak aktif olan sPSA ve AKT'ye bağlı PSA'dan oluşmaktadır (7). tPSA'nın yaklaşık %65-95'i AKT (PSA-AKT) ile bağlı halde iken, tPSA'nın sadece %5-35'i ise sPSA olarak bulunmaktadır (76).

2.6.10. SERBEST PSA

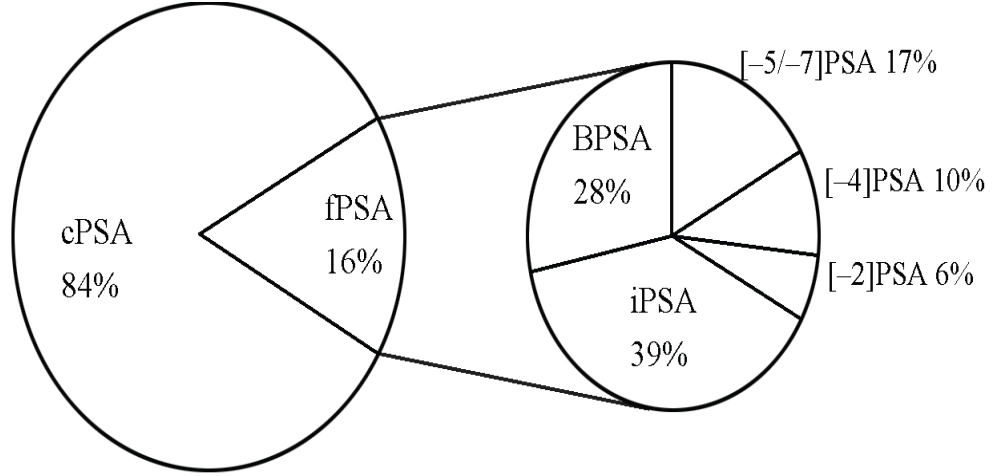
Bir serin proteaz olan PSA hem serbest (diğer proteinlere bağlı olmayarak) hem de kompleks PSA (temel olarak proteaz inhibitör AKT'ye bağlıdır) şeklinde çeşitli formlarda serumda bulunmaktadır (37).

Serumun içindeki sPSA; enzimatik olarak inaktif PSA'nın en az üç belirgin formunun bir araya gelmesinden oluştuğu bilinmektedir. Birinci form, güncel çalışmalarda PCa ile ilişkilendirilen PSA'nın öncü bir formu veya proenzim şeklinde olan proPSA'dır. PSA'nın İkinci formu : Yüksek oranda BPH ile ilişkilendirilmiş, PSA'nın içten bölünmüş yada parçalanmış şekli olan benign prostat spesifik antijen (BPSA) formudur. PSA'nın üçüncü bileşen formu pek net değildir. Fakat genel ölçüde doğal ve aktif PSA'yı enzimatik olarak inaktif yapan yapısal ya da yapısal değişiklikler dışında inaktif PSA (İPSA)'ya benzerdir. sPSA'yı oluşturan bu üç tane izoform (proPSA ,BPSA ve İPSA) sPSA'nın sırasıyla yaklaşık olarak % 33, %28 ve %39 oranlarında kapsağı tahmin edilmektedir. Bu tahmin oranları, PSA'nın değişik moleküllerinin popülasyon içindeki dağılımı şekil 3 ve 4'te gösterilmiştir (76).

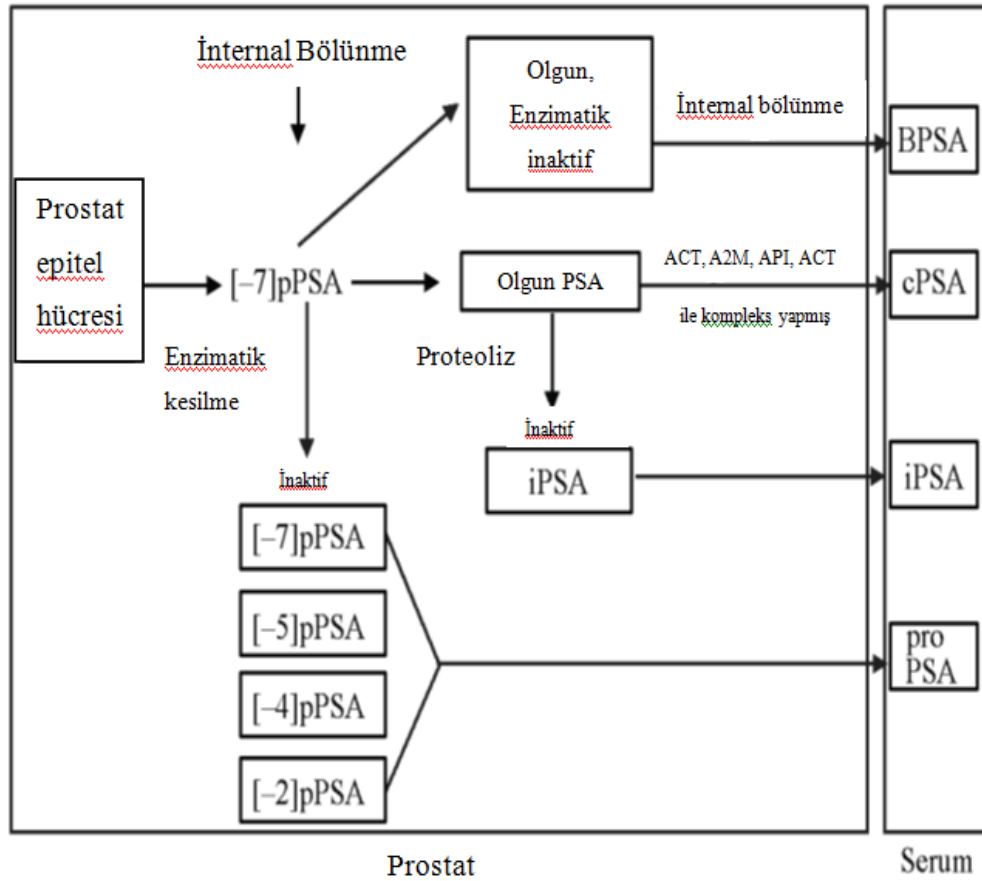
FDA 4 ile 10 ng/ml arasında tPSA seviyesine sahip erkeklerde tPSA'ya ek olarak serbest PSA yüzdesi testinin $[(sPSA/tPSA) \times 100]$ kullanımını onaylamıştır. Çeşitli çalışmalar serbest PSA yüzdesinin BPH'li erkeklerle PCa hastalarının ayırımına yardımcı olduğunu gösterirken bu etkinin boyutu çalışma popülasyonları arasında değişkenlik göstermektedir. Bu tutarsızlıkların gerekçesi kanda, özellikle de serumda sPSA'nın stabilitesinin kısıtlı olması ile açıklanabilir (37). Serumdaki sPSA/tPSA oranını etkileyen yaş, prostat büyüklüğü, prostat manipülasyonu, ilaç alımı, örnek kararlılığı ve test yöntemleri gibi çeşitli faktörler yapılan çalışmalarda gözden geçirilmiştir (77). Ek olarak, geniş prostat hacmine sahip PCa hastalarında yüksek sPSA yüzdeleri olmaktadır ve bu sebeple dilüsyon etkisine bağlı olarak düşük spesifite ile sonuçlanmaktadır. Son olarak, klinik

karar verme aşaması için en uygun sPSA eşik değeri tartışmalıdır ve sPSA yüzdesi sürekli bir risk değişkeni olarak daha değerli olabilir (37). Roddam ve ark. yaptıkları 66 çalışmalık bir meta-analizde sPSA yüzdesinin biyopsi sonucu prediktörü olarak tPSA ve kompleks PSA (cPSA)'dan daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir (78). Luderer ve ark. yaptıkları karşılaştırmalı bir araştırmada sPSA yüzdesinin gray zonda diyagnostik performansının PSA'yı aştığını raporlamışlardır (79).

Sonuç olarak sPSA yüzdesi genç erkeklerde PCa mevcudiyeti için bir uzun vadeli prediktör olarak daha az kullanışlı olabilir (37). Ulmert ve ark. ≤ 50 yaşında 4.900 'den fazla erkekte oluşan oldukça yüksek örneklem sayısına sahip retrospektif bir çalışmada PSA izoformlarının değerini araştırmıştır. 44 ile 50 yaş arasındaki tüm erkeklerde tPSA, sPSA, sPSA yüzdesinin kombinasyonunun özellikle ≥ 2.0 ng/ml olmak üzere ≥ 1.2 ng/ml PSA'ya sahip erkeklerde faydalı olsa da tek başına tPSA'nın prediktif gücünü arttırmadığı bulunmuş (80). Ek olarak, Vickers ve ark. 59 ile 61 yaş arası erkeklerde sPSA yüzdesi, hK2 ve tPSA kombinasyonunun tek başına PSA'ya kıyasla anlamlı derecede üstünlüğü olduğunu gösterirken bu kombinasyonun başlangıçta ≤ 50 yaşında olan erkeklerde kanser riski tahminini güçlendirmedini bulmuştur. Bu bulgunun olası bir açıklaması; tPSA ölçümü ile kanser tanısı arasında kısa bir süre geçmesi ve yaşlı erkeklerde artmış BPH sıklığının hem serbest PSA yüzdesi hem de hK2 prediktif değerini artırırken tPSA prediktif değerini düşürmesidir (81).



Şekil 3. PSA'nın değişik moleküllerinin popülasyon içindeki dağılımı (76).



Şekil 4. PSA'nın farklı moleküler formlarının oluşumu ve dağılımı. AKT: alpha 1-antichymotrypsin. A2M: alpha2-macroglobulin. API: alpha1-protease inhibitor (76).

2.6.11. KOMPLEKS PSA

PSA'nın spesifikliğini geliştirmek için 1990'ların başlarında serumdaki PSA'nın farklı moleküler formları yapılan klinik çalışmalarda gösterilmiştir. PSA serbest ve kompleks şekilde serumda dolaşmaktadır. PSA'nın yaklaşık %70-90'ı serumdaki serin proteaz inhibitörleri ile oluşturduğu birleşik yapı cPSA olarak adlandırılmaktadır. cPSA AKT (PSA-AKT), A2M (PSA-A2M) ve API (PSA-API) gibi proteaz inhibitörlerine bağlı durumdadır (76).

2.6.12. ProPSA

Şekil 4'de gösterildiği gibi, PSA gibi proPSA'da prostatın lüminal epitel hücrelerinden salgılanan, 237 aminoasit bulunduran matür PSA'ya 7 aminoasitten oluşan pro-lider peptit eklenmesiyle 244 aminoasit içeren inaktif proenzim yapısındadır. ProPSA'nın lümene salınmasından hemen sonra hızlıca hK-2 ve hK-4 tarafından pro-lider kısmı yer değiştirir ve aktif hale gelir. Bu lider dizisinin kısmi yer değişimi proPSA'nın diğer kesik formlarının tanımlanmasına yol açmıştır. Böylelikle teorik olarak proPSA'nın 7 izoformu var olmalı, ancak erkeklerin serumunda sadece -1, -2, -4, -5, -7 pPSA gösterilebilmiştir. -3 ve -6 pPSA'nın varlığına dair hala hiçbir kanıt yoktur. Bu proPSA'nın kesik formları pro-lider peptitlerin posttranslasyonel proteolitik ayrılması olarak varsayılır. Bu kesik proPSA'ların her formu enzimatik olarak inaktif pro-lider aminoasit kalıntılarını içerir (76).

ProPSA proteinin çeşitli şekillerde kesilmiş formlarının yükselmiş seviyeleri, PCa ile ilişkilendirilmiştir (82). Yapılan çalışmalarda özellikle PSA düzeyi 2-10 ng/ml aralığında olan hastalarda [-2] proPSA'nın tespiti PSA'nın PCa üzerindeki spesifikliğini arttırdığı ve kanserin agresifliğiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (83-85). 2012 yılında PSA düzeyi 4-10 µg/L arasında ve negatif PRM bulguları olan erkeklerde [-2] proPSA düzeylerinin

ilk biyopsi yapma kararlarının alınmasında FDA tarafından onay almıştır (86).

2.6.13. BENİGN PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN

PSA PCa'nın erken saptanması için yaygın olarak kullanılan bir serum markeri olmasıyla birlikte PCa'ya spesifik olmadığından dolayı benign prostatik hadiselerde de seviyesi yükselebilir. BPSA ve [-2] proprostate-spesifik antijen ([-2] proPSA) BPH ile PCa olan erkekleri ayırt etmede umut verici yeni biyolojik markerlar olarak tespit edilmişlerdir. BPSA esas olarak transizyon bölge dokusu hiperplazisi, benign veya kanserli periferal bölge plazi dokusuyla değil, nodüler hiperplazi sergileyen benign transizyon bölge dokusuyla ilişkilendirilir. BPSA'nın prostat geçiş bölgesindeki yüksekliği patolojik BPH ile ilişkili iken [-2] proPSA prostat tümörü ile ilişkilidir (83).

2.6.14. İDRARDA PSA

İlk defa 1980'li yıllarda idrarda PSA varlığı tespit edilmiştir. Serum PSA konusunda oldukça yoğun araştırmalar yapılmış olmasına rağmen günümüze kadar idrar PSA'sıyla ilgili yeterli çalışmalar yapılmamıştır. İlk akım idrarda tesbit edilen PSA'nın orta ve son akım idrardan elde edilen PSA'ya göre lokal PSA üretimini daha iyi temsil ettiği gösterilmiştir. Ayrıca radikal prostatektomi sonrasında da belli bir düzeyde idrar PSA'sının tesbit edildiği de aynı çalışmada belirtilmiştir (87). Çok merkezli iki çalışmada, idrar PSA oranının, tPSA tayini ve serbest-total PSA oranı tayinine göre prostat kanserini tanımda serum PSA değeri gri zonda olan hastalarda daha üstün olduğu belirtilmiştir (88,89).

2.7. PROSTAT KANSERİNDE PSA DIŞI TÖMÖR BİYOMARKERLARI

2.7.1. PROSTAT SPESİFİK MEMBRAN ANTİJENİ

İlk olarak 1987 yılında tariflenen prostat spesifik membran antijeni (PSMA), PCa'lı hastaların epitelyal hücrelerinde önemli ölçüde eksprese olan tip-2 integral glikoproteinidir (90). Yüksek derecede prostata spesifik olduğu ve ayrıca PCa'da benign dokulara kıyasla daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. PSMA membrana bağımlı bir antijen olduğundan serumda tespiti dolaşımdaki prostat hücrelerine bağlıdır. İlk klinik çalışmalar bu nedenle kanseri organa sınırlı olmaması muhtemel olan erkeklerde kanser evrelemesini geliştirmek için dolaşımdaki kanser hücrelerini tespit etmeye odaklanmıştır. Ümit verici olsalar da, testin sensitivitesi çalışmalarda %39 ile %91 arasında değişkenlik göstermektedir ve düzeltmeler gerektiğine işaret etmektedir. Serum PSMA seviyelerinin PCa tanısında faydalı olabileceği beklenmektedir. İlk raporlar western blot tekniğine dayanmaktaydı ve malignitelerde benign hastalığa kıyasla artmış ekspresyon gösterse de doğru kantitasyon açısından güvenilir değildi ve bu nedenle klinik olarak kullanılabilir değildi (91). Xiao ve ark. çalışmalarında kantitasyonu mümkün kılan yeni bir immünoassay bildirmiştir. 4-10 ng/ml PSA seviyesine sahip erkeklerde PSMA ölçümü BPH ile kanseri etkin şekilde ayırt etmiştir (92).

2.7.2. E-CADHERİN

Hücre-hücre adezyonu nonpatolojik doku yapısında ve karsinogeneizde önemli bir rol oynar. E-cadherin epitelyal hücrelerde üretilen bir hücre adezyon molekülüdür ve bu hücrelerden e-cadherin üretiminin PCa prognozunun tahmininde kullanılabileceği gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal bir çalışmada PCa tümörlerinin %50'sinde azalmış e-cadherin üretimi gösterilirken nonpatolojik prostat dokusunda tek tip üretim olduğu bulunmuştur. E-cadherin üretiminin tümör derecesi, evresi ve sağkalımla da korelasyon gösterdiği bulunmuştur. İmmünohistokimyasal

olarak tespit edilen düşük E-cadherin üretimi PCa hastalarında daha kısa sağkalım süresi ile ilişkili bulunmuştur (93).

2.7.3. PROSTAT KÖK HÜCRE ANTİJENİ

Prostat kök hücre antijeni (PSCA) prostatta makul ölçüde spesifik üretimi olan bir membran glikoproteinidir. PSCA PCa dokusunda immünohistokimya ile tespit edilir ve PSCA RNA kan örneklerinde bulunmaktadır. Artmış PSCA üretimi artmış PCa riski, yüksek gleason skoru, yüksek evre ve metastaz varlığı ile koreledir. PSCA ayrıca tedavi hedefi olarak da araştırılmıştır ancak bu markerın klinik faydalılığını doğrulamak için daha geniş çalışmalar gerekmektedir (93).

2.7.4. HEPSİN

İlk olarak insan karaciğerinde bulunan bir membran serin proteazı olan hepsin prostat dokusunda yüksek konsantrasyonlarda üretilmektedir. mRNA ekspresyon profil çalışmaları PCa tümörlerinin %90'ında hepsin geninin yüksek ekspresyonunu göstermiştir. Bir çalışmada, immünohistokimyasal boyama hepsinin prostattaki prostat intraepitelyal neoplazi (PIN) lezyonlarında yüksek oranda üretildiğini ve BPH'ye kıyasla PCa'da daha çok üretildiğini göstermiştir. Hepsinin tanısal potansiyelini belirlemek için serum ve idrar örnekleriyle yapılan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (93).

2.7.5. ERKEN PROSTAT KANSER ANTİJENİ

Proteomiks yaklaşımlarının kullanılması kanserde yeni biyomarker araştırmalarını artırmıştır. Yapısal nükleer proteinlerde değişimlere yönelik araştırmalar yeni PCa biyomarkerlarının tanımlanmasına yol açmıştır (94). Erken prostat kanser antijeni (EPCA) ve EPCA-2 nükleer yapısal proteinler olup, prostat kanserli hastaların serumunda yükselirken sağlıklı insanlardaki prostat dokusu veya diğer kanser tiplerinde yükselmemektedir (54). Sonraki çalışmalar hem serumda kolayca tespit edilen hem de PCa'ya spesifik olan spesifik EPCA-2 epitoplarına karşı üretilen artmış antikörelere odaklanmıştır.

Bu çalışmaların amacı PCa için etkili bir tarama aracı belirlemektir. Epitoplardan biri olan EPCA-2.19 büyük potansiyel göstermektedir. Bilinen örneklerle yapılan başlangıç çalışmasında EPCA için eşik değeri 0.5 ng/ml olarak belirlenmiştir. 328 erkekte yapılan bir prospektif takip çalışmasında EPCA-2.19'un normal erkeklerle BPH'li erkekleri PCa'lı erkeklerden %94 spesifite ve %91 sensitivite ile ayırt ettiği gösterilmiştir. Aynı proteinin diğer bir epitopu olan EPCA-2.22'ye karşı üretilen antikorların da organa sınırlı olan ve olmayan PCa'nın ayırımında kullanılabileceği gösterilmiştir (94).

2.7.6. PROSTAT KANSER GENİ 3

1999 yılında Bussemakers ve ark. Prostat kanser geni 3 (PCA3)'ü PCa için potansiyel bir belirteç olarak tariflemişlerdir (95). PCA3 prostata spesifik, primer prostat tümörlerinin >%95'inde aşırı eksprese olan ve komşu non-kanser dokulara kıyasla 66 kat upregülasyona sahip olan kodlanmayan bir RNA'dır. Jack Schalken grubunun yoğun katkıları ile, bu ilgi çekici yeni marker PCa'da büyük potansiyele sahiptir. Bu nedenle, Avrupa ve ABD çalışmalarında pozitif biyopsi riski yüksek olan hastaların belirlenmesi ve daha da önemlisi bir tekrar biyopsisi için en iyi adayların belirlenmesinde PCA3 testinin kullanımı ele alınmaktadır. Pozitif bir tekrar biyopsisi olasılığı artan PCA3 skoru ile artmaktadır. Klinik şartlarda, en iyi tanısal doğruluk serbest/total PSA oranının maksimal olduğu "gri" zonda alınmaktadır. Yüksek PCA3 seviyelerinin test edilmesi PCa tanısını noninvaziv bir metodolojiyle gerçekleştirmek için kantitatif idrar testi şeklinde geliştirilmiştir (94). PSA ile PCA3 idrar testinin karşılaştırılması Roobol ve ark. tarafından incelenmiştir. İlk adım taraması olarak, 721 erkekte tarama öncesi popülasyonda PCA3'ün ciddi hastalıkların belirlenmesinde daha iyi bir değerlendirme aracı olduğunu bulmuşlardır (96). Klinik idrar testinin geliştirilmesi ve pek çok PCa risk hesabına dahil edilmesi baz alınarak PCA3'ün öncü bir biyomarker olması muhtemeldir (94). Serum PSA değerinin prostat hacminden, yaştan, enflamasyondan,

travmadan ve bazı ilaçlardan etkilenmesi bir dezavantaj oluşturmaktadır. PCA3'un bu tip durumlardan etkilenmediği düşünülmektedir (97).

2.7.7. ALFAMETİLAÇİL- CoA RACEMASE

2001 yılında Jiang ve ark. alfametilacıll- CoA racemase (AMACR)'ı PCa için moleküler bir belirteç olarak tanımlamışlardır (98). RNA ekspresyon profillemesi için adı geçen biyomarkerlerden biri AMACR enzimidir ve prostat biyopsi dokusunda tanısal bir biyomarker olarak test edildiğinde %90 üzerinde sensitivite ve spesifite göstermiştir (99). İmmünohistokimyasal metodlar kullanılarak AMACR'in PCa'da oldukça fazla sentezlendiği gösterilmiştir (100). PCa'da düşük AMACR ekspresyonu da metastaz ve biyokimyasal rekürrens ile korelasyon göstermektedir. Fakat AMACR PCa'ya spesifik değildir ve idrarda noninvaziv tespit için uygun değildir (99).

2.7.8. İNSAN KALLİKREİN İLİŞKİLİ PEPTİDAZ 2

hK2 ve hK3 (PSA) 'yi kodlayan genler aynı kallikrein gen ailesinin üyeleridir (101). PSA (hK3) gibi, hK2 de prostat dokularında yüksek oranda bulunur; PCa'da aşırı eksprese olur. hK2 seviyeleri serum örneklerinde ölçülebilir. Bazı çalışmalar hK2'nin organa sınırlı olmayan hastalığı preoperatif olarak tahmin etmede ve biyokimyasal rekürrens riskini tahmin etmede faydalı olabileceğini göstermiştir. Ancak, diğer çalışmalar hK2'nin preoperatif prognostik tahminde PSA'dan daha faydalı bulmamıştır. 2-10 ng/ml PSA aralığındaki hastalarda hK2'nin sPSA'ya oranının PCa tespitinde faydalı bir araç olabileceği gösterilmiştir ve bu hasta grubunda biyokimyasal rekürrens riskini belirlemede faydalıdır. Kallikrein ailesinin diğer üyeleri gelecekte prostat kanseri biyomarkerları olarak rol alabilirler (102).

2.7.9. P53

p53 tümör süpresör proteininin mutasyonları kontrolsüz hücre proliferasyonuna yol açabilir ve PCa ile ilişkilidir. Anormal bir p53 proteininin mevcudiyeti radikal prostatektomi sonrası hastalık rekürrensünün potansiyel bir prediktörü olarak potansiyele sahiptir. Bu protein ile metastaz varlığı ve azalmış sağkalım süresi gibi agresif hastalık özellikleri arasında korelasyonlar bulunmuştur. Bu biyomarkerı kanda ölçmek için bir test mevcut olmadığından bu çalışmalar prostat dokusunda yapılmıştır (102).

2.7.10. PROSTATİK ASİT FOSFATAZ

Prostatik asit fosfataz (PAP) aktivitesi PCa'lı hastaların serumlarındaki yüksekliği hastalığın ilk tariflenmesinden 85 yıl sonra 1938 yılında keşfedilmiştir. Prostat spesifik asit fosfataz olarakta bilinen PAP prostat bezi epitelyum hücrelerinden salgılanan glikoprotein (100 kDa) yapıda bir enzimdir. Bir PCa belirteci olarak kullanılan ve son birkaç dekat öncesine kadar yaygın olarak çalışılmış olmasına rağmen, fizyolojik rolü henüz net olarak anlaşılammıştır. PAP adından da anlaşılacağı gibi, asidik koşullarda fosfataz aktivitesini gösterir. PAP aktivitesinin kemik metastazı olan hastalarda özellikle yüksek bulunmaktadır. PSA'nın PCa'lı hastalarda standart bir marker olarak kullanılmasına kadar hastalarda PCa'nın progresyon ve tedaviye yanıtın değerlendirmesinde de kullanılan bir belirteç olarakta çalışılmıştır (103).

2.7.11. GEN FÜZYONLARI (TMPRSS2-ERG)

'Cancer Outlier Profile Analysis (COPA)', sık rastlanan epitelyal tümörlerde görülen değişimlerin en önemlilerini fluorescent in situ hybridisation (FISH) yöntemi ile Deoksi Ribonükleik Asit (DNA) microarray'ler kullanarak analiz etmekte ve özetlemektedir. Buna göre, PCa olgularının neredeyse %90'unda, androjenlerle regule edilen TMPRSS2 geni ile ETS (erythroblast transformation- specific) transkripsiyon ailesi faktörlerinden ERG geninin füzyonu göze çarpmaktadır. Bu bulguyu

destekleyen çalışmalarda, TMPRSS2-ERG genlerinin füzyonu, olguların %36-78'inde gösterilmektedir. Ancak bu füzyonun PCa'nın biyolojik davranışı ile ilgisine yönelik çelişkili yorumlar yapılmaktadır. Yine de, TMPRSS2-ERG gen füzyonunun PCa'nın gelişiminde erken safhalarda yer aldığı, progresif bir davranışı öngörmediği kabul edilmektedir. Genlerdeki duplikasyon ve anöploidi, zaten genel olarak genetik instabilite ve kötü prognoz işaretidir (104). TMPRSS2-ERG %97 spesifite ve %96 sensitiviteye sahip olup, Avrupa ve Birleşik Devletlerdeki kliniklerde ticari olarak temin edilebilmektedir (105).

2.7.12. TRANSFORMİNG GROWTH FACTOR-BETA 1 (TGF- β 1) VE INTERLEUKİN-6 (IL-6)

TGF- β 1 proliferasyon, farklılaşma, anjiyogenez, immün yanıtta dahil olmak üzere birçok hücrel mekanizmanın düzenlenmesinde rol oynayan bir büyüme faktörüdür. TGF- β 1 PCa modellerinde hücrel ilerlemeyi teşvik ettiği gösterilmiş ve TGF- β 1'nin PCa hastalarındaki lokal ekspresyonunun daha yüksek tümör derecesi, tümör invazyonu ve metastazıyla ilişkilendirilmiştir (106).

IL-6, bağışıklık ve hematopoietik mekanizmaları üzerinde değişken etkilere sahip olan bir sitokindir. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda IL-6 ve bunun reseptörlerinin (IL-6R) prostat kanser hastalarında eksprese olduğu gösterilmiştir (106).

2.7.13. PROSTAT HASTALIKLARINDA MİKRO RNA'LAR

Çeşitli miRNA'ların PCa'nın başlangıcı ve ilerlemesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak PCa için dolaşımdaki miRNA'ların analizi hala emekleme aşamasındadır. Vücut sıvılarından miRNA'ların analizi ile ilgili biyomateryal kaynaklarından RNA eldesi bir sorun oluşturmaktadır. miRNA üzerine yapılan çalışmaların çoğunda bunların PCa için olası belirteçlermiş gibi görülmüş, bu çalışmaların büyük kısmı serum ve plazma numuneleri üzerinde yapılmıştır. İdrar numunelerinde yapılan bir çalışmada

da miRNA'ların hem kan bazlı hemde idrar bazlı numunelerde ölçülebileceğine dair umut vaat eden sonuçlar elde edilmiştir. Başlangıçtaki bu çalışmaların miRNA eldesi ve tespiti için ümit vaat eden sonuçlarının sağlam metodlar ve standartlar kullanılarak geniş hasta gruplarının iyi kontroller (sağlıklı erkekler ile BPH ve/veya prostatit gibi) ve kapsamlı izlem verileri ile doğrulanması gerekmektedir (107).

2.8. MİKRO RNA'LAR

2.8.1. KODLANMAYAN RNA'LAR

Kodlanmayan RNA'ların (ncRNA) farklı ekspresyon paterlerinin normal hücreleride etkileyen çeşitli fonksiyonları atfedilmektedir (108). ncRNA'lar, biyolojik reaksiyonların katalizlenmesinden hücrel savunmaya, gelişimsel süreçlerden hücrel cevaba kadar pek çok göreve sahiptirler. ncRNA'ların diğer işlevleri arasında transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen susturumu ve kromozomların yeniden modellenmesi de yer almaktadır. Tanımlanan ve fonksiyonu aydınlatılan ncRNA'ların sayısı her geçen gün artmaktadır. ncRNA'lar yaygın olarak uzunluklarına göre sınıflandırılmaktadır. ncRNA'ların büyük bir kısmı kısa düzenleyici RNA'lardan oluşmaktadır. Bu RNA'lar, RNA enterferans (RNA interference-RNAi) mekanizması ile gen susturumunu sağlayan moleküllerdir (109). Posttranskripsiyonel gen susturumu, mRNA molekülünün diziye özgü yıkıma uğraması ya da translasyona girememesiyle oluşur. Bu sırada mRNA'nın köken aldığı genin transkripsiyon hızı veya şeklinde bir değişiklik olmamakta, sentezlenmiş olan mRNA'ya küçük ve kodlamayan bir RNA zincirinin bağlanması sonucu protein ifadesi baskılanmaktadır. RNAi olarak adlandırılan bu olay mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotlarda gözlenmektedir (110). Küçük ncRNA'ların üç sınıfı; short interfering RNAs (siRNAs), miRNA ve PIWI-interacting RNAs'nın (piRNAs) son dekatta yapılan çalışmalarla spesifik gen susturumu ile ilişkilendirilmiştir (111).

2.8.2. MİKRO RNA'LAR VE TARİHÇESİ

miRNA'lar küçük, endojenez sınıfı, kodlanmayan, tek zincirli RNA'lardır (112). miRNA'lar yaklaşık 23 nükleotit (nt) uzunluğundadır (113). miRNA'lar transkripsiyon sonrası gen regülasyonu dahil kısa düzenleyici RNA'lardır (114). miRNA'ların gen ekspresyonlarının %30'undan fazlasının düzenlenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (115).

miRNA'lar ilk olarak 1993 yılında Ambros ve çalışma arkadaşları tarafından, nematod türü bir solucan olan *caenorhabditis elegans* (*c. elegans*)'ların gelişimi üzerine yaptıkları genetik araştırmalar sırasında keşfedilmiştir. İlk tanımladıkları miRNA, *lin-4*'tür. Keşfettikleri bu *lin-4* gen ürününün küçük protein kodlamayan RNA olduğunu fark etmişlerdir (116). *Lin-4*'ün keşfinden 7 yıl sonra başka bir küçük düzenleyici RNA olan *let-7*'nin, *C.elegans*'ın gelişiminde ek bir düzenleyici olduğu tanımlanmıştır (117). *Let-7*'nin insanları da içine alan türler arasında da korunmuş olduğu keşfedilmiş olup, bu durum *let-7*'nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir (118). Daha sonraki yıllarda *lin-4* ve *let-7*'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiştir ve miRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (118,119). 2002 yılında ise miRNA'ların kanserle ilişkisi belirlenmiş ve miR-15 ve miR-16'nın kronik lenfositik lösemide ekspresyonunun azaldığı yada hiç sentezlenmediği belirlenmiştir (120).

2.8.3. MİKRO RNA'LARIN FONKSİYONU

miRNA'nın işlevinin gen düzenlemesi olduğu anlaşılmaktadır (121). miRNA'ların büyük çoğunluğunun, bozulmuş yada değiştirilmiş miRNA regülasyonlarının fenotipik sonuçları bilinmemektedir (122). miRNA'lar hücre çoğalması ve apoptozu, gelişimi, farklılaşması, metabolizması ve bağışıklık da dahil olmak üzere fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller yürütmektedirler. miRNA'ların değişmiş ifadeleri insanda yüzlerce

kanserlerin oluşumu, invazyonu ve ilerlemesiyle yakından ilişkili olduğu ve miRNA genlerinin yaklaşık %50'sinin kanser ile ilgili genomik bölgelerde olduğu saptanmıştır. Bu süreçlerde miRNA'lar onkogenik veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görebilirler (123).

Bir miRNA'nın 5' ucu mRNA kuyruğundaki komplementer sekanslara bağlanan "tohum" bölgesini içerir. Bu bağın afinitesi komplementer tohumların sekans ve sayısına bağlıdır. miRNA-mRNA çifti mRNA ekspresyonunu düzenleyen bir susturucu kompleks oluşturur. Çoğu miRNA hedef mRNA konsantrasyonunda hafif bir azalma (iki kattan az) oluşturur. Küçük bir kısım ise up-regülasyona veya hedefin tamamen yok edilmesine neden olur. Şu anda 1000 civarında insan miRNA'sı bilinmektedir ve her biri yüzlerce hatta binlerce geni hedef alabilirler (124).

2.8.4. MİKRO RNA'LARIN BİYOGENEZİ

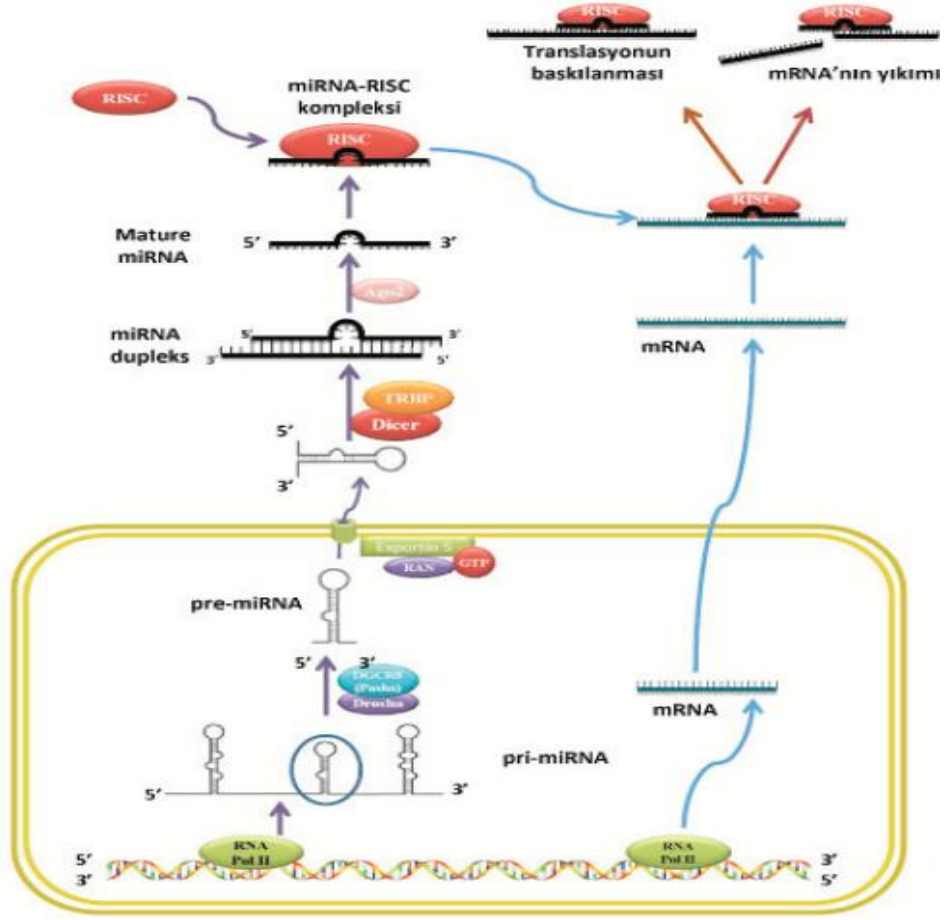
miRNA'lar daha uzun primer transkriptlerin (pri-miRNA'lar) parçaları olarak başlıca RNA polimeraz II (Pol II) ve sadece birkaç RNA polimeraz III (Pol III) tarafından transkribe edilirler. miRNA genlerinin büyük kısmı protein kodlayıcı genlerin intronlarından transkribe edilir. Geri kalanlar ise genellikle kümeler halinde bir araya gelmiş ve sonrasında çok sayıda matür miRNA'lara işlenecek olan bir pri-miRNA oluşturacak olan uzun kodlanmayan RNA'lar tarafından transkribe edilir. Diğer Pol II transkriptlerine benzer şekilde, pri-miRNA'lar bir 5'7- metil-guanozin şapkasına ve bir 3' poli (a) kuyruğuna sahiptir. Ancak, bunların kullanımı henüz tam anlaşılamamıştır (125).

Olgun miRNA'lar oluşmadan önce, pri-miRNA'ların kompleks nükleer işlemler olan RNase III (Drosha) ve ko-faktörü olan DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) tarafından yaklaşık uzunluğu 70 nt olan prekürsör miRNA'lara (pre-miRNA) ayrılması gerekmektedir (126). Sonrasında pre-miRNA'lar Exportin-5 tarafından sitoplazmaya

taşınmaktadır (127-129). Daha sonra pre-miRNA'lar sitoplazmada diğer bir nükleaz olan DİCER ve TRBP (HIV-1 transactivating response RNA binding protein) ile birlikte 18-25 nt uzunluğunda dubleks miRNA'lara bölünür (130).

miRNA dubleksinin bir kolu RNA-induklenmiş susturucu kompleks (RISC / RNA-induced silencing complex) ile birleşerek hedef mRNA'lara yönlendirilir. Bu hedeflenme RISC ile beraber Argonaute (Ago) proteinleri tarafından kolaylaştırılarak, hedef mRNA'da transkripsiyonel baskıya ve sonuçta bozulmalara yol açmaktadır (131). RISC içindeki miRNA'lar, hedef mRNA'ları 3' UTR bölgelerindeki bazı eşleşmesine göre belirler. miRNA'lar, mRNA'ların 3'UTR bölgesine yüksek oranda komplementerlik gösterirse mRNA degrade olur. Ancak komplementerlik azaldıkça mRNA'nın transkripsiyonu baskılanır (şekil 5) (132).

miRNA'ların diğer kaynağı extracellüler çevredir. Şu anda yaygın olarak hücrelerin miRNA içeren kompleksleri kan, tükürük, idrar ve anne sütü gibi biyolojik sıvılar içine saldıkları kabul edilmektedir. Bu kompleksler Ago gibi miRNA bağlayıcı proteinler ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) veya miRNA içeren mikrovessiküller içerirler. Kan içerisinde dolaşırken uzak hücreler tarafından alınmasıyla miRNA aracılığıyla hücreler arası iletişim sağlanmış olur (11).



Şekil 5. Mikro RNA Biyogenezi (132).

2.9. MİKRO RNA REGÜLASYONU

2.9.1. miRNA GENLERİNİN TRANSKRİPSİYONEL KONTROLÜ

Transkripsiyon miRNA'ların biyosentezinde majör regülatuar basamaklardan biridir. miRNA'ların büyük bölümünün transkripsiyonunu RNA Pol II yapar. 175 insan miRNA promotörünün geniş ölçekli haritalandırılmasında CpG adacıklarının rölatif sıklığı, TATA kutuları, TFIIB, başlatıcı elemanlar ve histon modifikasyonları gibi protein kodlayıcı gen promotörleriyle benzer özellikler ortaya konmuştur. miRNA transkripsiyonunu düzenleyen DNA bağlayıcı faktörler c-myc ve p53 dahil olmak üzere protein kodlayıcı genleri kontrol edenlerle büyük ölçüde

örtüşmektedir. Ayrıca, primer miRNA transkriptlerinin transkripsiyonu platelet kökenli growth faktör (PDGF), transforming growth faktör-b (TGF-b) ve kemik kökenli nörotropik faktör gibi growth faktör stimülasyonuna yanıt olarak dinamik bir şekilde regüle edilebilir (133).

Bir proto-onko gen olan c-myc, heliks-ilmik-heliks lösin fermuar formunda bir transkripsiyon faktörüdür. İnsan genlerinin %10-15'ini düzenleyerek hücre büyümesini ve apoptozu kontrol eder (134). c-myc'nin E- kutularına bağlandığı ve miR-17-92 kümesinin transkripsiyonunu aktive ettiği bilinmektedir. Tümörlerde c-myc aktivasyonu artışıyla tutarlı olarak, miR-17-92 sıklıkla tümörlerde yüksek derecede eksprese olmaktadır. Ayrıca miR-17-92 kümesi içeren 13q31-q32 gen lokusunun amplifikasyonu c-myc-rearranged lenfomalarda sıklıkla gözlenmektedir ve c-myc ile miR-17 kümelerinin koopere olabileceğini ve hücre transformasyonunu kolaylaştırabileceğini düşündürmektedir. miR-17-92 kümesi hücre siklusu regülatörü E2F1 üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu bilinen miR-17-5p ve miR-20 dahil olmak üzere altı miRNA içermektedir. İlginç şekilde c-myc ayrıca E2F1 transkripsiyonunu da artırmaktadır ve bu nedenle c-myc'nin hem miRNA hem de mRNA ekspresyonunu regüle ederek hücre siklusunu ayarlıyor olması muhtemeldir (133). Güçlü bir şekilde hematopoetik hücrelerde eksprese olan mir-142 geni 17. Kromozom üzerinde ve myc translokasyonun t(8;17) kesme birleştirme noktasında olduğu bulunmuş, bu da agresif B-hücreli lösemiye neden olmaktadır (135). Ek olarak, c-myc miR-15a, -29, -34 ve let -7 aileleri dahil olmak üzere çeşitli tümör süpresör miRNA genlerinin ekspresyonunu azaltmaktadır. Son olarak c-myc'nin let-7 aile üyelerinin post transkripsiyonel baskılanmasında rol oynayan Lin-28B transkripsiyonunu artırdığı gösterilmiştir. Özetle, c-myc aktivitesi farklı miRNA'ların ekspresyonunun regülasyonu ile tümör gelişimine hem olumlu hem olumsuz etkilerde bulunmaktadır (133).

2.9.2. miRNA GENLERİNİN EPİGENETİK KONTROLÜ

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi protein kodlayıcı genleri regüle ettiği bilinen pek çok epigenetik kontrol mekanizması miRNA genleri için de geçerli gözükmektedir. Örneğin, mesane kanserinde miR-127 ekspresyonu promotör hipermetilasyonuna bağlı olarak azalmaktadır. miR-9-1, -193a, -137, -342, -203 ve -34b/c gibi başka miRNA loküslerinin de bilinen tümör süpresör gen loküslerine benzer şekilde çeşitli insan kanserlerinde hipermetile olduğu bulunmuştur. miRNA gen promotörleri ayrıca gelişim ve patogenez süresince histon modifikasyonu ile de regüle edilir. Örneğin, akciğer kanserinde düşük miR-1 ekspresyonu histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri tedavisi ile önlenir ve bu da miR-1 promotörünün tümörlerde asetillenebileceğini düşündürmektedir. miR-1 ekspresyonunun geri döndürülmesi hücre büyümesini, hareketliliğini ve tümör oluşumunu in vivo olarak azaltmaktadır. Örneğin meme kanseri SKBr3 hücre hattında HDAC inhibitörleri ile tedavi sonrası 32 miRNA belirgin derecede down regüle olmuştur. Ek olarak, miR-27a HDAC inhibitörleri tarafından güçlü şekilde baskılanmıştır ve HDAC tedavisi ile up regüle oldukları gösterilen genleri hedef aldığı bulunmuştur (133).

DNA metilasyonu, PCa'nın hem başlangıcına hemde ilerlemesine katkıda bulunmakta ve PCa'da sıkça araştırılmıştır. PCa'daki en sık epigenetik modifikasyon GSTP1 (glutathione S-transferase) promotör metilasyonudur. GSTP1 genotoksik ve elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonu ile ilgilienmektedir. GSTP1 promotör metilasyonu adenokarsinomların %90'ında ve yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazik lezyonların %70'inde mevcut olup normal prostat epitelinde yada hiperplastik epitelde bulunmamaktadır (136).

2.10. ONKOGENİK VE TÜMÖR SÜPRESÖR MİKRO RNA'LAR

miRNA'lar malign dokularda normal kısma göre up veya down regüle olurlar ve bu manada onkogenler veya tümör süpresörler olarak ele alınabilirler. miRNA'lar oldukça kısıtlı dokuya spesifik ekspresyona sahip olduğundan kanser dokularındaki belirgin miRNA modülasyonunun tümörde normal dokuya kıyasla farklı bir hücre popülasyonunun manifestasyonunu yansıtır olabilirler. Bu nedenle, tümör ile miRNA modülasyonu arasındaki işlevsel bağlantıyı deneysel olarak ortaya koymak şarttır. Kapsamlı analizler kanserde miRNA'ların sebeysel rolünü hem insan kanser hücrelerinde hem de genetik olarak oynanmış hayvan modellerinde ortaya koymuştur. Örneğin miR-155 veya miR-21 transgenik ekspresyonu ve miR-15a/16-1 delesyonu farelerde lenfomagenezin başlamasına yeterlidir. Buna zıt olarak, let-7, miR-26a, miR-34a ve miR-143/145 dahil olmak üzere seçilmiş miRNA'ların sistematik uygulanması in vivo tümör gelişimini inhibe etmektedir (137).

2.11. KARARLILIK VE TERAPÖTİK HEDEF OLARAK MİKRO RNA'LAR

miRNA'lar RNAaz aktivitesi varlığında, çoklu erime-donma döngüsü, uzun süreli oda sıcaklığında saklama ve aşırı pH gibi olumsuz şartlar altında bile biyolojik sıvılar ve dokularda stabilitesinin sabit kaldığı görülmüştür. miRNA'ların bozunmadan korunması, apoptotik cisimcikler, mikroveziküller ve eksozomlar gibi mikropartiküller içinde paketlenmesi sonucu ya da serbest miRNA'ların, RNA bağlayıcı proteinleriyle birleşmesi sonucu ya da lipoprotein kompleksleri oluşturması şeklinde olmaktadır (138).

İnsan serumundaki miRNA seviyeleri stabildir, işlenebilirdir ve aynı türdeki bireyler arasında tutarlıdır ve bu nedenle serum miRNA'ları çeşitli

kanserlerin tespitinde potansiyel biyomarkerlar olarak kullanılabilirler. miRNA profilleri kötü diferansiye tümörlerin doku kökenini belirlemek için mRNA kullanılan profillerden daha yüksek doğruluğa sahip bir şekilde kullanılmıştır. miRNA ekspresyon paterni tümör kökeni, evresi ve diğer patolojik değişkenleri yansıtır. Malign fenotiplerle güçlü korelasyona sahip miRNAlar (örn. miR-10b) tanısal markerlar olarak faydalı olabilir ve gelecekteki metastatik relapsların prediktörü olan miRNA'lar (örn, miR-355 ve miR-126) prognostik biyomarkerlar olarak kullanılabilir. Bu nedenle malignitelerde miRNA'ların ekspresyon profillemesi tanı ve prognozda değerli olacaktır (139).

miRNA'ların deregülasyonu çeşitli insan kanserleriyle korelasyon göstermektedir. Bu nedenle, miRNA taklitleri veya inhibitörleri kullanılarak miRNA ekspresyon artışı veya inhibisyonu kanser tedavisinde kullanılabilir. 20-O-metil antisense oligonükleotidler ve antagomirler gibi modifiye antisense oligonükleotidler (anti-miRNA oligonükleotidler olarak da adlandırılır) kanser hücrelerinin büyümesini kontrol altına alacak şekilde miRNA ekspresyonunu yapay olarak regüle edebilir. Sık veya sürekli 20-O-metil veya kilitli-nükleik asit antisense oligonükleotidlerin salınımı spesifik olarak miRNA'ları inhibe etmenin yanında diğer kanser tedavilerine kıyasla daha stabil ve daha az toksiktir. Ayrıca, let-7 ailesi tarafından kodlananlar gibi tümör süpresör miRNA'ların induksiyon veya aşırı ekspresyonu spesifik tümör tiplerinin tedavisinde kullanılabilir. Fakat miRNA seviyeleri manipüle edilerek tümör büyümesi ve metastazının etkili bir şekilde önlenilebileceği veya azaltılabileceğine ilişkin miRNA transgeniklerini içeren kapsamlı prelinik ve translasyonel çalışmalar gereklidir (139).

2.12. MİKRO RNA'LARIN KULLANIMI VE ÖLÇÜMÜYLE İLGİLİ PROBLEMLER

miRNA'lar tümörögenez, hastalık ilerlemesi ve metastaz için en önemli mediyatörlerden biridir. miRNA'lar delesyonlar, amplifikasyonlar, mutasyonlar, DNA'nın epigenetik değişimleri gibi gen sinyalleşmesine aracılık etmesinden ötürü, kanseri, hastalık ilerlemesini ve diğer organlara metastazı geliştirmek için gerekli olan protein sentezini etkileyebilirler. Bu yüzden miRNA'lar klinik diagnostik ve prognostik biyomarkerlar olarak kullanışlı olabilirler. Ama yinede bunların PSA, alfa-fetoprotein (AFP) ve carcinoembryonic antigen (CEA) gibi konvensiyonel biyomarkerların yerine kullanılmasında birçok sınırlılık vardır. Tabiki kullanılan biyomarkerlarında kanser ve benign hastalıkları ayırt etmede sınırlılıkları vardı. Gerçektende CEA (kolon kanseri), AFP (Hepatosellüler kanser) ve PSA'yı içeren biyomarkerlar benign durumlarda da yüksek miktarda tespit edilmektedir. Örneğin PSA seviyesi prostatit ve BPH'li hastalarda da yükselmektedir (140).

Dolaşımdaki miRNA temelli tanısal araçların geliştirilmesi için gerekliliklerden biri miRNA'ları plazma ve serumdan yeterli sensitivite ve mutlulukla elde edebilmektedir. Bu miRNA'ların doğru ölçümüyle ilişkili örnek toplanması gibi analiz öncesi değişkenlikler, RNA ekstraksiyon etkinliğini etkileyen faktörler ve başarılı Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR), veri analizi ve normalizasyon ile ilişkili teknik sorunlar gibi pek çok güçlük vardır. Günümüzde dolaşımdaki miRNA verilerininin değişken olması ve tutarlılığın bulunmamasının temel sebepleri muhtemelen miRNA ekstraksiyonu ve kuantifikasyonu, metodolojisi ve veri analizindeki değişkenliklerdir (9).

Dolaşımdaki miRNA'ların ölçümünde halen çözülememiş olan temel sorunlar normalizasyon, amplifikasyon ve kontaminasyondur. Vücut sıvılarındaki toplam miRNA'nın sayısal ölçümü aşırı derecede düşük

konsantrasyonları nedeniyle güçtür. Ek olarak, biyolojik değişkenlik için internal kontrol amacıyla kullanılabilen uygun küçük RNA referans genlerine ilişkin bir görüş birliği yoktur; mevcut protokoller örneklerin eşit hacimlerde alınarak işlenmesini, sonra da normalize edici bir kontrol olarak sentetik non-human (*Caenorhabditis elegans*) miRNA'sı kullanılarak teknik değişkenliğin düzeltilmesini önermektedir. Ancak günümüze kadar yayınlanmış olan makaleler miRNA'nın gelecekte prostat kanseri biyomarkerları arasında yer alacağını ve konsensus protokollerinde bir temel oluşturacağını göstermektedir (9).

2.13. KANSER VE MİKRO RNA

Çeşitli kanser dokularında miRNA profilleri her kanser için diağnoz ve prognoz markerı olabilir. Birçok çalışma miRNA'ların yüksek ve düşük düzenlemelerinin kanser patogenezi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (140). Kanserde miRNA'ların doğrudan kalıtımını gösteren ilk çalışma, insan kronik lenfositik lösemi (KLL) ile miR-15a ve miR-16-1 arasındaki bağlantı olmuştur (141). Değişen miRNA ekspresyonunun hücre gelişimi, farklılaşması ve apoptoz kontrolü ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır. Esasen miR-15a ve miR-16-1 antiapoptotik gen BCL-2'yi hedef alarak apoptozu indüklemektedir (8). miR-15a ve miR-16-1'in tümör hücrelerinde delesyona uğradığından ve/veya ifadenme düzeyindeki azalışından dolayı, bu iki miRNA geninin kanser transformasyonunda hot-spot (sıcak bölge) bölgeler oluşturduğu önerilmiştir (142). Lawrie ve ark. yaptıkları çalışmada diffüz büyük B hücreli lenfoma hastaların serumlarında mir-21'in yüksek miktarda arttığını belirtmişlerdir. Lösemi hastalarının miRNA profillerinde dolaşımdaki miRNA-92a'nın malignite durumlarında önemli ölçüde baskılandığını göstermişlerdir (143). Lu ve ark. 334 farklı insan kanser örneğinde 217 miRNA'nın ekspresyonunu analiz etmiş ve miRNA ekspresyonunun farklı gelişimsel kaynaklı tümörler arasında farklılık gösterdiğini ve tümör dokusu ile normal doku arasında farklı bir ekspresyon olduğunu ortaya koymuşlardır. Değiştiği saptanan miRNA'ların bazıları miR-20, miR-181a, miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-221, let-7a ve miR-

2'dir. Bu farklı şekilde eksprese edilen miRNA'ların çoğu tümörlerde normal dokulara kıyasla daha düşük seviyelerde eksprese edilmektedir (144). Volinia ve ark. kanser dokusunda 21 miRNA'nın 6 katı upregülasyonunu örnek vermişlerdir. Onlar, tümörü baskılayan RB1 ve TGFBR2 genlerini kapsayan önceden tahmin edilebilir hedefler bulmuşlardır. Bu araştırmacılar miRNA'ların katı tümörlerin oluşumunda yoğun bir şekilde bulunduğunu ve baskın yada çekinik kanser genleri olarak işlevini sürdürdüğünü bulmuşlardır (145). Lorio ve ark. miR-125b, miR-145 miR-21 ve miR-155 tanımlarının meme kanser dokularında önemli derecede düzensiz olduğunu göstermişlerdir ve bu araştırmacılar östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonları , tümör evreleri, vasküler invazyon gibi belirli meme kanseri biyopatolojik özelliklerle ilişkili olan miRNA'ları tanımlamışlardır (146). Böylece kanser dokularındaki miRNA tanım profilleri çeşitli kanser hastalarının diyagnoz ve prognozunda kullanışlı biomarkerlar olarak kabul edilebilirler (140).

2.14. PROSTAT KANSERİ VE MİKRO RNA'LAR

miRNA'lar karsinogenezde disregüle olduklarından ve hem doku hem de kan örneklerinde yüksek derecede stabil olduklarından kanser tespiti için kanda bulunan biyomarkerlar için ideal bir modeldir. Yapılan çalışmalar kanserli hastaların dolaşımında sağlıklı kontrollere kıyasla farklı miRNA ekspresyonunu belgeleyerek miRNA'ların ideal bir noninvaziv biyomarker olduğunu ortaya koymuştur (140). Mitchell ve ark, tümör kökenli miRNA'ların dolaşımında (hem serum hem de plazmada) uygun bir biyomarker olarak kullanmaya yetecek seviyede mevcut olduğunu doğrulamışlardır (147). Xu ve ark. PCa dokusunda pre- miR-146a'daki işlevsel polimorfizmin miR-146a miktarını etkilediğini ve bunun PCa riskiyle ilişkili olduğunu bulmuşlardır (148).

miR-21 daha önceden çeşitli kanserlerde up-regüle olduğundan bir onkomir olarak tanımlanmıştır (10). Zhang ve ark. tarafından miR-21

ekspresyon seviyeleri ve hastalık progresyonu üzerine yapılan bir çalışmada pek çok ilginç sonuç bildirilmiştir. 20 lokalize PCa, 20 androjen bağımlı prostat kanserli, 10 hormon-refrakter prostat kanserli (HRCP) ve 6 BPH'li olmak üzere 56 hastanın serumunu incelemişler. HRCP hastalarında miR-21 daha yüksek seviyelerde eksprese olmuş. Sonradan kemoterapi almış olan HRCP hastalarından kemoterapiye dirençli hastalarda miR-21 seviyeleri kemoterapiye duyarlı hastalardan daha yüksek bulmuşlar (149). Çalışmadaki örneklem sayısı küçük olsa da bu çalışma miRNA'ların yalnızca bir tanı için değil ayrıca hastalık progresyonu ve tedaviye yanıt için de bir biyomarker potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Lodes ve ark. 2009'da çeşitli kanser tiplerine sahip hastaların serumlarında miRNA profillemesi için özel bir mikroarray ile çalışmışlardır. PCa hastalarında yükselmiş olan 15 miRNA tanımlamışlardır. Nitekim, bu çalışmada tanımlanan serum miRNA profili PCa hastalarını meme, over, akciğer ve kolon kanseri hastalarından ayırımını yapamamıştır (150). Moltzahn ve ark. 2011'de 36 erken evre PCa hastayı prostatektomiden hemen önce 12 sağlıklı erkekle karşılaştırmıştır. miR-93, miR-106a ve miR-24 tutarlı bir şekilde sağlıklı kişilerde düşük, kanser grubunda yüksek seviyeler göstermiştir (151). Chen ve ark. 2012'de tanısal değere sahip, 80 PCa hastasıyla 44 BPH hastasını ayırt edebilen beş miRNA'lık bir panel (let-7e, let-7c ve miR-30c down-regülasyonu ve miR-622 ve miR-1285 up-regülasyonu) tanımlamışlar (152). Tong ve ark. 2 yıl içinde nüks olan 20 hastanın ve 10 yıldır nüks olmayan 20 hastanın formalinle fiske edilip parafine gömülen tümör evresi T2a/b olan 40 prostatektomi materyalini incelemişler. Yaptıkları çalışmanın temel bulgularında miR-23b, -100, -145, -221 ve -222 'de down regülasyon mevcut olup, erken nüks tümör eğilimi olanlarda ayırt edici miR moleküllerini (özellikle miR-135b ve -194 aşırı ekspresyonu) göstermişlerdir (153). Porkka ve ark. miRNA kodlayan 319 genden 51 tanesinin PCa'lı ve sağlıklı dokuları karşılaştırarak artış veya azalışları miRNA ifadenme profillerinde tanımlamışlardır. Bunlardan 22 adet miRNA bütün PCa hastalarında, 15 tanesi ise sadece HRPC'de down

regülasyonunu göstermişlerdir. Aynı şekilde, tüm PCa'larda 8 adet miRNA'nın, HRPC'de ise 6 adet miRNA'nın up-regüle olduğunu belirlemişlerdir (154).

Belirli miRNA'ların tanımı normal ve kanserli dokuların ayırımında kullanılabılır ancak, bazı çalışmalarda bu miRNA tanımlarının kanserli dokuları ayırmada kullanılamayacağına dair sonuçlarda vardır. Volinia ve ark. PCa'da miR-21, miR-17-5p, miR-191, miR-29b-2, miR-199a-1, miR-146, miR-181b-1, miR-20a, miR-32, miR-92-2, miR-214, miR-30c, miR-25 ve miR-106a'nın up-regüle olduğunu tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar, kanser dokusundaki miRNA'ların up-regülasyonunu doğrulamışlardır. Aynı zamanda bu araştırmacıların çalışmalarında 6 miRNA down regüledir (145). Ayrıca ve ark. PCa'da 37 miRNA'nın down-regülasyonunu, 14 miRNA'nın da up-regülasyonunu gözlemlemiştir. Ayrıca çalışmasında, genetik anormalliğin miRNA'ları hedefleyebileceğini önermiştir ve lenf bezlerindeki miRNA tanımının androjen bağıllığına göre gruplandırılabilirliğini belirtmiştir (154).

2.15. MİKRO RNA-141

miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429 ve miR-141'de içeren miRNA'lar miR-200 ailesine aittirler (155,156). Epitelden mezenkimale geçişte miR-200 ailesi olumsuz düzenlenmede rol oynamaktadır (155). Epitelden mezenkimale dönüş sırasında, E-kaderin ekspresyonunun ilerleyici kaybına mezenkimal N-kaderin ve kaderin-11 gibi epitelyal olmayan kaderinlerin ekspresyonları sıklıkla eşlik ederler ve bu durum 'kaderin bağlanması' prosesi olarak bilinmektedirler (157). miR-200 ailesi epitelden mezenkimale geçişini E-kadherin baskılayıcıları olan ZEB1 ve ZEB2'yi hedefleyerek düzenlediği gösterilmiştir (158). Bu miRNA'lar E-kaderin represörleri olan ZEB1 ve ZEB2 ekspresyonlarını doğrudan 3'UTR bölgelerini hedef alıp baskılayarak epitelyal fenotipi sürdürürler. Sırasıyla ZEB1 ve ZEB2, miR-200 ailesinin promotör bölgesinde lokalize olmuş,

korunmuş bir çift ZEB-tip E-box elementlerinin hem pri-miR-200a/b/429 hem de pri-miR-200c/141 lokuslarının içerisine bağlanırlar. Böylece epitelyal-mezenkimal geçiş düzenlenmesinde ZEB1/ZEB2 ve miR-200 ailesi arasında bir çift negatif feedback döngüsü meydana gelir. Ayrıca bu döngünün kök hücrelerin normal hücrelerden farklı olan özelliklerinin korunması için önemli olduğu gösterilmiştir (157). Hücrelerdeki bu morfolojik değişim hücreler arası bağlantıyı azaltmakta ve bu da metastazın bir karakteristiğidir. Bununla birlikte, PCa'da artmış miR-141 ekspresyonunun kesin rolü ve nedeni şunda bilinmemektedir; ancak, DNA metilasyonunun anormal miR-141 ekspresyonuna neden olabileceği olasılığı ileri sürülmüştür (159). miR-200 gen ailesi iki farklı kromozom üzerinde lokalize olmuşlardır ; miR-200a/miR-200b/miR-429 1. Kromozom üzerinde, miR-200c/miR-141 ise 12. Kromozom üzerinde lokalizedir (160,161).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE MUHAFAZASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Kliniği'ne Ocak 2014 – Kasım 2014 tarihleri arasında idrar yaparken zorlanma, tam idrar yapamama, sık sık idrara çıkma ve idrarda çatlama gibi şikayetlerle başvuran hastalardan Benign Prostat Hipertrofisi ve/veya Prostat Kanseri etyolojisine yönelik istenen serum tPSA testlerinden, tPSA düzeyleri 4-10 ng/ml arasında ve prostat biyopsisi yapılan 50-80 yaş arasında ve hikayesinde prostat ile ilgili hastalıklar için daha önce herhangi bir ilaç ve/veya cerrahi tedavi almamış 34 hasta çalışmaya dahil edildi. Benzer yaş dağılımında olup tarama amaçlı yapılan serum tPSA düzeyi 4 ng/ml'nin altında olan ve yine hikayesinde prostat ile ilgili hastalıklar için daha önce herhangi bir ilaç ve/veya cerrahi tedavi almamış 16 sağlıklı kişi de kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Laboratuvara sarı kapaklı jelli tüp içerisinde gönderilen kan numuneleri 3220 g'de 5 dakika santrifüj edilip, tPSA ve sPSA düzeyleri bakıldıktan sonra 1 ml serum örneğini alınarak miR-141 çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı. Hasta ve sağlıklı gönüllülerden çalışmamız için tarafımızdan ayrıca kan alınmadı ve gönüllülere herhangi bir ilaç tedavisi ve/veya cerrahi işlem uygulanmamıştır.

Çalışmamız AKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.'da gerçekleştirilmiş olup, Afyonkarahisar Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra (Toplantı Numarası: 2013/15 Karar-178) belirtilen kurallar doğrultusunda örnekler toplanmıştır.

3.2. İŞLEMLERDE KULLANILAN MALZEMELER VE CİHAZLAR

Santrifüj (Nüve, NF 1200 R, Ankara, Türkiye)

Mikrosantrifüj (Hettich, Miko 200, Germany)

Derin dondurucu (-20 °C, Arçelik)
Derin dondurucu (-80 °C, Nuaire, Ultralow Freezer, USA)
Buzdolabı (+4 °C, İndesit)
Etüv (Nüve, FN 500, Ankara, Türkiye)
Otoanalizör (Roche Cobas e 601, Hitachi, Mannheim, Germany)
RT-PCR cihazı (Roche, LightCycler 480 II, Germany)

3.3. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Hasta ve sağlıklı gönüllülerden alınan toplam 50 adet serum örnekleri -80 °C’de çalışılincaya kadar saklandı. Çalışma zamanından 24 saat öncesinde -80 °C’de bulunan numuneler dondurucudan alınarak +4°C’ye konulmuştur. Komplementer DNA (cDNA) eldesi aşamasından önce numuneler +4°C’den çıkartılarak oda ısısına getirilmiştir.

3.4. SERUM ÖRNEKLERİNDEN TOTAL RNA İZOLASYONU

Kullanılan Kit ve İçeriği

High Pure miRNA Isolation Kit (Katalog No. 05 080 576 001, Roche Diagnostics, Manheim, Germany)

- Binding Buffer 80 ml
- Binding Enhancer 20 ml
- Wash Buffer 2 x 10 ml
- Elution Buffer 30 ml
- High Pure Filter tüp 50 x 2 Kutu

3.5. TOTAL RNA İZOLASYON PROSEDÜRÜ

- Çözdürülen serum örnekleri en az 5 kez alt üst edilerek karıştırıldı ve 150 µL’lik serum örneği temiz High pure filter tüpüne alındı.
- High pure filter tüpüne 312 µL Binding Buffer ile 200 µL Binding Enhancer eklenerek karıştırıldı.
- High pure filter tüpleri toplama kaplarının içine konularak 13000 g ‘de 1 dk santrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.

- High pure filter tüpleri tekrar toplama kaplarının içine konuldu ve filtrelili tüplere 500 µL Wash Buffer eklenerek 13000 g’de 30 saniye santrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.
- Tekrar temiz toplama kaplarına alınan filtrelili tüplere 300 µL Wash Buffer eklenerek 13000 g’de 30 saniye santrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.
- Temiz toplama kaplarına alınan filtrelili tüpler tekrar 13000 g’de 1 dk santrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.
- Filtrelili tüpler temiz mikrosantrifüj tüplerine alındı ve 50 µL Elution Buffer eklenerek oda sıcaklığında 1 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler 13000 g’de 1 dk santrifüj edilerek saflaştırılmış total RNA elde edildi.

3.6. TOTAL RNA’LARDAN cDNA ELDESİ

Kullanılan Kit ve İçeriği

Exiqon Universal cDNA synthesis kit II (Katalog No. 203301, California, USA)

- 5x Reaction buffer
- Nuclease-free water
- Enzyme mix
- RNA spike-in template

cDNA eldesi için reaksiyon bileşenleri tablo III’teki gibidir.

Tablo III. cDNA eldesi reaksiyon bileşenleri.

REAKTİFLER	1 Örnek İçin Volum (µL)
5x Reaction buffer	2
Nuclease-free water	4,5
Enzyme mix	1
RNA spike-in template	0,5
Template total RNA	2
Total volum	10

cDNA eldesi için reaksiyon bileşenleri tablo III'teki gibi ependorf tüplerde mix şeklinde hazırlandıktan sonra 42 °C'de 60 dakika sonrasında 95 °C'de 5 dakika inkübe ettik. İnkübasyondan sonra elde ettiğimiz cDNA'ları RT-PCR yöntemiyle miR-141 çoğaltma işlemine kadar -20 °C'de sakladık.

3.7. RT-PCR AŞAMASI

Kullanılan Kit ve İçeriği

Exiqon miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR (Katalog No. 203403, USA)

- ExiLENT SYBR® Green master mix
- UniSp6 RNA Spike-in control primer set
- Nuclease free water

RT-PCR'da miR-141 çoğaltma işlemi için reaksiyon bileşenleri tablo IV'teki gibidir.

Tablo IV. RT-PCR'da miR-141 çoğaltma işlemi için reaksiyon bileşenleri.

REAKTİFLER	1 Örnek İçin Volum (µL)
PCR master mix	5
PCR primer mix	1
Diluted cDNA template	4
Total volume	10

RT-PCR'da floresan molekül olarak SYBR Green kullanıldı. PCR koşulları kitin protokolüne göre belirlendi. Buna göre, kullanılan polimerazı aktifleştirmek ve denatürasyon için tablo IV'te belirtilen reaksiyon bileşenleri 10 dak. 95 °C'de muamele edildi. Bunu 45 döngüden oluşan çoğaltma aşaması takip etti. Her bir döngü 10 saniye 95 °C, 60 saniye 60 °C ve 60 saniye 65 °C olmak üzere, bağlanma ve sentez aşamalarını içerir. PCR amplifikasyonlarının tamamlanmasını takiben, önce bir erime eğrisi analizi (melting curve analysis) gerçekleştirildi.

Bunun amacı, amplifikasyon reaksiyonunun özgüllüğü ve kimliğini doğrulamak, oluşan ürünlerde primer dimerleri gibi istenmeyen ürünlerin olup olmadığının saptanması idi. Arka plan sinyallerini içermeyen örnekler nicel analize tabi tutuldu.

miR-141'in analizi için U6 snRNA molekülü referans olarak kullanıldı. miR-141/ U6 snRNA oranı miR-141'in serumdaki miktarını normalize etmek için kullanıldı ve bu oran miR-141'in serumdaki göreceli değeri olarak gruplar arası karşılaştırmada kullanıldı.

3.8. SERUM tPSA ve sPSA ÖLÇÜMÜ

Elde edilen numunelerin tPSA ve sPSA düzeyleri otoanalizörde elektrokemiluminesans yöntemi ile (Roche Cobas e 601) analiz edilmiştir. Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) firmasına ait kitler kullanılarak PSA ve sPSA ölçüm sonuçları ng/ml olarak verildi.

tPSA ve sPSA'nın test prensibi şu şekildeydi ;

- Sandviç prensibi. Toplam süresi 18 dakika.
- 1. İnkübasyon: 20 µl numune, biotinleşmiş monoklonal PSA'ya özgü antikor ve rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş monoklonal PSA'ya özgü antikor reaksiyona girerek bir sandviç kompleksi oluşturdu.
- 2. İnkübasyon: Streptavidin kaplı mikropartiküller eklendikten sonra biyotin ile streptavidinin etkileşimi aracılığıyla kompleks katı faza bağlanmış hale geldi.
- Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücresi içine aspire edildi. Bundan sonra bağlanmamış maddeler ProCell/ProCell M ile uzaklaştırıldı. Elektrot üzerine voltaj uygulanması kemilüminesans emisyonunu indükledi, bu da bir fotoçoğaltıcı ile ölçüldü.

- Sonuçlar, 2 noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkodu aracılığıyla edinilen bir ana eğri ile tayin edildi.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel açıdan değerlendirme SPSS 20.0 (Statistics Program for Social and Science) programı ile gerçekleştirildi. tPSA, sPSA/tPSA yüzdesi ve miR-141 parametrelerinin gruplar arasında fark olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Parametreler arasındaki ilişkinin istatistiksel anlamlılığı için Pearson Korelasyon testi kullanıldı. tPSA, sPSA/tPSA yüzdesi ve miR-141 parametrelerinin istatistiksel kuvvetini görmek için, “Reciever Operating Curves” olarak adlandırılan ve özgüllük ve duyarlılığı kombine ederek yüzdesel bir oran veren (%AUC, “%Eğri Altındaki Alan”) eğriler oluşturuldu. Analizlerde $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

IV. BULGULAR

Çalışmamızda kontrol grubunu oluşturan 16 sağlıklı erkeğin yaş ortalaması $59,8 \pm 1,9$ olup, tPSA değerleri $0,86 \pm 0,11$ idi. Hasta grupları ise tPSA düzeyi 4-10 ng/ml arasında olan 23 BPH'lı ve 11 PCa'lı hastadan oluşmaktadır. Üç gruba ait tPSA, sPSA/tPSA yüzdesi, miR-141 ve gönüllülerin yaşlarına ait veriler ortalama±standart hata olarak tablo V'teki gibidir.

Tablo V. Gruplara ait parametre ve yaş verileri.

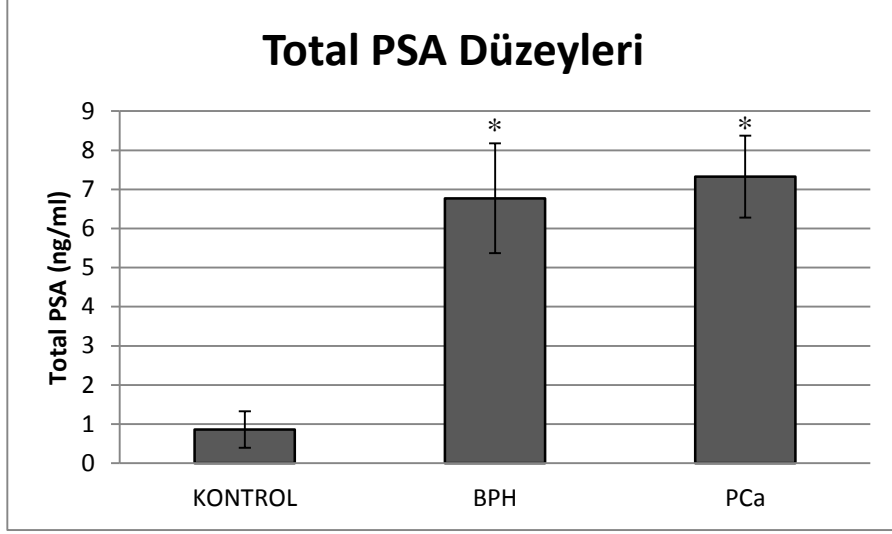
	tPSA (ng/ml)	sPSA/tPSA%	miR-141	Yaş
Kontrol (n=16)	$0,86 \pm 0,11$	$41,11 \pm 3,22$	$0,262 \pm 0,025$	$59,8 \pm 1,9$
BPH (n=23)	$6,77 \pm 0,29^*$	$19,29 \pm 1,45^*$	$0,297 \pm 0,038^{***}$	$65,8 \pm 1,3$
PCa (n=11)	$7,32 \pm 0,31^*$	$16,78 \pm 2,05^*$	$0,528 \pm 0,083^{**}$	$65,9 \pm 2$

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$.

** Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$.

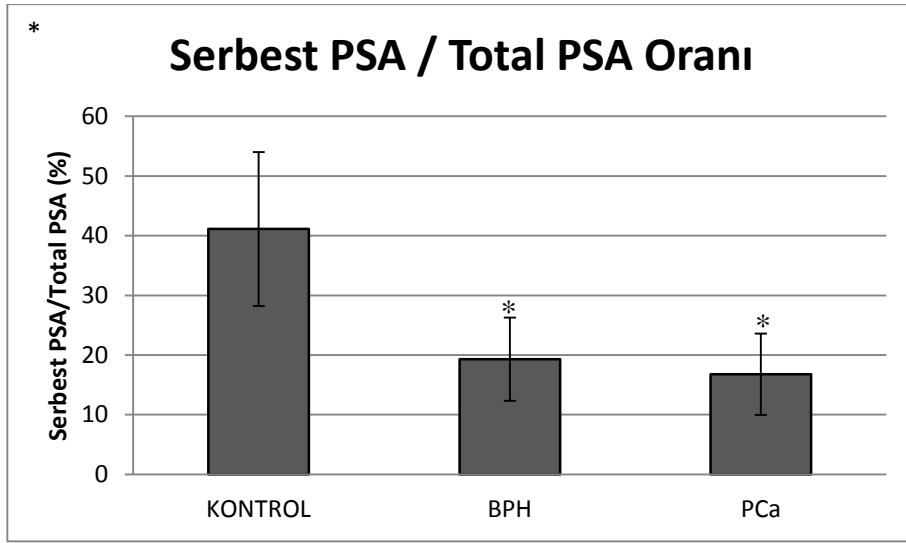
*** PCa grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$.

tPSA, sPSA/tPSA yüzdesi ve miR-141 düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Yapılan testin sonucunda, tPSA ve sPSA/tPSA yüzdesi değişkeni bakımından kontrol grubunun diğer gruplardan anlamlı olarak farklı olduğu belirlendi ($p < 0,001$) (şekil 6 ve 7). miR-141 düzeyi ise PCa grubunda diğer iki gruptan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$) (şekil 8).



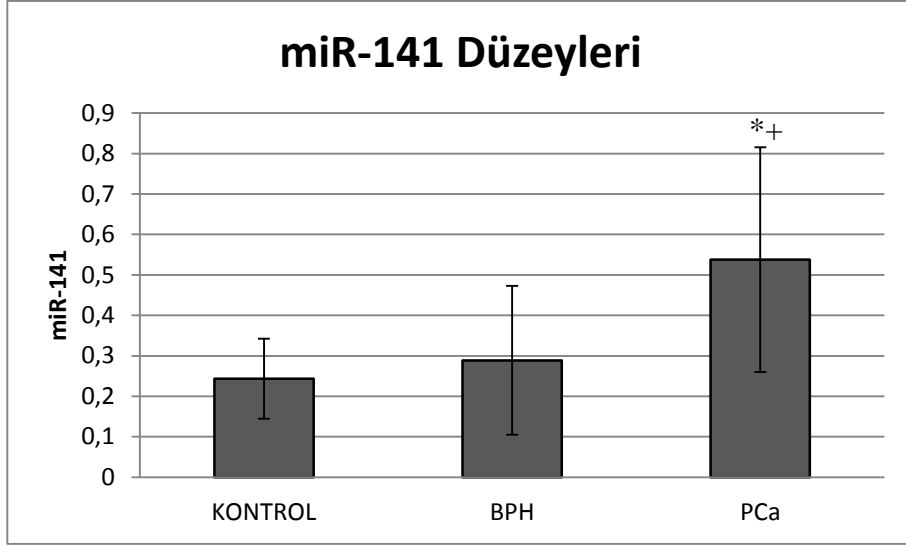
Şekil 6. Grupların serum PSA düzeyleri (ortalama±standart hata).

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$.



Şekil 7. Grupların serum sPSA/tPSA% düzeyleri (ortalama±standart hata).

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$.



Şekil 8. Grupların serum miR-141 düzeyleri (ortalama±standart hata).

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$.

+ BPH grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$.

Her bir grup ayrı ayrı dikkate alınarak ilgili parametreler arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı pearson korelasyon katsayısı dikkate alınarak değerlendirildi. Sadece kontrol grubunda miR-141 ile sPSA/tPSA% 'si arasındaki ters ilişki ($r = -0,619$) anlamlı olarak bulundu ($p < 0,01$) (tablo VI).

Tablo VI. Kontrol grubuna ait korelasyon.

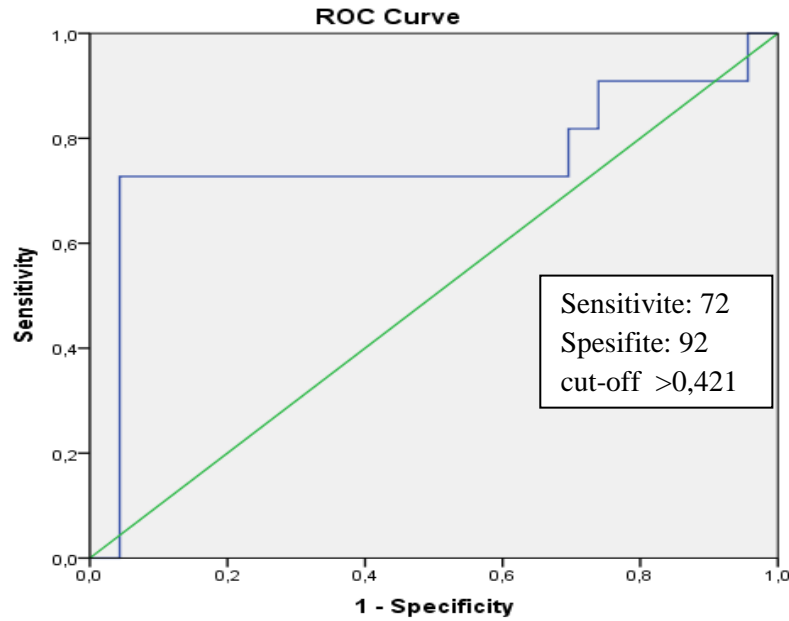
	miR-141	tPSA	sPSA/tPSA%
Kontrol grubu	r	0,18	-0,619
	p	0,504	0,011

Tüm gruplar birlikte ele alınarak değişkenler arasında bir ilişki olup olmadığı benzer yöntemle değerlendirildi. Buna göre, tPSA ile sPSA/tPSA% arasındaki ters ilişki ($r = -0,697$) anlamlı olarak bulundu ($p < 0,001$) (tablo VII).

Tablo VII. Üç gruba ait korelasyon.

	miR-141	tPSA	sPSA/tPSA%
<u>miR-141</u>			
r	1	0,207	-0,235
p		0,150	0,1
<u>tPSA</u>			
r	0,207	1	-0,697
p	0,150		0,000
<u>sPSA/tPSA%</u>			
r	-0,235	-0,697	1
p	0,1	0,000	

Serum miR-141 düzeylerinin grupları birbirinden ayırt etmedeki etkinliğini göstermek ve klinik karar değeri (cut-off : eşik değeri) belirlemek amacıyla ROC analizleri yapıldı. Duyarlılık (sensitivite) ve özgüllükleri (spesifite) için optimum değerler belirlenerek bunlara karşılık gelen cut-off değerleri seçildi.



Şekil 9. BPH ve PCa gruplarında miR-141'in ROC eğrisi (AUC=0,751).

BPH ile PCa grupları arasında miR-141 düzeyleri ROC eğrisinde değerlendirilmiş olup, optimum duyarlılık %72, özgüllük %92 (AUC=0,751) seçildiğinde karşılık gelen cut-off değerini $>0,421$ bulduk (şekil 9). Cut-off $>0,421$ iken BPH grubundan 2 hastanın (%8,7) cut-off değerinin üstüne çıktığı, PCa grubundan ise 3 hastanın (%27,3) cut-off değerinin altında olduğu görüldü.

V. TARTIŞMA

Kanser günümüzün en korkulan ve henüz çaresi bulunmayan hastalıkların başında gelmektedir. Ürogenital sistemi etkileyen kanser türleri, özellikle ileri evrelere ulaşmışlarsa, mevcut tedavi seçenekleri ile hastalıktan tümüyle kurtulma olasılığının fazla olmaması nedeniyle, hayatı tehdit eden hastalıklar olmaya devam etmektedirler (162).

Tüm tümörlerde olduğu gibi ürolojik tümörlerde de tümör belirteçleri kullanılarak erken tanı konulması ile erken evrelerde gerek cerrahi ve gerekse cerrahi dışı tedavi yöntemleri ile başarılı tedavi sonuçları elde etmek mümkündür. Tümör belirteçleri, hem ilk tanıda hem de tedavi sonrası tedavi başarısının monitorizasyonunda, nükslerin klinik olarak önemli hale gelmeden tespitinde ve prognozun öngörülmesinde kullanılmaktadır (163).

PCa üroloji alanındaki en önemli patolojilerden birisidir (14). Prostat kanseri (PCa) her yıl rapor edilen 899,000 yeni vaka (Tüm kanserlerin %14'ü) ile erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür (1). PCa erkeklerde kanser nedeni ölümlerde ikinci sırada gelmektedir (2). PCa'nın seyri tam olarak aydınlatılamamış olup hastalığın uzun bir latent faz ile genellikle sessiz olduğu bilinmektedir (3). PCa'lı hastaların prognozunun iyileştirilebilmesi için hastalığın erken teşhisi gereklidir. Günümüzde tanı amaçlı kullanılan yöntemler tPSA testi, PRM, transrektal ultrasonografi (TRUS) ve TRUS eşliğinde iğne biyopsisidir (32-36).

PCa ciddi ve yaygın olarak görülen, genellikle yavaş seyirli bir hastalık olup tüm tanı ve tedavi işlemlerinin yeterli olması için preklinik fazda hastalığın taranması gerekmektedir (47). PSA 1994 yılında FDA tarafından PCa'nın erken tanısında kullanılacak bir tarama aracı olarak onay almıştır (50,52). PSA prostat bezine spesifik olmasına karşın PCa'ya

spesifik değildir. Serum PSA düzeyi çeşitli ilaçlar, BPH, prostatit, ve ürolojik manipulasyonlarla değişebilmektedir (54).

Catalona ve ark. PSA ölçümünü PCa'nın taramasında üst sınırın 4 ng/ml olmasını önermişlerdir (53). PSA ölçüm eşiği 4 ng/ml olarak kabul edilip, PSA değerinin 10 ng/ml altındaki spesifikliğinin kötü olmasına rağmen 4 ng/ml eşiğini aşan durumlarda prostat biyopsisi yapılmalıdır. PSA düzeyi 4-10 ng/ml arasındaki erkeklerin %25-40'ı PCa olup, %60-75'ine de gereksiz biyopsi yapılmaktadır (53,64). PSA tanısal bir marker olarak kullanımını optimallikten oldukça uzaktır. Bu nedenle, tanı doğruluğunun iyileştirilmesi için acilen yeni ve daha spesifik biyomarkere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda ortaya çıkan bir araştırma alanı miRNA'lardır. Son yıllarda miRNA'lar tarafından kontrol edilen düzenleyici yollar incelenmiş ve değişen miRNA ekspresyonu ile tümörögenез arasında bir ilişki yapılan çalışmalarda saptanmıştır. PCa dahil çeşitli kanserlerin büyüme, gelişme, invazyon, metastaz ve prognozunun düzenlenmesinde yer aldıkları gösterilmiştir (8). Dolaşımdaki miRNA temelli tanısal araçların geliştirilmesi için gerekliliklerden biri miRNA'ları plazma ve serumdan yeterli sensitivite ve mutlulukla elde edebilmektir (9).

Çalışmamızda, prostat kanseriyle ilişkili olduğu belirtilmiş olan miR-141'in kontrol, BPH ve PCa gruplarındaki serum düzeylerini ve bu üç gruptaki tPSA ile sPSA/tPSA %'ni inceledik. Öncelikle, PCa ile BPH grupları arasında miR-141'in serum düzeylerini karşılaştırdık. PCa vakalarında miR-141'in anlamlı olarak arttığını gördük. tPSA ve sPSA/tPSA% değerleri karşılaştırıldığında bu iki hasta grubu arasında fark bulunmazken, miR-141'in farklı olması klinik kararda etkin olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Mitchell ve çalışma ekibi, metastatik PCa olanlarda kohort çalışmalarında çoklu miRNA analizi yapmışlar. Yaptıkları çoklu miRNA analizlerinden miR-141'in sağlıklı kontrolle karşılaştırıldığında PCa

hastalarında büyük bir farkla eksprese (46 kat fazla eksprese edilmiş) olduğunu ve PCa'yı %60 sensitivite ve %100 spesifite (AUC=0,907) ile belirleyebildiğini göstermişler (147). Ağaoğlu ve ark. yaptıkları çalışmalarında miR-141'in plazma düzeylerinin PCa'lı hastalarda sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen, metastazlı hastalarda lokalize+lokal ileri hastalığa sahip bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu belirtmişler (164).

BPH ile PCa grupları arasında miR-141 düzeylerini karşılaştırdığımızda, gruplar arasında anlamlı bir fark olup, bu anlamlı farkın PSA gri zonda tanısal değerinin tPSA ve sPSA/tPSA% 'nin iki grup arasındaki tanısal değerinden daha yüksek olduğunu gördük. Hao ve ekibi, 20 hastanın prostat doku örneklerinden (8 tanesi PCa, 12 tanesi BPH) 6 tane miRNA profil analizini çalışmışlar. Çalışmalarında, miR-141 ve miR-21 seviyelerinin PCa hastalarında BPH hastalarıyla karşılaştırıldığında iki kat daha yüksek olduğunu, diğer dört miRNA'nın her iki hastalıktada düşük düzeyde olduğunu tespit etmişler. PSA için standart cut-off 4 ng/ml kullanıldığında, yalnız başına PSA'nın pozitif prediktif değeri %40 iken, PSA ile miR-141 ve miR-21 kombine edildiğinde pozitif prediktif değerinin %87.5'e yükselttiğini yaptıkları çalışmalarında saptamışlar (165). Buna karşılık, Zhang ve çalışma arkadaşları, kemik metastazlı PCa, lokalize PCa ve BPH hastalarını içeren hasta gruplarında yaptıkları çalışmada, serum miR-141'in kemik metastazlı PCa hastalarında BPH ve lokalize PCa'lılardan daha yüksek iken, BPH ile lokalize PCa grupları arasında fark olmadığını bulmuşlardır (166). İlginç bir şekilde, Kachakova ve ark. miR-141'in PCa hastalarında BPH hastalarına kıyasla %71,43 oranında down regüle olduğunu göstermişlerdir (167).

Farklı çalışmalar arasında gözlenen farklılıkların çok sayıda nedeni olabilir. Bu nedenler arasında miRNA'ların doğru ölçümüyle ilişkili örnek toplanması ve örnek seçimleri gibi analiz öncesi değişkenlikler, miRNA ekstraksiyon etkinliğini etkileyen faktörler, kontaminasyon, amplifikasyon,

veri analizi ve normalizasyon ile ilgili teknik sorunlar sayılabilir. Günümüzde dolaşımdaki miRNA verilerinin değişken olması ve tutarlılığın bulunmamasının temel sebepleri muhtemelen miRNA ekstraksiyonu ve kuantifikasyonu, metodolojisi ve veri analizindeki değişkenliklerdir (9).

VI. SONUÇ

Çalışmamızın sonucunda, miR-141'in tPSA değeri gray zonda olan PCa hastalarını yine gray zonda olan BPH hastalarından ayırımında klinik karar aracı olarak tanısal gücünün yüksek olduğunu bulduk.

miR-141'in PCa hastalarını BPH hastalarından ayırabilecek potansiyel bir biyomarker olabileceğini ve klinisyenlerin PCa hastalarıyla ilgili verecekleri karara rehberlik edebileceğini düşünmekteyiz. Fakat, az sayıda çalışmanın mevcut olması ve sonuçların tutarsızlığı nedeniyle PCa hastalarında dolaşımdaki miRNA'ların klinik pratikte biyomarker olarak kullanım potansiyelini belirlemek için miRNA ölçüm yöntemlerinin standardize edilmesi ve daha geniş ölçekli hasta gruplarında klinik çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

VII. ÖZET

Prostat kanseri batı ülkelerindeki erkeklerin en sık malignitesidir ve kanser ölümlerinin ikinci sırasında gelmektedir. Prostat kanserinin güncel standart taraması serum PSA testi ile yapılmaktadır. PSA ölçüm eşiği 4 ng/ml olarak kabul edilip, PSA değerinin 10 ng/ml altındaki spesifikliğin kötü olmasına rağmen 4 ng/ml eşiğini aşan durumlarda prostat biyopsisi yapılmalıdır. PSA düzeyi 4-10 ng/ml arasındaki erkeklerin %25-40'ı PCa olup, %60-75'ine de gereksiz biyopsi yapılmaktadır. PSA, radikal prostatektomi sonrası hastaları izlemek için iyi bir marker olmasına rağmen, tanılayıcı marker olarak faydası optimal olmaktan uzaktır. Şuanda, prostat kanserinin teşhis ve izlem yaklaşımının yeniden değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. MicroRNA olarak bilinen küçük, kodlanmamış 19-23 nükleotid uzunluğundaki RNA'lar kanser oluşumu sırasında ortaya çıkarlar ve neredeyse tüm biyolojik mekanizmalarda yer alırlar. Özellikle hücre gelişimi, differansiyasyon, proliferasyon, anjiyogenez, apoptosiz, invazyon ve metastaz gibi birçok önemli karsinogenetik mekanizmalarda yer aldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, gray zone PSA düzeyinde olan hasta grubunda miR-141 seviyesinin noninvaziv bir test olarak hekimin bu hasta grubu ile ilgili vereceği kararlardaki etkinliğini belirlemeyi amaçladık.

Çalışma grubu, 11 PCa, 23 BPH ve 16 sağlıklı erkekten oluşturuldu. Serum örneklerinden total RNA izole edildi ve miRNA'lara özgü yaklaşımla küçük RNA molekülleri cDNA'ya dönüştürüldü. qRT-PCR ile olgun miR-141 düzeyleri saptandı.

Çalışmamızda, miR-141 düzeylerinin PCa hastalarında BPH hastalarından ve kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. PSA gray zonda olan PCa ile BPH hastalarda klinisyenlere kararda rehberlik edebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler : Prostat Kanseri, Benign Prostat Hiperplazisi, Mikro RNA, miR-141, Prostat Spesifik Antijen.

VIII. ABSTRACT

Prostate cancer is the most frequent malignancy of men in western countries and it is the second common cause of cancer death. The current standard for the diagnosis of PCa consists of a serum test for prostate-specific antigen (PSA). A serum PSA measurement of 4 ng/ml is generally regarded as the threshold above which a prostate biopsy should be performed, although the specificity of the test is poor when PSA values are below 10 ng/ml. Between 25% and 40% of men with PSA levels between 4 and 10 ng/ml will have prostate cancer, meaning that 60–75% of men with PSA levels in the 4–10 ng/ml range will undergo unnecessary biopsies. Although PSA is a very good marker for monitoring patients after a radical prostatectomy, its utility as a diagnostic marker is far from being optimal. At present, there is need to re-evaluate the approach to diagnose and monitor prostate cancer. Small noncoding RNAs that are 19-23 nucleotides long, known as microRNAs (miRNAs), are involved in almost all biological mechanisms during carcinogenesis. Specifically, these small RNAs are involved in almost all of the known hallmarks of carcinogenesis, including cell growth, differentiation, proliferation, angiogenesis, apoptosis, and invasion and metastasis. In this study, we aimed to determine the effectiveness of the miR-141 level as a noninvasive test among the patients in gray zone PSA level for the decision of the doctor related to those group of the patients.

For this purpose, a study group consisting of 11 PCa patients, 23 BPH and 16 healthy volunteers were established. Total RNA was extracted from serum, and with the approach of miRNAs-specific, small RNA molecules were converted to cDNA. By qRT-PCR, serum levels of mature miR-141 molecules were determined.

In our study, it has been found that the level of Mir-141 among PCa patients is significantly higher than the patients with BPH and the control group of patients. We think that miR-141 may guide the clinicians during the decision phase of the patients with PCa and BPH in PSA gray zone.

Key words : Prostate cancer, Benign prostate hyperplasia, micro RNA, miR-141, Prostate specific antigen.

IX. KAYNAKLAR

1. Dean M, Lou H. Genetics and genomics of prostate cancer. *AJA* 2013; 15:309–313
2. Truong W, Yang B, Jarrard D. Towards the Detection of Prostate Cancer in Urine: A Critical Analysis. *J Urol*. 2013; 189:422–429.
3. Efthimiou I, Skrepetis K, Bournia E. Single Foci Prostate Cancer: Current Diagnosis and Management. *Curr Urol* 2013; 7:1–6.
4. 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;2014:146170.
5. Cary KC, Cooperberg MR. Biomarkers in prostate cancer surveillance and screening: past, present and future. *Ther Adv Urol* 2013; 5:318–329.
6. Park HG, Ko OS, Kim YG, Park JK. Efficacy of Repeated Transrectal Prostate Biopsy in Men Younger Than 50 Years With an Elevated Prostate-Specific Antigen Concentration (>3.0 ng/ml): Risks and Benefits Based on Biopsy Results and Follow-up Status. *Korean J Urol* 2014; 55:249-253.
7. Ayyıldız SN, Ayyıldız A. PSA, PSA derivatives, proPSA and prostate health index in the diagnosis of prostate cancer. *Turkish J Urology* 2014; 40:82-88.
8. Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Ferná'ndez-Serra A, Lo'pez-Guerrero JA. miRNAs as biomarkers in prostate cancer. *Clin Transl Oncol* 2012; 14:803–811.
9. Sita-Lumsden A, Dart DA, Waxman J, Bevan CL. Circulating microRNAs as potential new biomarkers for prostate cancer. *BJC* 2013; 108:1925–1930.

10. Kelly BD, Miller N, Healy NA, Walsh K, Kerin MJ. A review of expression profiling of circulating microRNAs in men with prostate cancer. *BJU Int.* 2012; 111:17-21.
11. Huang X, Liang M, Dittmar R, Wang L. Extracellular MicroRNAs in Urologic Malignancies: Chances and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14:14785-14799.
12. Tanagho EA. McAninch J.W. Smith Genel Üroloji (Çeviri Editörü: Kazancı G.). İn: Ürogenital Sistem Anatomisi. Tanagho EA.(Çeviri Editörü: Zorlu AD.) 14. Baskı, Nobel Tıp Yayınları, İstanbul, 1999; sf. 1-16.
13. Carlsson J, Helenius G, Karlsson MG, Andren O, Klinga-Levan K, Olsson B. Differences in microRNA expression during tumor development in the transition and peripheral zones of the prostate. *BMC Cancer* 2013; 13:362.
14. Jacome-Pita F, Sánchez-Salas R, Barret E, Amaruch N, Gonzalez-Enguita C, Cathelineau X. Focal therapy in prostate cancer: the current situation. *ecancer* 2014; 8:435.
15. Westdorp H, Sköld AE, Snijer BA, Franik S, Mulder SF, Major PP, Foley R, Gerritsen WR, Vries IJMD. Immunotherapy for prostate cancer: lessons from responses to tumor-associated antigens. *Front. Immunol* 2014; 5:191.
16. Djulbegovic M, Beyth RJ, Neuberger MM, Stoffs TL, Vieweg J, Djulbegovic B, Philipp Dahm P. Screening for prostate cancer: systematic review and metaanalysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2010;341:c4543
17. Bozzini G, M.D., Colin P, Nevoux P, Villers A, Ph.D, Mordon S, Betrouni N. Focal therapy of prostate cancer: energies and procedures. *Urol Oncol* 2012; 31:155–167.

18. Umbehre M, Bachmann LM, Held U, Kessler TM, Sulser T, Weishaupt D, Kurhanewicz J, Steurer J. Combined Magnetic Resonance Imaging and Magnetic Resonance Spectroscopy Imaging in the Diagnosis of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol.* 2009; 55: 575–590.
19. Papatsoris AG, Papavassiliou AG. Prostate Cancer: horizons in the development of novel anti-cancer strategies. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2001; 1:47–70.
20. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–2917.
21. Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 1991; 63:963–966.
22. Hsing AW, Devesa SS. Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest?. *Epidemiologic Rev* 2001; 23:3–13.
23. Chu LW, Ritchey J, Devesa SS, Quraishi SM, Zhang H, Hsing AW. Prostate cancer incidence rates in Africa. *Prostate Cancer* 2011; 2011:947870.
24. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014. Türkiye Kanser İstatistikleri.Erişim:[www.kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu.pdf] Erişim Tarihi: 10/04/2014.
25. <http://www.kanser.gov.tr/index.php/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html>. 04/19/2013.

26. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AD. Campbell Uroloji (Çeviri Editörü: Anafarta MK, Yaman MÖ.). İn: Prostat Karsinomu. Epstein JI (Çeviri Editörü: İnci O.). 8. Baskı. Güneş Kitabevi. İstanbul 2005; 3003-3024.
27. Loeb S, Catalona WJ. The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. *Ther Adv Urol* 2014; 6:74-77.
28. Mandair D, Rossi RE, Pericleous M, Whyand T , Caplin ME. Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review. *Nutr Metab* 2014; 11:30.
29. Shavers VL, Underwood W, Moser RP. Race/ethnicity and the perception of the risk of developing prostate cancer. *Am J Prev Med* 2009; 37:64–67.
30. Dinçel Ç. Üroonkoloji. 2. Baskı, Avrasya Üroonkoloji Derneği, İzmir, 2013; 3-30.
31. Outwater EK, Montilla-Soler JL. Imaging of Prostate Carcinoma. *Cancer Control* 2013; 20:161-176.
32. Kash DP, Lal M, Hashmi AH, Mubarak M. Utility of Digital Rectal Examination, Serum Prostate Specific Antigen, and Transrectal Ultrasound in the Detection of Prostate Cancer: A Developing Country Perspective. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 3087-3091.
33. D'Amelio P, Roato I, Oderda M, Soria F, Zitella A, Ferracini R, Mengozzi G, Gontero P, Isaia GC. DKK-1 in prostate cancer diagnosis and follow up. *BMC Clinical Pathology* 2014; 14:11.
34. Shen P, Zhu Y, Wei W, Li Y, Yang J, Li Y, Li D, Wang J, Zeng H. The results of transperineal versus transrectal prostate biopsy: a systematic review and meta-analysis. *AJA* 2012; 14:310-315.

35. Harvey P, Basuita A, Endersby D, Curtis B, Iacovidou A, Walker M. A systematic review of the diagnostic accuracy of prostate specific antigen. *BMC Urology* 2009; 9:14.
36. Junker D, Zordo TD, Quentin M, Ladurner M, Bektic J, Horniger W, Jaschke W, Aigner F. Real-Time Elastography of the Prostate. *Biomed Res Int* 2014; 2014:11.
37. Shariat SF, Scardino PT, Lilja H. Screening for Prostate Cancer: An Update. *Can J Urol* 2008; 15:4363–4374.
38. Patel N, Vogel R, Chandra-Kuntal K, Glasgow W, Kelavkar U.A Novel Three Serum Phospholipid Panel Differentiates Normal Individuals from Those with Prostate Cancer. *Plos One* 2014; 9:e88841.
39. Zoorob R, Anderson R, Cefalu C, Sıdanı M. Cancer Screening Guidelines. *Am Fam Physician* 2001; 63:1101-1112.
40. Su MZ, Lenaghan D, Woo HH. Dichotomous Estimation of Prostate Volume: A Diagnostic Study of the Accuracy of the Digital Rectal Examination. *World J Mens Health* 2013 ; 31:220-225.
41. Horwich A, Hugosson J, de Reijke T, Wiegel T, Fizazi K, Kataja V. Prostate cancer: ESMO Consensus Conference Guidelines 2012. *Ann Oncol* 2013; 24:1141-1162.
42. Wilt TJ, Thompson IM. Clinically localised prostate cancer. *BMJ* 2006; 333:1102–1116.
43. Ravizzini G, Turkbey B, Kurdziel K, Choyke PL. New Horizons in Prostate Cancer Imaging. *Eur J Radiol.* 2009; 70: 212–226.

44. Ceylan C, Doluoglu OM, Aglamis E, Baytok O. Comparison of 8, 10, 12, 16, 20 cores prostate biopsies in the determination of prostate cancer and the importance of prostate volume. *Can Urol Assoc J* 2014; 8:e81-85.
45. De Jesus CMN, Corrêa LA, Padovani CR. Complications and risk factors in transrectal ultrasound-guided prostate biopsies. *Sao Paulo Med J.* 2006; 124:198-202.
46. Dell'atti L. Prostatic abscess after transrectal ultrasound-guided prostate biopsy. Case report. *G Chir* 2013;34:260-262.
47. Albertsen PC. Prostate-specific antigen: How to advise patients as the screening debate continues. *Cleve Clin J Med.* 2005 ;72:521-527.
48. Thompson IM, Ankerst DP. Prostate-specific antigen in the early detection of prostate cancer. *CMAJ* 2007; 176:1853-1858.
49. Der Meer SV, Löwik SAM, Hirdes WH, Nijman RM, Der Meer KV, Hoekstra-Weebers JE, Blanker MH. Prostate specific antigen testing policy worldwide varies greatly and seems not to be in accordance with guidelines: a systematic review. *BMC Family Practice* 2012; 13:100.
50. Venderbos LDF, Roobol MJ. PSA-based prostate cancer screening: the role of active surveillance and informed and shared decision making. *AJA* 2011; 13:219-224.
51. Hong SK. Kallikreins as Biomarkers for Prostate Cancer. *BioMed Research International* 2014; 2014: 526341.
52. Chu KC, Tarone RE, Freeman HP. Trends in Prostate Cancer Mortality among Black Men and White Men in the United States. *Cancer* 2003; 97:1507-1516.

53. Catalona WJ, Smit DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJJ, Petros JA, Andriole GL. Measurement of Prostate-Specific Antigen in Serum as a Screening Test for Prostate Cancer. *N Engl J Med* 1991; 324:1156-1161.
54. Obort AS, Ajadi MB, Akinloye O. Prostate-Specific Antigen: Any Successor in Sight?. *Rev Urol.* 2013;15:97-107.
55. Gann PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *Jama* 1995; 273:289-294.
56. Loeb S, Catalona WJ. PSA Screening: Pro. *Curr Opin Urol.* 2010; 20:185–188.
57. Vegvari A, Rezeli M, Welinder C, Malm J, Lilja H, Marko-Varga G, Laurell T. Identification of Prostate Specific Antigen (PSA) Isoforms in Complex Biological Samples Utilizing Complementary Platforms. *J Proteomics* 2010; 73: 1137–1147.
58. Malati T, Kumari GR, Murthy PVLN, Reddy CR, Prakash BS. Prostate specific antigen in patients of benign prostate hypertrophy and carcinoma prostate. *Indian J Clin Biochem* 2006; 21: 34–40.
59. Mikolajczyk SD, Rittenhouse HG. Pro PSA: a more cancer specific form of prostate specific antigen for the early detection of prostate cancer. *Keio J Med* 2003; 52: 86-91.
60. Vegvari A, Rezeli M, Sihlbom C, Häkkinen J, Carlsohn E, Malm J, Lilja H, Laurell T, Marko-Varga G. Molecular Microheterogeneity of Prostate Specific Antigen in Seminal Fluid by Mass Spectrometry *Clin Biochem* 2012; 45: 331–338.

61. Nogueira L, Corradi R, Eastham JA. Prostatic Specific Antigen for Prostate Cancer Detection. *Int Braz J Urol*. 2009; 35: 521-531.
62. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987; 317:909-916.
63. Acar Ö, Şanlı Ö. PSA: Tarihçe, Biyokimyasal ve Klinik Özellikler ve İzofomları. *Turk Urol Sem* 2012; 3: 49-54.
64. Andriole GL, Levin DL, Crawford ED, Gelmann EP, Pinsky PF, Chia D, Kramer BS, Reding D, Church TR, Grubb RL, Izmirlian G, Ragard LR, Clapp JD, Prorok PC, Gohagan JK. PLCO Project Team. Prostate cancer screening in the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening trial: findings from the initial screening round of a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:433-438.
65. Antenor JA, Roehl KA, Eggener SE, Kundu SD, Han M, Catalona WJ. Preoperative PSA and progression-free survival after radical prostatectomy for Stage T1c disease. *Urology* 2005; 66:156-160.
66. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, Lieber MM. Serum prostate-specific antigen in a community based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA*. 1993; 270:860-864.
67. Nash AF, Melezinek I. The role of prostate specific antigen measurement in the detection and management of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2000; 7:37-51.
68. Bangma CH, Kranse R, Blijenberg BG, Schröder FH. The value of screening tests in the detection of prostate cancer. Part II: Retrospective analysis of free/total

prostate-specific analysis ratio, age-specific reference ranges, and PSA density. *Urology* 1995; 46:779-784.

69. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Klee GG, Pettersson K, Piironen T, Abrahamsson PA, Stenman UH, Dowell B, Lövgren T, Lilja H. Free, complexed and total serum prostate specific antigen: the establishment of appropriate reference ranges for their concentrations and ratios. *J Urol.* 1995; 154:1090-1095.

70. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, Fozard JL, Walsh PC. Longitudinal evaluation of prostate specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA.* 1992; 267:2215-2220.

71. Loeb S, Catalona AJ. What to Do with an Abnormal PSA Test. *The Oncologist* 2008;13:299–305.

72. Adhyam M, Gupta AK. A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. *Indian J Surg Oncol* 2012; 3:120–129.

73. Catalona WJ, Southwick PC, Slawin KM, Partin AW, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, Richie JP, Walsh PC, Scardino PT, Lange PH, Gasior GH, Loveland KG, Bray KR. Comparison of percent free PSA, PSA density and age specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. *Urology.* 2000; 56:255-260.

74. Carter HB. Differentiation of lethal and non lethal prostate cancer: PSA and PSA isoforms and kinetics. *AJA* 2012; 14:355–360.

75. Vickers AJ, Roobol MJ, Lilja H. Screening for Prostate Cancer: Early Detection or Overdetection?. *Annu Rev Med* 2012 ; 63: 161–170.

76. Zhang MZ, Lu YP. From pro-prostate specific antigen, [-2]pro-prostate specific antigen to Beckman Coulter phi: the evolution of new biomarkers for early detection of prostatic carcinoma. *Chin Med J* 2012; 1259:1643-1649.
77. Jung K, Brux B, Lein M, Rudolph B, Kristiansen G, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Sinha P. Molecular Forms of Prostate-specific Antigen in Malignant and Benign Prostatic Tissue: Biochemical and Diagnostic Implications. *Clinical Chemistry* 2000; 46:47–54.
78. Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, Ward AM, Patnick J, Price CP, Rimmer J, Sturgeon C, White P, Allen NE. Use of Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoforms for the Detection of Prostate Cancer in Men with a PSA Level of 2-10 ng/ml: Systematic Review and Meta-Analysis. *European Urology* 2005; 48:386–399.
79. Luderer AA, Chen YT, Soriano TF, Kramp WJ, Carlson G, Cuny C, Sharp T, Smith W, Petteway J, Brawer MK, Thiel R. Measurement of the proportion of free to total prostate-specific antigen improves diagnostic performance of prostate specific antigen in the diagnostic gray zone of total prostate specific antigen. *Urology* 1995; 46:187-194.
80. Ulmert D, Serio AM, O'Brien MF, Becker C, Eastham JA, Scardino PT, Björk T, Berglund G, Vickers AJ, Lilja H. Long-term prediction of prostate cancer: prostate specific antigen (PSA) velocity is predictive but does not improve the predictive accuracy of a single PSA measurement 15 years or more before cancer diagnosis in a large, representative unscreened population. *J Clin Oncol.* 2008; 26:835-841
81. Vickers AJ, Ulmert D, Serio AM, Björk T, Scardino PT, Eastham JA, Berglund G, Lilja H. The predictive value of prostate cancer biomarkers depends on age and time to diagnosis: towards biologically-based screening strategy. *Int J Cancer* 2007; 121:2212-2217.

82. Wright JL, Lange PH. Newer Potential Biomarkers in Prostate Cancer. *Rev Urol.* 2007; 9:207-213.

83. Rhodes T, Jacobson DJ, McGree ME, St Sauver JL, Girman CJ, Lieber MM, Klee GG, Demissie K, Jacobsen SJ. Longitudinal changes of benign prostate-specific antigen and [-2]pro-prostate-specific antigen over 7 years in a communitybased sample of men. *Urology* 2012; 79: 655–661.

84. Wang W, Wang M, Wang L, Adams TS, Tian Y, Xu J. Diagnostic ability of %p2PSA and prostate health index for aggressive prostate cancer: a meta-analysis. *Scientific Reports* 2014; 4:5012.

85. Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma CH, Slawin KM, Marks LS, Loeb S, Broyles DL, Shin SS, Cruz AB, Chan DW, Sokoll LJ, Roberts WL, Van Schaik RHN, Mizrahi IA. A Multi-Center Study of [-2]Pro-Prostate-Specific Antigen (PSA) in Combination with PSA and Free PSA for Prostate Cancer Detection in the 2.0 to 10.0 ng/mL PSA Range. *J Urol* 2011; 185: 1650–1655.

86. Stephan C, Jung K, Semjonow A, Schulze-Forster K, Cammann H, Hu X, Meyer HA, Bögemann M, Miller K, Friedersdorff F. Comparative Assessment of Urinary Prostate Cancer Antigen 3 and TMPRSS2:ERG Gene Fusion with the Serum [-2]Proprostate-Specific Antigen–Based Prostate Health Index for Detection of Prostate Cancer. *Clinical Chemistry* 2013; 59:280-288.

87. Yencilek F, Koyuncu H. Prostat kanseri için idrar belirteçlerinde son durum analizi. *Üroonkoloji Bülteni* 2011; 10:11-16.

88. İrani J, Salomon L, Soulié M, Zlotta A, de la Taille A, Doré B, Millet C. Urinary/serum prostate-specific antigen ratio: comparison with free/total serum prostate-specific antigen ratio: comparison with free/total serum prostate-specific antigen ratio in improving prostate cancer detection. *Urology.* 2005; 65:533-537.

89. Bolduc S, Lacombe L, Naud A, Grégoire M, Fradet Y, Tremblay RR. Urinary PSA: a potential useful marker when serum PSA is between 2.5 ng/mL and 10 ng/mL. *Can Urol Assoc.* 2007; 1:377-381.
90. Dimakakos A, Armakolas A, Koutsilieris M. Novel Tools for Prostate Cancer Prognosis, Diagnosis, and Follow-Up. *Biomed Res Int* 2014; 2014:890697.
91. Jain S, Bhojwani AG, Mellon JK. Improving the utility of prostate specific antigen (PSA) in the diagnosis of prostate cancer: the use of PSA derivatives and novel markers. *Postgrad Med J* 2002; 78:646–650.
92. Xiao Z, Adam BL, Cazares LH, Clements MA, Davis JW, Schellhammer PF, Dalmasso EA, Wright GL Jr. Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease. *Cancer Res.* 2001; 61:6029-6033.
93. Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer. *Clin Chem* 2008; 54:1951-1960.
94. Martin SK, Vaughan TB, Atkinson T, Zhu H, Kyprianou N. Emerging biomarkers of prostate cancer. *Oncol Rep.* 2012; 28:409-417.
95. Bussemakers MJG, Bokhoven AV, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HFM, Schalken JA, Debruyne FMJ, Ru N, Isaacs WB. DD3: A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Research* 1999; 59:5975–5979.
96. Roobol MJ, Schröder FH, van Leenders GL, Hessels D, van den Bergh RC, Wolters T, van Leeuwen PJ. Performance of prostate cancer antigen 3 (PCA3) and prostate specific antigen in Prescreened men: reproducibility and detection characteristics for prostate cancer patients with high PCA3 scores (≥ 100). *Eur Urol* 2010; 58:893-899.

97. Perk H, Ergun O. Prostat kanser teşhisinde PCA3. Üroonkoloji Bülteni 2010; 9:68-71.
98. Jiang Z, Woda BA, Rock KL, Xu Y, Savas L, Khan A, Pihan G, Cai F, Babcook JS, Rathanaswami P, Reed SG, Xu J, Fanger GR. P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25:1397-1404.
99. Prensner JR, Rubin MA, Wei JT, Chinnaiyan AM. Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med.* 2012; 4: 127rv3.
100. Troyer DA, Mubiru J, Leach RJ, Naylor SL. Promise and challenge: Markers of prostate cancer detection, diagnosis and prognosis. *Dis Markers.* 2004; 20:117-128.
101. Stephan C, Jung K, Lein M, Sinha P, Schnorr D, Loening SA. Molecular Forms of Prostate-specific Antigen and Human Kallikrein 2 as Promising Tools for Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9:1133-1147.
102. Bickers B, Aukim-Hastie C. New Molecular Biomarkers for the Prognosis and Management of Prostate Cancer – The Post PSA Era. *Anticancer Res.* 2009;29:3289-3298.
103. Kong HY, Byun J. Emerging Roles of Human Prostatic Acid Phosphatase. *Biomol Ther* 2013; 21:10-20.
104. Tefekli AH. Prostat Kanserinde Yeni Belirteçler ve Phi Skoru. *Turk Urol Sem* 2012; 3:61-69.
105. Tefekli A, Tunc M. Future Prospects in the Diagnosis and Management of Localized Prostate Cancer. *ScientificWorldJournal.* 2013; 2013:347263.

106. Shariat SF, Semjonow A, Lilja H, Savage C, Vickers AJ, Bjartell A. Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncol.* 2011; 50: 61–75.
107. Hessels D, Schalken JA. Urinary biomarkers for prostate cancer: a review. *AJA* 2013; 15:333-339.
108. Costa FF. Non-coding RNAs: New players in eukaryotic biology. *Gene* 2005; 357:83–94.
109. Akkaya ZY, Dinçer P. Tedavi Yaklaşımlarında Yeni Bir Dönem: Kodlamayan RNA'lar ve Hastalıklar. *Marmara Medical Journal* 2013; 26:5-10.
110. Bodur E, Demirpençe E. Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2010; 41:82-89.
111. Gomes AQ, Nolasco S, Soares H. Non-Coding RNAs: Multi-Tasking Molecules in the Cell. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14:16010-16039.
112. Cellini F, Morganti AG, Genovesi D, Silvestris N, Valentini V. - Role of MicroRNA in Response to Ionizing Radiations: Evidences and Potential Impact on Clinical Practice for Radiotherapy. *Molecules* 2014; 19:5379-5401.
113. Elramah S, Landry M, Favereaux A. Micro RNAs regulate neuronal plasticity and are involved in pain mechanisms. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8:31.
114. Hrdlickova B, De Almeida RC, Borek Z, Withoff S. Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease. *BBA Molecular Basis of Disease* 2014; 1842:1910-1922.
115. White RWD, Vinall RL, Tepper CG, Shi X. MicroRNAs and their potential for translation in prostate cancer. *Urol Oncol.* 2009; 27:307-311.

116. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. *Cell*. 1993; 75:843-854.
117. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2006; 94:776-80.
118. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Med J* 2011; 38:113-120.
119. Yaroğlu HY, Görür A, Ayaz L, Fidancı ŞB, Akbayır S, Doğruer Ünal ZN, Kaplan E, Serin MS, Buğdaycı R, Ateş NA, Gümüş LT. Mersin ilinde sağlıklı bireylerde mikro rna ekspresyon profili. *Mersin Üniv. Sağlık Bilim Derg* 2011; 4:25-29.
120. Görür A, Tamer L. Mikro rna'nın terapötik kullanımı. *Mersin Üniv. Sağlık Bilim Derg* 2011; 4:1-7.
121. Vaziri PA, Rezaeieh KAP. Ökaryot Hücrelerde Korunmuş Mikro RNA'lar ve Hedef Transkripsyonların Faliyetleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2012; 5:96-98.
122. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Review Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; 116: 281–297.
123. Wang L, Li B, Li L, Wang T. MicroRNA-497 Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2013; 14:3499-3502.
124. Catto JWF, Alcaraz A, Bjartell AS, De Vere White R, Evans CP, Fussel S, Hamdy FC, Kallioniemi O, Mengual L, Schlomm T, Visakorpi T. MicroRNA

in Prostate, Bladder, and Kidney Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol.* 2011; 59:671-81.

125. Doxakis E. Principles of miRNA-Target Regulation in Metazoan Models. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14:16280-16302.

126. Yi B, Piazza GA, Su X, Xi Y. MicroRNA and Cancer Chemoprevention. *Cancer Prev Res* 2013; 6:401–409.

127. Zhang B , Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007; 302(1):1-12.

128. Bizuayehu TT, Babiak I. MicroRNA in teleost fish. *Genome Biol Evol* 2014; 6:1911-1937.

129. Costa MC, Leitão AL, Enguita FJ. Biogenesis and Mechanism of Action of Small Non-Coding RNAs: Insights from the Point of View of Structural Biology. *Int J Mol Sci.* 2012; 13:10268-10295.

130. D'Anzeo M, Faloppi L, Scartozzi M, Giampieri R, Bianconi M, Del Prete M, Silvestris N, Cascinu S. The role of Micro-RNAs in Hepatocellular Carcinoma: From Molecular Biology to Treatment. *Molecules.* 2014; 19:6393-6406.

131. Johanson TM, Lew AM, Chong MMW. MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Droscha and Dicer. *Open Biol* 2013; 3:130144.

132. Aşçı Çelik D, Aslan Koşar P, Özçelik N. MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2013; 20:121-127.

133. Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J. Biochem.* 2010; 148:381–392.

134. Ersoy Tunalı N, Tiryakioğlu NO. Kanserde MikroRNA'ların Rolü. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30:1690-700.
135. Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, TuschI T. microRNAs in Human Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 774:1–20.
136. Singh PK, Campbell MJ. The Interactions of microRNA and Epigenetic Modifications in Prostate Cancer. *Cancers* 2013; 5:998-1019.
137. Leva GD, Garofalo M, Croce CM. microRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2014; 9:287–314.
138. Beltrami C, Clayton A, Phillips AO, Fraser DJ, Bowen T. Analysis of urinary microRNAs in chronic kidney disease. *Biochem. Soc. Trans.* 2012; 40:875–879.
139. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett.* 2009; 285:116-126.
140. Kim WT, Kim W. MicroRNAs in prostate cancer. *Prostate Int* 2013; 1:3-9.
141. Calin GA, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:15524-15529.
142. Konaç E, Onen Hİ, Sozen S. Üroonkolojide MikroRNA (miRNA)'ların yeri ve önemi. *Üroonkoloji Bülteni* 2010; 9:3-13.
143. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL.

Detection of elevated levels of tumour associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141:672-675.

144. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435:834-838.

145. 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. *Prog Natl Acad Sci USA* 2006; 103:2257-2261.

146. Lorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:7065-7070.

147. Mitchel PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:10513-10518.

148. Xu B, Feng NH, Li PC, Tao J, Wu D, Zhang ZD, Tong N, Wang JF, Song NH, Zhang W, Hua LX, Wu HF. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 2010; 70:467-472.

149. Zang HL, Yang LF, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, Dai B, Zhu YP, Shen YJ, Shi GH, Ye DW. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate* 2011; 71:326-331.
150. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2009; 4:e6229.
151. Moltz F, Olshen AB, Baehner L, Peek A, Fong L, Stöppler H, Simko J, Hilton JF, Carroll P, Belloch R. Microfluidic-based multiplex Qrt PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Res.* 2011; 71:550-560.
152. Chen ZH, Zhang GL, Li HR, Luo JD, Li ZX, Chen GM, Yang J. A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate.* 2012; 72:1443-1452.
153. Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, Senzer N, Eklund AC, Han J, Nemunaitis J. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther.* 2009; 16:206-216.
154. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67:6130-6135.
155. Marimuthu A, Huang T, Selvana LDN, Renuse S, Nirujogi RS, Kumar P, Pinto SM, Rajagopalan S, Pandey A, Harsha HC, Chatterjee A. Identification of targets of miR-200b by a SILAC-based quantitative proteomic approach. *EuPA Open Proteomics* 2014; 4:10-17.

156. Cao Q, Lu K, Dai S, Hu Y, Fan W. Clinicopathological and prognostic implications of the miR-200 family in patients with epithelial ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7:2392-2401.
157. Romero-Pérez L, López-García MÁ, Díaz-Martín J, Biscuola M, Castilla MÁ, Tafe LJ, Garg K, Oliva E, Matias-Guiu X, Soslow RA, Palacios J. ZEB1 overexpression associated with E-cadherin and microRNA-200 downregulation is characteristic of undifferentiated endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2013; 26:1514-1524.
158. Yang D, Sun Y, Hu L, Zheng H, Ji P, Pecot CV, Zhao Y, Reynolds S, Cheng H, Rupaimoole R, Cogdell D, Nykter M, Broaddus R, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, Liu J, Shmulevich I, Sood AK, Chen K, Zhang W. Integrated Analyses Identify a Master MicroRNA Regulatory Network for the Mesenchymal Subtype in Serous Ovarian Cancer. *Cancer Cell*. 2013; 23:186-199.
159. Gonzales JC, Fink LM, Goodman OB Jr, Symanowski JT, Vogelzang NJ, Ward DC. Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2011; 9:39-45.
160. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev*. 2008; 22:894-907.
161. Tejero R, Navarro A, Campayo M, Vinolas N, Marrades RM, Cordeiro A, Ruiz-Martinez M, Santasusagna S, Molins L, Ramirez J, Monzo M. miR-141 and miR-200c as Markers of Overall Survival in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer Adenocarcinoma. *Plos One* 2014; 9:e101899.

162. Türkeri L, Özer A, Narter F. Moleküler üroloji. İn: ürogenital tümörlerde biyoloji ve karsinogenez (ed: Türkeri L). Üroonkoloji derneği İstanbul 1. Baskı 2012; sf 354.
163. Türkeri L, Özer A, Narter F. Moleküler üroloji. İn: ürolojide tümör belirleyicileri (ed: Baltacı S, Gökçe İ). Üroonkoloji derneği İstanbul 1. Baskı 2012; sf 366.
164. Agaoglu FY, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, Gezer U. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol.* 2011; 32:583-588.
165. Hao Y, Zhao Y, Zhao X, He C, Pang X, Wu TC, Califano JA, Gu X. Improvement of prostate cancer detection by integrating the PSA test with miRNA expression profiling. *Cancer Invest.* 2011; 29:318-324.
166. Zhang HL, Qin XJ, Cao DL, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, Dai B, Ye DW. An elevated serum miR-141 level in patients with bone-metastatic prostate cancer is correlated with more bonelesions. *Asian J Androl.* 2013; 15:231-235.
167. Kachakova D, Mitkova A, Popov E, Popov I, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Mitev V, Slavov C, Kaneva R. Combinations of Serum Prostate-Specific Antigen and Plasma Expression Levels of let-7c, miR-30c, miR-141, and miR-375 as Potential Better Diagnostic Biomarkers for Prostate Cancer. *DNA Cell Biol.* 2014; 34: 1-12.