

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RADYOTERAPİDE KULLANILAN YÜKSEK ENERJİLİ
X-IŞINLARININ MEME KANSERİ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN MİKRO RNA İFADE DÜZEYİNDE
İNCELENMESİ**

Merve GİRGİN

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Dilek BALIK

Ekim, 2024

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RADYOTERAPİDE KULLANILAN YÜKSEK ENERJİLİ
X-IŞINLARININ MEME KANSERİ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN MİKRORNA İFADE DÜZEYİNDE
İNCELENMESİ**

Merve GİRGİN tarafından hazırlanan tez çalışması 03.10.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Doktora Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Dilek BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek BALIK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç.Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Gürsel KARAHAN, Üye
TENMAK Nükleer Enerji Araştırma Enstitüsü

Doç. Dr. Murat TOPUZOGULLARI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Özal MUTLU, Üye
Marmara Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Dilek BALIK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Radyoterapide Kullanılan Yüksek Enerjili X-Işınlarının Meme Kanseri Üzerine Olan Etkilerinin MikroRNA İfade Düzeyinde İncelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Merve GİRGIN

İmza



Bu alışma, “Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün FDK-2019-3611” numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tez öğrencisi Merve GİRGİN, bu çalışma ile, “TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı 2211-C Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı” kapsamında desteklenmiştir.



Yavru kuşuma
ve
Minik kelebeğime

TEŞEKKÜR

Akademik bilgisi ve deneyimleri ile olduğu kadar ilkeli ve güçlü duruşu ile yolumu aydınlatan, sabrını ve hoşgörüsünü bir an olsun esirgemeyen, karşılaştığımız her zorlukta bana en büyük desteğı veren ve beni yüreklendiren, yalnızca akademik anlamda değil hayata dair de çok şey öğrendiğim, öğrencisi olmaktan her zaman büyük gurur duyacağım çok sevgili hocam Prof. Dr. Dilek BALIK’a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Her toplantıda sabırla beni dinleyen, çalışmamın her aşamasında fikir ve tecrübeleriyle yol gösteren Tez İzleme Komitesi Üyeleri Doç. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ’ye ve Doç. Dr. Gürsel KARAHAN’a;

2211-C Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu ve Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı’na;

Biyomühendislik Bölümü ve Fen Bilimleri Enstitüsü özelinde Yıldız Teknik Üniversitesi’ne;

Doktora tez çalışmamı destekleyen Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’ne;

Bir ekip olarak her çalışmada birbirimizden destek aldığımız, Rekombinant DNA Teknolojisi Araştırma Laboratuvarı ailesinin her bir ferdine;

Doktora çalışmamda kullanmış olduğum hücre hattını temin eden İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü ve Biyoloji Bölümü’nün bir parçası olan İleri Kök Hücre ve Biyomoleküler Teknoloji Araştırma Laboratuvarı’na;

Doktora çalışmamın her aşamasında benden desteğini, sabrını ve hoşgörüsünü hiç esirgemeyen, her çıkmazda yol gösteren ve moral veren Dr. Öğretim Üyesi Osman Mutluhan UĞUREL’e ve en çok ihtiyaç duyduğumuz zamanda verdiği destek ile çalışmanın tamamlanmasına büyük katkı sağlayan Dr. Öğretim Üyesi Ayberk AKAT’a;

Doktora süresimde bana pek çok konuda destek olan arkadaşlarım Dr. Erennur UĞUREL ve Dr. Tuğba Gül İNCİ'ye;

Tüm hayatını kızlarının okuması için çalışarak geçirmiş, bugünlere gelebilmemin en büyük mimarlarından, bana anılarıyla bile güç veren merhum canım babam Ekrem SARAYLI'ya, güçlü bir kadın olmanın ne olduğunu bana öğreten, her zaman desteği ile yanımda olan canım annem Hayriye SARAYLI'ya;

Doktoraya başladığım günden itibaren bana destek olan, en yoğun zamanlarda bile sabrını esirgemeyen eşim Gürol GİRGİN'e;

Uykusuz gecelerim ve bitmeyen işlerim nedeniyle zaman zaman sitemlerde bulunsalar da henüz anlamını bile bilmedikleri doktora kelimesini hayatlarının tam ortasına alıp her günlerinin gündemi yapan, çalışmalarım süresince bana sonsuz destek veren ve sabır gösteren, zor zamanlarımda şefkatlerini esirgemeyen, yaşam ve motivasyon kaynağım canım oğlum Mustafa Umut GİRGİN'e ve canım kızım Nihan GİRGİN'e teşekkür ederim.

Merve GİRGİN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Örnek Literatür Çalışmaları	2
1.1.2 Meme Kanseri Hücre Hatları ile Radyasyon Uygulamaları	3
1.2 Tezin Amacı	4
2 GİRİŞ	6
2.1 Meme Kanseri	6
2.1.1 Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması	6
2.1.2 Meme Kanseri Hücre Hatları	8
2.2 Radyasyon	10
2.2.1 İyonlaştırıcı Radyasyon	10
2.2.2 İyonlaştırıcı Radyasyonun Biyolojik Etkileri	14
2.2.3 İyonlaştırıcı Radyasyonun Tıpta Kullanımı	17
2.3 MikroRNA (miRNA)	22
2.3.1 MiRNA Biyogenezi	22
2.3.2 MiRNA'ların Düzenleyici Rolü ve Kansere İlişkisi	25
2.4 MiRNA'ların Biyobelirteç Rolü	27
3 MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1 Materyal	31
3.1.1 Hücre Kültürü	31

3.1.2 İyonlaştırıcı Radyasyon Uygulaması	32
3.1.3 Hücre Canlılık Tayini	32
3.1.4 Total RNA İzolasyonu	32
3.1.5 Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizi	32
3.1.6 Kullanılan Cihazlar	33
3.2 Yöntem.....	34
3.2.1 <i>In Vitro</i> Çalışmalar	34
3.2.2 Biyoinformatik Çalışmalar	38
4 BULGULAR ve TARTIŞMA	41
4.1 <i>In Vitro</i> Çalışmalar.....	41
4.1.1 Hücre Kültürü	43
4.1.2 Hücre Canlılık Tayini	43
4.1.3 Total RNA İzolasyonu	48
4.1.4 Kantitatif PCR Analizi	50
4.2 Biyoinformatik Çalışmalar.....	58
4.2.1 Farklı Düzeyde İfade Edilen Genlerin Tespiti	58
4.2.2 Gen Ontoloji Analizi	64
4.2.3 Protein-Protein Etkileşim Analizi	66
5 SONUÇ	72
5.1 Sonuçlar	72
5.2 Öneriler	75
KAYNAKÇA	77
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	109

SİMGE LİSTESİ

Bq	Bequerel (Radyasyon Aktivite Birimi)
C/kg	Coloumb / kilogram (Işınlama Doz Birimi)
Ci	Curie (Radyasyon Aktivite Birimi)
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Fosfat
Rem	Eşdeğer Doz Birimi
γ	Gama Işını
Gy	Gray (Soğurulan Doz Birimi)
μ l	mikrolitre
KH ₂ PO ₄	Monosodyum Fosfat
nm	nanometre
KCl	Potasyum Klorür
R	Röntgen (Işınlama Doz Birimi)
NaCl	Sodyum Klorür
Rad	Soğurulan Doz Birimi
Sv	Sievert (Eş Değer Doz Birimi)
X	X-ışını

KISALTMA LİSTESİ

Ago	Argonaute
ANOVA	İki Yönlü Varyans Analizi
Bq	Bequerel
C	Coloumb
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Ci	Curie
CT	Bilgisayarlı Tomografi
DEG	Farklı Düzeyde İfade Edilen Genler
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fetal Sığır Serumı
GEO	Gen İfade Omnibus
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory (Küresel Kanser Gözlemevi)
GO	Gen Ontolojisi
GY	Gray (Radyasyon Dozu Birimi)
HCC	Hepatosellüler Karsinom
HER	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ICRP	Uluslararası Radyasyondan Korunma Komitesi
IR	İyonlaştırıcı Radyasyon
Ki67	Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni
LINAC	Lineer Hızlandırıcı
MCF	<i>Michigan Cancer Foundation</i> (Michigan Kanser Derneği)
miRNA	mikroRNA

MR	Manyetik Rezonans
MTT	(3- (4,5-Dimetiltiazol-2-Yl) -2,5-Difeniltetrazolium Bromür
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	Optik Yoğunluk
PACT	Aktivasyon Protein
PBS	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PCR	Polimer Zincir Reaksiyonu
PPİ	Protein-Protein Etkileşimi
PR	Progesteron Reseptörü
Pri-miRNA	Primer miRNA
R	Röntgen
RISC	RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
SAD	Source Axe Distance (Kaynak – Eksen Mesafesi)
SD	Standart Sapma
SI	Uluslararası Birimler Sistemi
SSD	Source Skin Distance (Kaynak - Cilt mesafesi)
Sv	Sievert
TNBC	Üçlü Negatif Meme Kanseri
TRBP	Transaktivasyon-Yarut Bağlanma Protein
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Radyasyonun sınıflandırılması	10
Şekil 2.2	Alfa parçacığı bozunumu	11
Şekil 2.3	İyonlaştırıcı radyasyon türleri	12
Şekil 2.4	İyonlaştırıcı radyasyonun direkt ve dolaylı etkisi	15
Şekil 2.5	İyonlaştırıcı radyasyonun deterministik etkileri.....	16
Şekil 2.6	Radyasyonun biyolojik etkileri	17
Şekil 2.7	Lineer hızlandırıcı temel bileşenleri ve yardımcı sistemleri	21
Şekil 2.8	Lineer hızlandırıcı temel bileşenleri ve yardımcı sistemleri	22
Şekil 2.9	miRNA biyogenez yolağı.....	25
Şekil 3.1	İş akış şeması.....	34
Şekil 3.2	Işınlanmak üzere well-plate içerisinde hazırlanan hücreler	35
Şekil 3.3	Hücrelerin ışınlanması.....	36
Şekil 3.4	LINAC cihazı	36
	Işınlama deney planı Şekil 3.5'te verilmektedir.	37
Şekil 4.1	4 Gy ve 8 Gy IR'ye maruz kalan MCF hücre canlılığının karşılaştırmalı analizi.....	46
Şekil 4.2	4 Gy ve 8 Gy IR'ye maruz kalan MDA-MB-231 hücre canlılığının karşılaştırmalı analizi	47
Şekil 4.3	4 ve 8 Gy IR maruziyeti sonrasında MCF7 hücrelerinde miRNA ekspresyon analizi.....	50
Şekil 4.4	4 ve 8 Gy IR maruziyeti sonrasında MDA-MB-231 hücrelerinde miRNA ekspresyon analizi.....	51
Şekil 4.5	GSE40640, GSE59733 and GSE108895 veri setlerinden DEG olarak belirlenen ortak genlerin Venn diyagramı	61
Şekil 4.6	GSE40640, GSE59733 and GSE108895 veri setlerinin DEG ontoloji analizi. (A) Biyolojik proses, (B) Moleküler fonksiyon	65
Şekil 4.7	Üç veri setine ait analizler sonucunda belirlenen en belirgin 20 DEG'e ait protein-protein etkileşim ağı (A) GSE40640 (B) GSE59733 ve (C) GSE108895	67
Şekil 4.8	Ortak olarak tespit edilmiş DEG'lerin protein-protein etkileşimi (PPI) ağları (A) GSE59733 ve GSE108895 veri setlerinin ortak DEG ilişkisi (B) GSE40640 ve GSE108895 veri setlerinin ortak DEG ilişkisi	69

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Bazı tümör baskılayıcı ve onkogenik miRNA’lardan örnekler	4
Tablo 2.1 Radyasyon birimleri.....	13
Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.....	33
Tablo 4.1 MCF7 hücre hattı canlılık sonuçları	44
Tablo 4.2 MDA-MB-231 hücre hattı canlılık sonuçları.....	45
Tablo 4.3 Işınlama sonrasında 48 saat inkübe edilen MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin total RNA izolasyon sonuçları.....	49
Tablo 4.4 Işınlama sonrasında 96 saat inkübe edilen MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin total RNA izolasyon sonuçları.....	49
Tablo 4.5 GSE40640, GSE59733 and GSE108895 veri setlerinden kontrol örnekleri ve radyasyon uygulanan örnekler arasında ilk 20 DEG	60
Tablo 4.6 GSE40640, GSE59733 and GSE108895 veri setlerinden radyasyon öncesi/kontrol ve radyasyon sonrasında ortak olarak tespit edilen DEG’ler.....	68

Radyoterapide Kullanılan Yüksek Enerjili X-Işınlmasının Meme Kanseri Üzerine Olan Etkilerinin MikroRNA İfade Düzeyinde İncelenmesi

Merve GİRĞİN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Dilek BALIK

İyonlaştırıcı radyasyon, kanser tedavisinde DNA hasarı yoluyla kanser hücrelerini yok etmek için uygulanan etkili bir yöntem olmakla birlikte, kanser hücrelerinin yanı sıra çevre dokularda da hasara yol açabilmesi gibi önemli yan etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle, radyasyon tedavisinin hücresel ve moleküler etkilerini daha iyi anlamak yan etkileri en aza indirirken tedavinin etkinliğini artırmak açısından önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, terapötik iyonlaştırıcı radyasyonun meme kanseri üzerindeki moleküler etkileri mikroRNA düzeyinde incelenmiştir. Meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231, 4 ve 8 Gy düzeylerinde iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılmış ve toplam 7 gün boyunca izlenmiştir. Işınlamadan 96 saat sonra total RNA izolasyonu yapılmış ve kanser-iyonlaştırıcı radyasyon ilişkisinde rol aldığı açık erişimli veri tabanları ve literatür araştırmaları ile belirlenen miR-208a, miR-

124, miR-145'in ifade düzeyleri kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan meme kanseri hücre hatlarında, hücre canlılığında radyasyon dozuna bağlı anlamlı bir azalma olduğunu göstermiştir. Bu durum, iyonlaştırıcı radyasyonun hücre üzerinde oluşturduğu hasarın uygulanan doz ile ilişkili olduğunu ve hücre ölüm oranını artırdığını göstermiştir. Çalışmada ifade düzeyi değerlendirilen miRNA'lar arasında, özellikle miR-124 ve miR-145'in ifade düzeylerinde iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle istatistiksel olarak anlamlı değişimler tespit edilmiştir. Bu değişiklikler, iyonlaştırıcı radyasyonun yalnızca hücre ölümünü artırmakla kalmadığını, aynı zamanda hücre içi moleküler süreçlerdeki düzenleyici miRNA'lar aracılığıyla biyokimyasal yolları da etkilediğini göstermektedir. İyonlaştırıcı radyasyonun miRNA ifadesi üzerinde doza ve zamana bağlı olarak gösterdiği bu etkilerin, radyasyon tedavisine verilen hücresel yanıt mekanizmaların anlaşılmasına yardımcı olabileceği ve bu miRNA'ların radyoterapi etkinliğinin artırılması yönünde potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilebileceği önerilmektedir.

Elde edilen bulguların ileriki çalışmalar ile in vivo koşullarda doğrulanmasının terapötik iyonlaştırıcı radyasyonun kanser tedavisindeki etkinliğini artırmaya ve yan etkilerini azaltmaya yönelik stratejilerin geliştirilmesine, iyonlaştırıcı radyasyon uygulamasına miRNA ifade yanıtının bireysel tedavi planlarına dahil edilmesine ve kişiye özel tedavi yaklaşımlarının daha başarılı bir şekilde uygulanmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Radyoterapi, iyonlaştırıcı radyasyon, meme kanseri, miRNA ekspresyonu.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of High Energy X-Rays Used in Radiotherapy on Breast Cancer at the Level of MicroRNA Expression

Merve GİRĞİN

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Dilek BALIK

Ionizing radiation is an effective method applied in cancer treatment to destroy cancer cells by inducing DNA damage. However, it has a significant side effect, as it can also cause damage to surrounding tissues in addition to cancer cells. Therefore, a better understanding of the cellular and molecular effects of radiation therapy is critical to minimizing side effects while enhancing its therapeutic efficacy.

In this thesis, the molecular effects of therapeutic ionizing radiation on breast cancer were investigated at the microRNA level. Breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 were exposed to ionizing radiation at doses of 4 Gy and 8 Gy and monitored for a total of 7 days. Total RNA isolation was performed 96 hours post-irradiation, and the expression levels of miR-208a, miR-124, and miR-145—

identified through open-access databases and literature as being associated with cancer and ionizing radiation—were quantitatively analyzed. The findings revealed a significant dose-dependent reduction in cell viability in the irradiated breast cancer cell lines. This outcome demonstrated that the damage caused by ionizing radiation to the cells correlates with the applied dose, thereby increasing the rate of cell death. Among the analyzed microRNAs, statistically significant changes were observed in the expression levels of miR-124 and miR-145 due to the effects of ionizing radiation. These findings indicate that ionizing radiation not only increases cell death but also influences biochemical pathways through regulatory microRNAs involved in intracellular molecular processes. The dose- and time-dependent effects of ionizing radiation on microRNA expression could help elucidate the cellular response mechanisms to radiation therapy. Moreover, these microRNAs have the potential to serve as biomarkers for enhancing the efficacy of radiotherapy.

Further validation of these findings under *in vivo* conditions in future studies could contribute to developing strategies to improve the therapeutic efficacy of ionizing radiation in cancer treatment and reduce its side effects. Additionally, incorporating microRNA expression responses to ionizing radiation into individual treatment plans may enable more successful implementation of personalized therapy approaches.

Keywords: Radiotherapy, ionizing radiation, breast cancer, miRNA expression.

1.1 Literatür Özeti

İnsan genomunda 2000'den fazla mikroRNA (miRNA) bulunmakta olup her bir miRNA yüzlerce mRNA'yı kontrol etme potansiyeline sahiptir. Tek bir miRNA aynı anda birden fazla geni ve farklı moleküler yolları hedefleyebilir [1]. Bu nedenle miRNA'lar hücrel proseslerde önemli rol oynamaktadırlar [2, 3]. İyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan hücrelerde oluşan tepkiler de miRNA'ların rol oynadığı proseslerden biridir [4].

miRNA'ların ekspresyon seviyeleri iyonlaştırıcı radyasyon etkisiyle değişmekte olup [5] miRNA'larda radyasyona bağlı ekspresyon değişiklikleri normal insan hücreleri [6, 7], kanser hücreleri [8, 9, 10], insan dokusu ve kan örnekleri gibi çeşitli insan hücre tiplerinde tanımlanmıştır [11, 12, 13]. miRNA'ların iyonlaştırıcı radyasyon ile indüklenmiş ekspresyonları hücre tipi, uygulanan radyasyonun dozu ve uygulama süresine göre değişmektedir [1, 13]. Kanser hücreleri normal hücrelerle karşılaştırıldığında miRNA ekspresyonlarının düzensiz (deregüle) olduğu gözlenmektedir [14]. İnsan meme kanserinde miRNA düzensizliği ilk defa Iorio ve arkadaşları tarafından ortaya konmuş ve bu çalışmada miRNA'ların meme kanserinin teşhis ve prognozunda etkili olduğu fikri ortaya atılmıştır [15]. MiRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceğinin anlaşılması ile birlikte, meme kanseri [15], kolon kanseri [16], akciğer kanseri [17] gibi farklı kanser türlerinde oynadıkları rolleri inceleyen çalışmalar yapılmıştır. MiRNA'ların kanser hücrelerindeki ekspresyon seviyelerinde azalma olması durumunda baskılayıcı; artış olması durumunda onkogenik özellik gösterdiği gözlenmiştir [18]. Onkogenik (up-regüle) miRNA'lar potansiyel tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu inhibe ederken, tümör baskılayıcı (down-regüle) miRNA'lar tümör gelişiminden sorumlu

sinyal yollarının artmasına neden olmaktadır. Her iki sınıf miRNA da kanser gelişimini ve ilerlemesini teşvik edebilmektedir [19]. Tümör tedavisinde miRNA kullanımı; kanser gelişiminin, tümörlerin miRNA baskılayıcılarının ekspresyon seviyeleri üzerindeki yönlendirilmiş harekete göre değiştirilebileceği fikrine dayanmaktadır. miR-181a [20], miR-449a [21] ve miR-7 [22] gibi iyonlaştırıcı radyasyona duyarlı miRNA'lar DNA hasar yanıtı, hücre döngüsü ve apoptoz genlerini hedefleyerek radyosensiviteyi modüle edebilir [4]. Örneğin; beyin tümörü hücrelerinde miR-181a, Bcl-2 genini hedefleyerek radyosensiviteyi modüle edebilir. Sonuçta iyonlaştırıcı radyasyon hücresel yanıtı düzenleyen miRNA ekspresyonunu etkiler ve beyin tümörü hücrelerinde miR-181a radyasyon tedavisinin etkinliğini artırma da hedef olarak seçilebilir [20].

MiRNA'ların meme kanseri gelişiminde kritik rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur [23, 24]. Ayrıca meme kanseri hücrelerinde radyasyon direncinde miRNA'ların olası rollerini inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Örneğin miR-302'nin aşırı ekspresyonunun AKT1 ve RAD52 genlerinde ekspresyonun azalmasına ve kanser hücrelerinin radyoterapiye duyarlı hale gelmesine (radyosensivitenin artması) neden olduğu gösterilmiştir [2]. Tüm bu hususlar çerçevesinde miRNA'ların, kanserde radyasyon direncinin üstesinden gelmek için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için hedef olarak önemli potansiyele sahip [25] olabileceği sonucu çıkarılabilir. Bu kapsamda miRNA'ların ifadelerindeki değişimlerin kanser tedavisinde büyük önem arz ettiği yorumlanabilmektedir. Bu amaçla miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde değişikliğe neden olan etkenlerin belirlenmesi ve incelenmesi bu konuda yapılmış ve yapılacak olan çalışmaların temelini oluşturmaktadır [26].

1.1.1 Örnek Literatür Çalışmaları

Lison ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, literatür taraması ile meme kanseri kök hücrelerinde radyoterapiye yanıt oluşturabilecek ve biyobelirteç olabilme potansiyeli taşıdığı düşünülen 8 adet miRNA (miR-210, miR-10b, miR-182, miR-142, miR-221, miR-21, miR-93 ve miR-15b) seçilmiş ve in vitro (MCF7, MDA-MB-231 ve SKBR3 hücre hatları ile) ve in vivo düzeyde araştırmaların ardından bu miRNA'ların iyonlaştırıcı radyasyona verdikleri yanıtlar potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilmek üzere anlamlı bulunmuştur [27].

Bravata ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise MCF10A (meme dokusu hücresi), MCF7 (meme kanseri hücresi) ve MDA-MB-231 (meme kanseri hücresi) hücrelerine 9 Gy ve 23 Gy radyasyon uygulanmış ve ekspresyon değişimi gözlenen genler ve ilgili moleküler yolakları incelenmiştir. Çalışmada, aynı hücre hattına farklı dozda radyasyon uygulamasının gen ekspresyonunda değişiklik yaptığı gibi farklı hücre hatlarına aynı dozda radyasyon uygulamasının da gen ekspresyonunu da etkilediği gözlenmiştir. Buradan hareketle tümör alt tipinin değişmesinin gen ekspresyonunu etkileyen bir parametre olduğu vurgulanmıştır [28].

1.1.2 Meme Kanseri Hücre Hatları ile Radyasyon Uygulamaları

İyonlaştırıcı radyasyonun meme kanseri prognozu ve tedavisi üzerine yapılan çalışmalarında hücre hatları yaygın olarak kullanılmaktadır [29, 30, 31]. Farklı hücre hatlarının radyasyona verdiği yanıt farklı olduğu için bu tür çalışmalarda farklı hücre hatlarının kullanılması tercih edilebilmektedir [29, 32].

Örneğin Khoram ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 2 Gy, 6 Gy ve 10 Gy radyasyon dozlarının üç farklı meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231, SK-BR3 ve T47D) etkileri incelenmiştir. İyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti sonucunda canlılık değerinde en belirgin azalma gösteren hücre hatları T47D ve takiben MDA-MB-231 olmuştur. İyonlaştırıcı radyasyona en belirgin yanıt gösteren hücre hatları olarak değerlendirilmiştir [32].

Fazel ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise MCF7 hücre hattı kullanılmış, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy ve 10 Gy radyasyon uygulanmış ve hücre canlılığı incelenmiştir. Yapılan çalışmada radyasyon dozu arttıkça canlılık değerinin azaldığı gözlenmiştir [33].

Literatürde miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanabilmesine ilişkin, tümör baskılayıcı ve onkogenik özelliklerinin pek çok kanser türünün prognozu ve tedavisindeki rolü de incelenmiş ve bu kanser türlerinin metabolizmalarında etkili oldukları bulunmuştur (Tablo 1.1).

Tablo 1.1 Bazı tümör baskılayıcı ve onkogenik miRNA’lardan örnekler

Tümör Baskılayıcı miRNA’lar	Kanser Tipi	Referans
Let-7a	Meme kanseri	[35] [36]
miR-145	Pankreas kanseri Prostat kanseri	[37, 38]
Onkogenik miRNA’lar	Kanser Tipi	Referans
miR-181a	Meme kanseri	[39]
miR-182	Akciğer Kanseri	[40]

MiRNA’lar ile ilgili çalışmaların büyük bölümünü kanser üzerine yapılan araştırmalara oluşturmaktadır. Meme kanserinde miRNA’ların rolüne ilişkin ilk bilimsel çalışma 2005 yılında yayımlanmış [15] olup bu tarihten itibaren sayıları katlanarak artmaktadır [41]. 2005 yılında ilk çalışmanın yayımlanmasını takiben 2016 yılında yayımlanan çalışma sayısı 600’ü bulmuştur [41].

1.2 Tezin Amacı

Terapötik iyonlaştırıcı radyasyonun, ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülen meme kanseri üzerindeki moleküler etkilerinin incelenmesidir. Bu amaçla, literatürde farklı kanser türlerinde iyonlaştırıcı radyasyondan etkilendiği bildirilmiş moleküler yolaklardaki genler ve bu genlerin ifadelerinde görevli miRNA’lar, DisGeNET, NCBI, miRPathDB, miRWalk, miRBASE gibi açık erişimli veri tabanları ve literatürden seçilerek, etki ve yolaklarına göre sınıflandırılmış, biyoinformatik çalışmalar sonucunda uygun bulunanlar belirlenerek farklı dozlarda iyonlaştırıcı radyasyon uygulanmış meme kanseri hücre hatlarındaki kantitatif ifade düzeyleri moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilmiştir.

Terapötik iyonlaştırıcı radyasyonun meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığına ve miRNA ekspresyonun seviyesine etkilerinin doza ve zaman bağı olarak değişiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu ekspresyon modellerinin iyonlaştırıcı radyasyon yanıtına yönelik potansiyel biyobelirteçleri ve radyoterapi etkinliğini artırmaya yönelik terapötik hedeflerin önerilmesi hedeflenmiştir.



2.1 Meme Kanseri

Meme kanseri, küresel kanser vakalarının ikinci önde gelen türü olup kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanser türüdür. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) çevrim içi güncel veri tabanı olan GLOBOCAN 2022 verilerine göre 2022 yılında dünyada toplam 2,3 milyon yeni vaka ile meme kanseri tüm kanser vakalarının %11,6'sını oluşturmaktadır. Dünya çapında kansere bağlı ölümlerde dördüncü kadınlarda ise en önde gelen nedenidir. (666.000 ölüm, %6,9 oran). Dünyada teşhis edilen her dört kanser vakasından biri ve altı kanser kaynaklı ölümden biri meme kanseridir [42].

Meme kanseri, spesifik patolojik özelliklere [43], çeşitli tedavi modellerine yanıt oluşturmada farklılık gösteren biyolojik özellikleri taşıyan, pek çok alt tipin spektrumundan oluşan heterojen bir hastalıktır [44].

2.1.1 Meme Kanserin Moleküler Sınıflandırılması

Meme kanserinin farklı histolojik derecelere ve biyolojik özelliklere sahip alt sınıflarının klinik bulguları [45] ve tedavi yanıtları da farklı olup bu durum meme kanserinin tanısını ve tedavisini ve dolaylı olarak da prognozunu da etkilemektedir [46].

Modern moleküler profillem tekniklerinin ortaya çıkmasından önce meme kanseri sınıflandırmasında morfolojik gözlemlere dayanan histopatolojik yöntemler kullanılmakta idi. Ancak bu yöntemler, kanserin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan biyolojik olayların açıklanması, hastaya özel tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gibi konularda kısıtlamalara yol açmakta olduğundan yeni

sınıflandırma tekniklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur [43, 44]. Moleküler tekniklerin gelişmesi ile birlikte meme tümörlerinin ayrıntılı biyolojik özelliklerini tanımlamaya yönelik ve gen ekspresyonu bazlı yöntemler geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmaya başlanmıştır [44]. “Moleküler Sınıflama” olarak tanımlanan bu sınıflandırma ilk kez 2000 yılında Perou ve arkadaşları tarafından ortaya atılmış ve gen ifadesine ilişkin analiz çalışmaları baz alınarak meme kanseri luminal hücre benzeri, bazal hücre benzeri, normal epitel benzeri ve HER(İnsan Epidermal Büyüme Faktörü)2-pozitif olarak dört alt sınıfa ayrılmıştır [47].

Sorlie ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışmada, luminal alt grubun kendi içerisinde luminal A ve luminal B olarak ikiye ayrılabilceği öne sürülmüştür [48]. 2007 yılında ise Herschkowitz ve ekibi, hücreler arası bağlantı bölgesinde rol alan geniş bir gen ailesinin üyesi olan claudin low alt grubunu tanımlamıştır [49]. Moleküler alt grupları daha detaylı tanımlayacak yöntemlerin geliştirilmesiyle birlikte meme kanseri, dört ana gruba ayrılmıştır: luminal tip A ve B, HER2-pozitif ve üçlü negatif/bazal benzeri [50].

2.1.1.1 Luminal A (ER+, PR+/-, HER2-)

Meme kanseri vakalarının yaklaşık % 50-60'ını oluşturan en yaygın vaka tespit edilen alt grubudur. Gen seviyesinde yüksek ER (östrojen reseptörü) ve düşük proliferasyon ile karakterize olan bir alt türdür. Luminal A alt tipi, immünohistokimya ile; negatif HER2 ve düşük Ki67 (proliferatif hücre nükleer antijeni) indeksli; ER-pozitif ve/veya PR (progesteron reseptörü)-pozitif tümör olarak tanımlanır. İyi bir prognoza sahip olan bu alt tipin görüldüğü vakalarda tümörün nüks etme tehlikesi diğer türlere göre düşüktür. Luminal A tipi tümörlerin tedavi esas olarak hormonal yöntemlere dayanır [51, 52].

2.1.1.2 Luminal B (ER+, PR+/-, HER2+)

Meme kanseri vakalarının %15-20'sini oluşturan alt grubudur. Luminal A alt tipi ile karşılaştırıldığında daha agresif bir fenotip göstermektedir. Ayrıca Luminal A türüne göre daha yüksek bir histolojik dereceye ve proliferatif indekse; buna karşılık daha düşük prognoza sahiptir. Bu nedenle de nüks etme oranı daha yüksek ve sağkalım oranı daha düşüktür [16, 53, 54].

Proliferasyon ile ilişkili genlere ait ekspresyon seviyesi Luminal A alt tipine göre daha fazladır. Luminal B tümörlerine sahip vakalarda büyüme reseptörü (HER2)

sinyali genlerinin ekspresyonunun da yüksek olduğu gözlenir. HER2-pozitif olarak tespit edilen tümörlerin % 30'unu Luminal B tipi alt türler oluşturur [55].

2.1.1.3 HER2 Pozitif (ER-, PR, HER2+)

HER2 tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir ve meme kanseri vakalarının yaklaşık %11-30'unu oluşturur [56]. Meme kanserinin diğer alt türlerine göre hem biyolojik hem de klinik açıdan daha agresif nitelik taşımaktadır. HER2 geni ve HER2 yolağında görev alan ilgili diğer genlerin yüksek ekspresyonu ile karakterize edilen bu tümörler morfolojik olarak yüksek bir proliferativiteye sahiptir [57].

HER2-pozitif kanser türü, proliferativitelerinin yüksek olması nedeni ile Luminal A ve Luminal B kanser türlerine göre daha hızlı büyümeye eğilimine sahiptir ve özellikle tedavi edilmediğinde daha kötü bir prognoz sergilemektedir [44].

2.1.1.4 Üçlü Negatif Tümörler (ER-, PR-, HER2-)

Üçlü negatif meme kanseri, ER, PR ve HER2'nin negatif ekspresyonuna sahip bir meme kanseri alt türü olarak tanımlanır [58]. Üçlü negatif meme kanseri vakaları tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %15-20'sini oluşturmaktadır [59].

Son derece invaziv özellik gösteren bu meme kanseri türüne sahip vakalarda sıklıkla uzak metastaz gözlenir ve hayatta kalma süresi diğer türlere göre daha kısadır. Vakaların yaklaşık %40'ı ilk beş yıl içerisinde ölüm ile sonuçlanır [60, 61].

2.1.2 Meme Kanseri Hücre Hatları

İlk insan hücre dizisi, 50 yıl önce Amerika'da bir laboratuvarında George Gey tarafından kurulmuştur [62]. HeLa hücresi olarak adlandırılan bu hücre dizisi adını servikal karsinomaya sahip olan ve hücre hattının türetildiği Henrietta Lacks'dan almıştır. Bu buluş hücre kültürünün bugün bilinen şekli ile kanser araştırmalarında kullanılmasının yolunu açmıştır. Kanser araştırmalarında kültür hücre hatlarının kullanılmasının en büyük yararlarından biri, standart hücre kültürü ortamında kendiliğinden çoğalma yeteneğine sahip nispeten homojen bir hücre popülasyonunun bir sonsuz beslenmesinin sağlanmasıdır [63].

İlk meme kanseri hücre hattı 1958 yılında kurulan BT-20'dir [64]. Ancak doku çevresindeki stromadan canlı tümör hücrelerinin çıkartılmasındaki teknik zorluklar [65, 66, 67] ve hücre yetiştirme sürecinde uzun dönemde yaşanan sorunlar [65, 67] nedeniyle hücre hattı çalışmalarında azalmalar görülmüştür. Hücre hatlarının pek

çoğu 1970’li yıllarda kurulmuştur. Örneğin; MD Anderson serileri [67] ve halen dünyada en yaygın olarak kullanılan meme kanseri hücre dizisi olan MCF7, 1973’te Michigan Kanser Vakfı’nda kurulmuştur [68]. MCF7’nin ER ekspresyonu üzerinden yüksek hormon duyarlılığı göstermesi, hormon yanıtını incelemek için ideal bir model olması ve yaygın kullanımının en önemli nedenidir [69].

Çalışmamızda kullanılacak olan hücre hatları olan **MCF7** ve **MDA-MB-231**’e ilişkin detaylar aşağıda belirtilmektedir.

2.1.2.1 MCF7

MCF7, 1970 yılında 69 yaşındaki meme kanseri hastası Kafkas bir kadının meme dokusundan izole edilmiş [68] ve MCF (*Michigan Cancer Foundation*-Michigan Kanser Derneği) tarafından isimlendirilmiştir. MCF7 yüksek hormon duyarlılığı nedeni ile dünya genelinde en çok çalışılan meme kanseri hücre hattıdır [69].

MCF7 hücreleri, meme epiteline özgü çeşitli ideal özellikleri koruyan hücre hattının bir sonucu olarak in vitro meme kanseri çalışmaları için oldukça faydalıdır [70]. MCF7 hücreleri, hücre sitoplazmasındaki östrojen reseptörleri yoluyla östradiol formundaki östrojeni işleme yeteneğine sahiptir ve bu durum MCF7 hücre hattının bir ER pozitif hücre hattı olmasına yol açar. MCF7 ayrıca PR-pozitif ve HER2-negatif [71, 72], zayıf agresif, invaziv olmayan ve düşük metastatik özellik gösteren bir hücre hattıdır [73].

2.1.2.2 MDA-MB-231

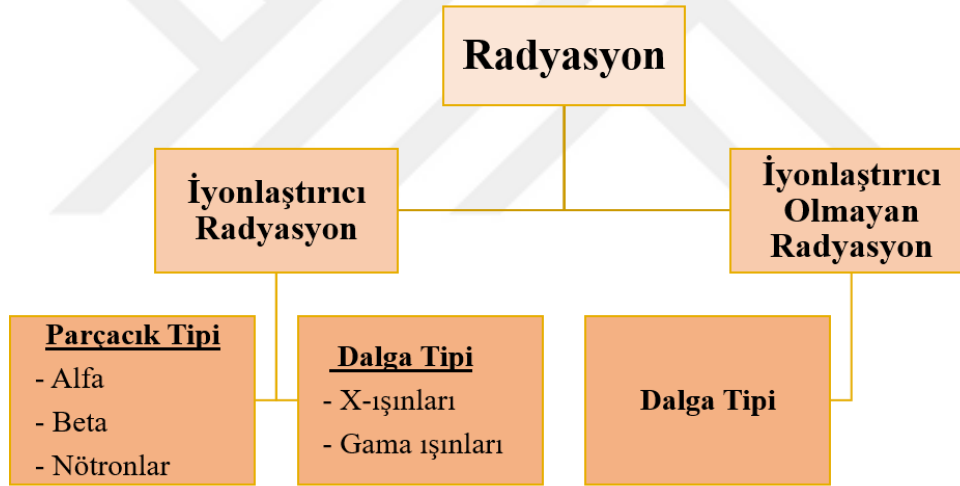
MDA-MB-231 hücre hattı, metastatik bir meme adenokarsinoması [69] olan 51 yaşındaki bir beyaz ırktan bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiş ve tıbbi araştırma laboratuvarları en sık kullanılan meme kanseri hücre dizilerinden biridir [74].

MDA-MB-231, ER ve PR ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonunun eksikliği nedeni ile oldukça agresif, invaziv ve zayıf farklılaşmış TNBC (üçlü negatif meme kanseri) hücre hatlarından biridir. Diğer istilacı kanser hücre hatlarına benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinin invaziv özelliği, hücre dışı matrisin proteolitik bozulması vasıtası ile gerçekleşir. MDA-MB-231’in bu in vitro ortamda gösterdiği istilacı fenotip çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasının en önemli nedenidir [75, 76].

2.2 Radyasyon

Radyasyon yüksek hızda parçacıkların ya da elektromanyetik dalgaların enerjisi olarak tanımlanmaktadır. Bir maddenin atom çekirdeğinde nötron sayısının proton sayısından fazla olması durumunda atom kararsız bir yapı göstermektedir. Kararsız yapıdaki atomlar bu kararsızlık nedeniyle fazla bir enerji sahip olurlar. Bu durumdaki atomlar bu fazla enerjilerini alfa, beta gibi parçacık ya da gama gibi ışıma yoluyla atarak kararlı yapıya geçmeye çalışırlar. Kararsız haldeki bir atomun kararlı yapıya geçmek için sahip olduğu enerjiyi parçacık veya dalga şeklinde yaymasına “**radyoaktivite**”; bu olay esnasında açığa çıkan enerjiye ise “**radyasyon**” adı verilmektedir [77, 78].

Radyasyon madde ile etkileştiklerinde gösterdikleri etkiye göre iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2.1) [79].



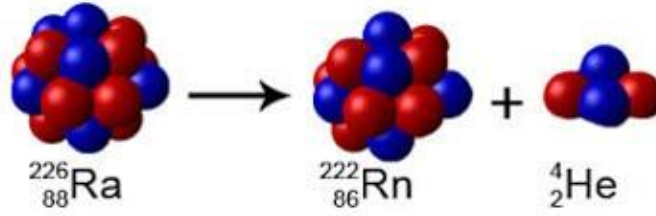
Şekil 2.1 Radyasyonun sınıflandırılması

2.2.1 İyonlaştırıcı Radyasyon

Atomlardan elektronlar koparabilecek enerjiye sahip olan dalga veya parçacık formundaki enerjidir. Çarptığı maddede yüklü parçacıklar (iyonlar) oluşturabilir. İyonlaştırıcı radyasyonu iki şekilde sınıflandırmak mümkündür. Bunlar, parçacık (partikül) ve dalga tipi radyasyonlardır. Partikül tipi radyasyon; belli bir kütle ve enerjiye sahip çok hızlı hareket eden parçacıklardır. Dalga tipi radyasyon ise, belli bir enerjiye sahip ancak kütlesi olmayan radyasyon çeşididir. Bunlar titreşim yaparak ilerleyen elektrik ve manyetik enerji dalgaları gibidir [79, 80].

2.2.1.1 İyonlaştırıcı Radyasyon Türleri

Alfa Parçacıkları: Alfa parçacığı iki protondan ve iki nötrondan oluşmuş ($2p, 2n$) bir Helyum çekirdeğidir ve pozitif yüklüdür. Alfa çıkararak çekirdeğin parçalanması olayı, atom numarası büyük olan izotoplarda görülür ve genellikle doğal radyoaktif atomlarda rastlanır. İyonlaştırıcı radyasyon çeşitleri arasında en yüksek enerjiye sahip olan türdür [81]. Diğer partikül tipi radyasyonlara göre daha ağır bir parçacık olup havada kısa bir menzile (sadece 1-2 cm) sahiptir; ince bir kağıt parçası veya vücut derisi tarafından tamamen soğurulabilir. Bu nedenle dış ışınlanma riski oluşturmamaktadır. Ancak alfa radyasyonu solunum ya da sindirim yoluyla vücuda alındığında, yakınındaki akciğer veya mide dokularının yüksek radyasyona maruz kalmasına neden olabilir (iç ışınlanma riski) [82]



Şekil 2.2 Alfa parçacığı bozunumu

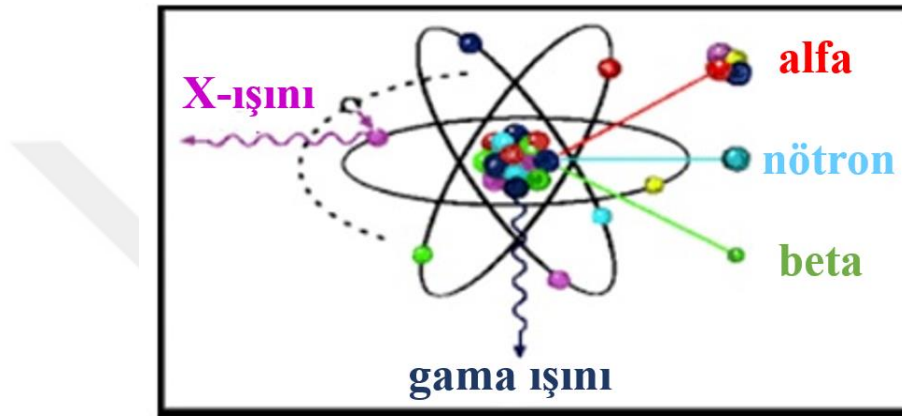
Beta Parçacıkları: Beta partikülleri pozitif ve negatif yüklü hızlı elektronlardır. Çekirdekteki enerji fazlalığı çekirdek civarında, $E = mc^2$ eşitliğiyle açıklanabilen, bir kütle oluşturmaktadır. Bu kütle çekirdekteki fazla yükü alır ve dışarıya bir beta ışını olarak çıkar. Canlı dokuya 2 cm'ye kadar nüfuz edebilir [83, 84].

X- Işınları: Bir atoma dışarıdan gelen veya gönderilen yüksek enerjili elektronlar o atomun ilk halkalarından elektronlar koparırlar. Atomdan kopan bu elektronun yerine daha yüksek seviyelerden elektronlar atlayarak kopan elektronun yerindeki boşluğu doldururlar. Bu sırada ortaya çıkan enerji fazlalığı X-ışını şeklinde dışarı salınır. Bunların dışında X-ışını yapay olarak, röntgen tüplerinde de elde edilir [83, 85].

Gama ışınları: Gama ışınları atomun çekirdeğinde oluşan radyasyon türüdür. Genellikle çekirdek, bir alfa veya bir beta partikülü yayımladıktan sonra ortaya çıkan kararsızlığa neden olan çekirdek enerjisi bir elektromanyetik radyasyon yayımlar. Buna gama radyasyonu denir. Dalga tipi bir radyasyon olması nedeniyle

gama ışınları, alfa ve beta radyasyonlarına göre daha girici (nüfuz edici) bir radyasyon türüdür [85, 86].

Nötronlar: Nötronlar yüksüz parçacıklardır. Bu özelliklerinden dolayı herhangi bir madde içerisine kolaylıkla nüfuz edebilirler. Doğrudan bir iyonlaşmaya sebep olmazlar. Ancak atomlarla etkileşimleri, iyonlaşmaya neden olan alfa, beta, gama veya X-ışınlarının ortaya çıkmasına neden olabilir. Yüksüz oldukları için madde ile zayıf etkileşime girerler ve dolayısıyla madde içerisine kolaylıkla nüfuz edebilirler ve kolayca durdurulamazlar [85, 87, 88].



Şekil 2.3 İyonlaştırıcı radyasyon türleri

2.2.1.2 İyonlaştırıcı Radyasyon Birimleri

Doz, herhangi bir maddenin belli bir zaman içerisinde kullanılan veya tüketilen miktarı demektir. Radyasyon dozu ise hedef kütle tarafından, belli bir sürede, soğurulan veya alınan radyasyon miktarıdır (Tablo 2.1) [89, 90, 91].

Tablo 2.1 Radyasyon birimleri

Nicelik	Özel Birim	SI (Uluslararası Birimler Sistemi) Birimi	Açıklama
Aktivite Birimi	Ci (Curie)	Bq (Becquerel)	Aktivite, birim zamandaki radyoaktif bozunma miktarını göstermektedir. (1Bq, saniyedeki bozunum sayısı)
Işınlama	R (Röntgen)	C/kg (Coulomb/kg) (özel bir adı yoktur)	Işınlama; X ve γ ışınlarının havayı iyonlaştırma kabiliyetinin bir ölçüsüdür.
Soğurulan Doz	Rad	Gy (Gray)	Materyalin bir birim kütlesinde depo edilen enerjinin ölçüsüdür.
Eşdeğer Doz	Rem	Sv (Sievert)	İyonlaştırıcı radyasyonların biyolojik madde üzerindeki etkisini belirtmek amacıyla kullanılmaktadır.

2.2.2 İyonlaştırıcı Radyasyonun Biyolojik Etkileri

İyonlaştırıcı radyasyonun biyolojik etkileri hücresel ya da moleküler düzeyde olabilir. İyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti durumunda onarılarak klinik etkiye neden olmayan hasarlar, onarılmaz ise kanserojen olabilen hasarlar, küçük bir popülasyonda hücre ölümüne yol açan onarılamayan küçük ölçekli hasarlar ya da akut radyasyon sendromu gibi bir organ sistemi içerisinde deterministik etkilerin oluşumuna yol açacak sayıda hücrelerin ölümüne neden olan büyük ölçekli hasarlar oluşabilmektedir [92]. Hasarın boyutu, maruz kalınan radyasyonun türü, enerjisi, miktarı ve maruz kalınan süre gibi pek çok değişkene bağlıdır [93].

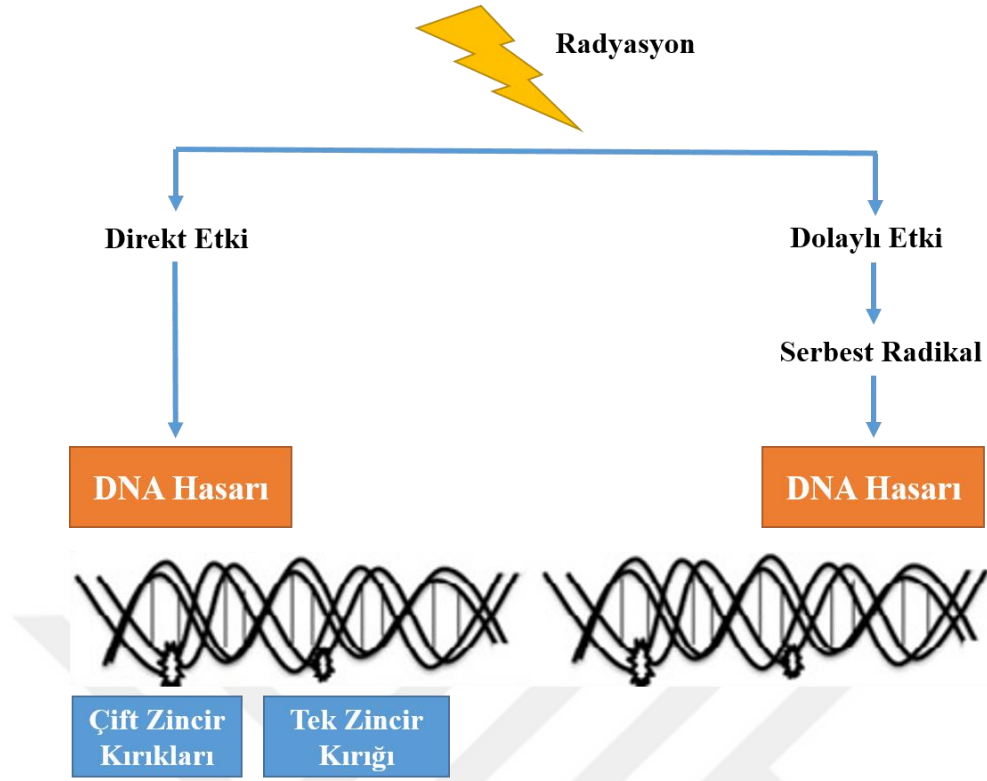
İyonlaştırıcı radyasyon etki ettiği hücrenin genetik materyalinde doğrudan ya da dolaylı olarak hasara neden olabilir. Bu etkiler iyonlaştırıcı radyasyonun direkt ve dolaylı etkileri olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.4) [94].

2.2.2.1 Direkt Etki

Bir elektron koparmaya yetecek enerjinin absorplanması bağ kırıklarıyla sonuçlanabilir [95]. Bu şekilde bir etki DNA'ya doğrudan bir hasara neden olabilmektedir. İyonlaştırıcı radyasyon etkisiyle DNA'da tek zincir ya da çift zincir kırıkları oluşabilmektedir. Çift zincir kırıkları, onarılmadığı takdirde hücre ölümüne yol açan, DNA için en tehlikeli hasarı oluşturan etkidir [96].

2.2.2.2 Dolaylı Etki

Radyasyonun dolaylı etkisi enerjinin bir atoma transferini takip eden serbest radikal türlerine bozunması olarak tanımlanmaktadır [95]. Bir serbest radikal, orbital pozisyonunda eşlenmemiş bir elektronu olan elektriksel olarak nötral bir atomdur [77]. Radikal elektrofilitir ve oldukça reaktiftir. Hücrede baskın molekül su olduğu için (yaklaşık %80) serbest radikal oluşumu su molekülünün uyarılması ve iyonlaşması mekanizması üzerinden yürür [96].



Şekil 2.4 İyonlaştırıcı radyasyonun direkt ve dolaylı etkisi

2.2.2.3 Deterministik ve Stokastik Etkiler

Radyasyonun genetik [97] ve somatik etkileri [98] ilk defa ICRP (Uluslararası Radyasyondan Korunma Komitesi)'nin 1958 [97] ve 1990 [98] yıllarına ait Tavsiyeler (*Recommendations*) başlıklı yayınları ile tanımlanmıştır. Radyasyonun biyolojik etkilerinin yalnızca somatik ve genetik olarak sınıflandırılması radyasyondan korunma çalışmaları için yeterli olmamış, etkilerin kantitatif olarak da değerlendirilmesi gereksinimi doğmuştur. Bunun üzerine ICRP 1977 yılında yayınladığı rapor (ICRP Publication 26) [5] ile radyasyonun biyolojik etkilerinin kantitatif olarak değerlendirilmesinde kullanılmak üzere iki yeni ifade olarak stokastik ve stokastik olmayan etkileri tanımlamıştır. 1991 yılında yayınlanan rapor (ICRP Publication 60) ile stokastik olmayan etki ifadesinin kullanımının uygun olmadığı belirtilmiş ve bunun yerine “önceki olaylardan çıkarılan sonuçlar ile belirlenen” anlamına gelen deterministik etki ifadesinin kullanılması önerilmiştir [99].

- **Deterministik Etki**

Deterministik etkilerin eşik dozu vardır. Radyasyon dozu belirli bir eşik düzeyini aştığı zaman ortaya çıkar ve doz (ve doz hızı) arttıkça daha erken ve daha şiddetli

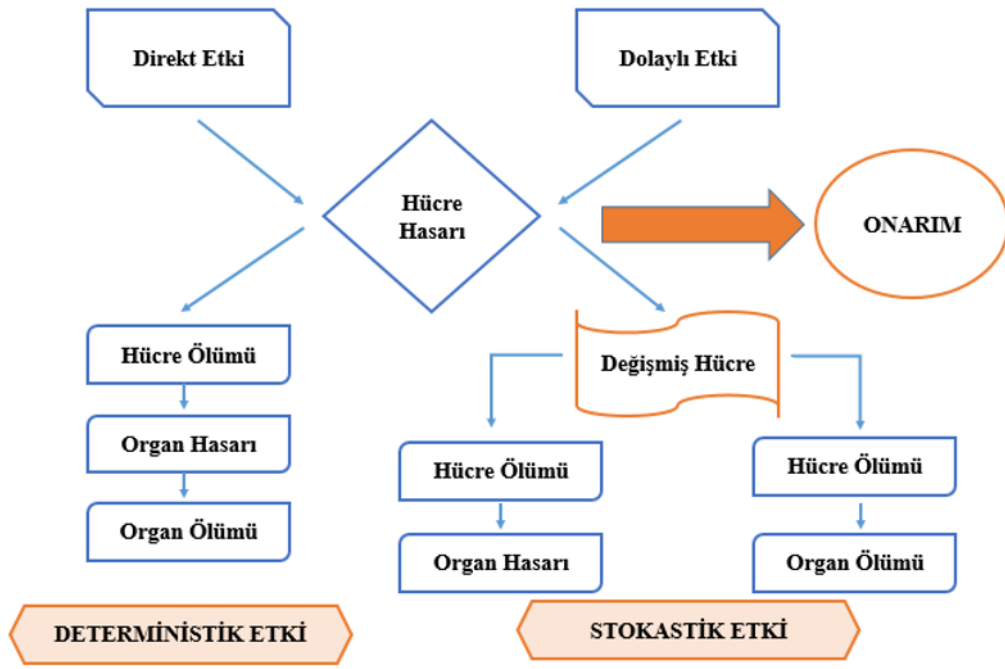
bir şekilde oluşur (Şekil 2.5). Radyasyonun vücutta oluşturacağı hasar farklı eşik dozlarına sahiptir. Örneğin; deride yanıklar için eşik doz 2-5 Gy, katarakt için eşik doz 0,5 Gy, geri dönüşümsüz cilt tahribi için eşik doz 20- 40 Gy'dir [93, 100]. Çok yüksek bir doz bir anda alındığında birkaç hafta içinde ölüme neden olabilmektedir [100].



Şekil 2.5 İyonlaştırıcı radyasyonun deterministik etkileri

- **Stokastik Etki**

Stokastik etkinin ortaya çıkması için bir eşik doz yoktur, düşük dozlarda da ortaya çıkabilmektedir. Radyasyon dozundaki artış etkinin şiddetini değil ortaya çıkma olasılığını artırır. Stokastik etkinin sonuçları bedensel (radyasyona maruz kalan kişide ortaya çıkan), kalıtsal (bir sonraki nesle aktarılabilen) ya da yaşam kısaltıcı olabilir. Lösemi, tiroid kanseri, tükürük bezi tümörleri, genetik bozukluklar stokastik etkilere örnek olarak verilebilir [95, 100, 101].



Şekil 2.6 Radyasyonun biyolojik etkileri

2.2.3 İyonlaştırıcı Radyasyonun Tıpta Kullanımı

19. yüzyılın sonlarında X-ışınlarının keşfedilmesi radyasyonun tıpta kullanımının dönüm noktası olmuş ve radyasyon hem teşhis hem de tedavide yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [102].

Tıbbi alandaki radyasyon uygulamaları, radyasyon ile görüntü elde edebilme ve radyasyonun hücre ve tümörleri yok edebilme yeteneğine sahip olması temeline dayanır. Radyasyon bu özellikleri nedeni ile hastalıkların teşhis (tanı) ve tedavisinde önemli rol oynar [103].

2.2.3.1 Radyoterapi

Radyoterapi, birleşik tümör tedavisinde kullanılmakta olan önemli bir yöntem olup, kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [104]. Bu tedavi yönteminin temeli kanser hücrelerinin (dokular) hedeflenmiş ışıma ile tahrip edilmesi esnasında kanser olan dokuyu saran normal hücrelerin (doku) radyasyondan en az düzeyde etkilenmesi prensibine dayanmaktadır [105]. Radyoterapötik etkinin belirleyici faktörleri optimal dozun uygulanması ve kanser hücrelerinin radyasyon yanıtıdır. Ancak biyolojik heterojenlik nedeniyle her hasta tümörü, belirli bir radyasyon dozuna karşılık farklı radyasyon duyarlılığı gösterebilmektedir. Bir tümör, tedavi amacıyla uygulanan radyasyon dozu ile kontrol edilemiyor ise radyasyona dirençli;

kontrol edilebiliyor ise radyasyona duyarlı olarak tanımlanabilmektedir [4]. Radyasyon tedavilerinde kanser hücrelerinin radyosensitivitesinin artırılması tedavinin etkinleştirilmesi yönünden önemli bir husustur [106]. Radyasyon direnci mikroçevresel oksijen azlığı, normal olmayan özgün DNA hasar yanıtı aktivitesi, onkogenlerin mutasyonu ya da tümör baskılayıcılar nedeni ile oluşabilir [107]. Kanser hücrelerinin radyasyon direncinin azaltılarak radyosensitivitesinin artırılması, radyoterapinin en önemli konularından biridir. Terapi sırasında uygulanan radyasyon ile sinerjik etki yaratabilecek yeni moleküllerin belirlenmesi bu yönü ile önem kazanmaktadır (Örn: miRNA) [108].

Günümüzde kanser tanısı konan hastaların yaklaşık %50-60'ı hastalık dönemi içerisinde radyoterapi almaktadır. Normal bir uygulamada tedavi 2 ila 10 hafta arasında sürmekte ve verilecek olan toplam radyasyon dozu haftada beş gün olacak şekilde fraksiyonlara bölünmektedir. Hastadan hastaya değişmekle birlikte bir radyoterapi süresince uygulanan toplam doz 30 ila 70 Gy arasında değişmektedir [109].

Radyasyon terapisi başka programlarda da verilebilir.

Hızlandırılmış (Akselere) Fraksiyon: Tedavinin uygulanacağı toplam hafta sayısını azaltmak için daha büyük günlük veya haftalık radyasyon dozlarının uygulanması.

Hiperfraksiyonlama: Daha küçük radyasyon dozlarının günde bir kereden fazla uygulanması.

Hipofraksiyonlama: Tedavi seans sayısını azaltmak için günde bir kez (veya daha az sıklıkta) daha büyük radyasyon dozlarının uygulanması [110, 111].

Uygun tedavi seçimi hekim tarafından her hastaya özgü olarak belirlenmektedir. Radyoterapi tek başına uygulanan bir tedavi yöntemi olabilmesine rağmen ameliyat ve kemoterapi ile birlikte de uygulanabilmektedir. Uygulanacak olan tedavinin belirlenmesinde aşağıda belirtilen parametreler göz önünde bulundurulur:

- Kanser türü; bazı kanser türleri radyoterapiye duyarlı, bazıları ise dayanıklılık gösterir. Örneğin; melanoma
- Hastalığın ilerleme derecesi,
- Hastanın genel sağlık durumu,
- Tümörün diğer organ veya dokulara olan yakınlığı,

- Diğer yöntemlerin etkinliği, (kemoterapi ve/veya ameliyat tek başına da yeterli olabilir) [4, 107, 109].

MiRNA'lar da DNA hasar onarımı, hücre döngüsü, apoptoz ve radyasyon ile ilgili moleküler yollarda düzenleyici olarak görev yapmaları nedeniyle kanser hücrelerinin radyasyon yanıtlarında kritik bir rol oynamaktadırlar [10, 13, 112, 113]. Bu nedenle miRNA'lar radyoterapinin etkinliğinin artırılmasında önemli molekülüdür [112].

2.2.3.2 Radyoterapi Uygulama Yöntemleri

- Radyoterapinin amacı;
- Kanseri tedavi etmek,
 - ✓ Lokal tümörleri yok ederek,
 - ✓ Cerrahi ve/veya ilaç tedavisi sonrasında kanserin tekrarlama riskini azaltarak
- Semptomları azaltmak veya iyileştirmek
 - ✓ Tümör büyüklüğünde küçülme hayat kalitesini artırır
 - ✓ Ağrı, kanama, nefes darlığı gibi semptomları iyileştirilebilir [4, 107, 109].

Radyoterapi eksternal (dış) ya da internal (iç) terapi olarak uygulanabilir.

• Eksternal (Harici) Radyoterapi

Vücut içerisindeki tümörün bulunduğu bölgeyi yüksek enerjili ışınlama (fotonlar, protonlar ve partikül radyasyon) ile dışarıdan ışınlama prensibine dayanarak uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan cihaz hastaya temas etmez ancak hastanın çevresinde dönerek pek çok farklı açıdan hastayı ıslayabilir. Lokal bir tedavi yöntemi olan eksternal terapide sadece hasta vücudunun hedeflenen spesifik bir bölgesi ıslanır. Örneğin; bir akciğer kanseri hastası sadece göğüs bölgesinden ıslanır [110].

Eksternal radyoterapi, kullanılan radyasyon türüne ya da uygulanan tedavi tekniğine göre sınıflanabilir. Kullanılan radyasyonun türüne eksternal radyoterapi foton şeklinde radyasyon üreten cihazlar veya parçacık şeklinde radyasyon üreten cihazlar aracılığı ile uygulanabilir [112]. Foton şeklinde radyasyon üretenler X-ışını kullanan cihazlar ya da Co-60 gibi radyoaktif kaynak aracılığı ile uygulanabilir.

Parçacık şeklinde radyasyon üreten cihazlarda elektron demetleri, proton ve nötron tedavileri örnek verilebilir [113, 114].

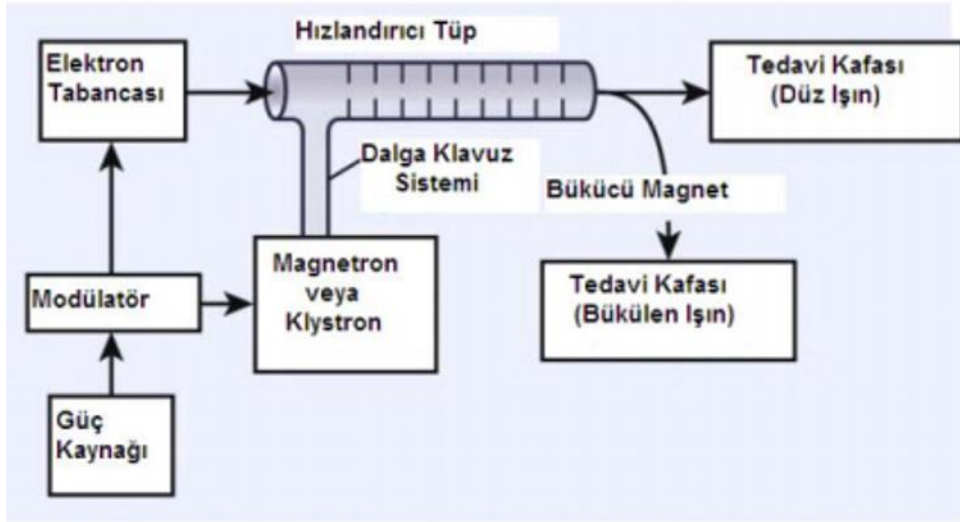
- **İnternal (Dahili) Radyoterapi**

İnternal radyoterapi, brakiterapi olarak adlandırılır ve vücut içerisinde bulunan tümörün yanına ya da yakınına radyoaktif materyal yerleştirilmesi prensibine dayanır. Hedeflenmiş radyasyonun normal dokuları en iyi koruyacak şekilde vücuda verilmesi yöntemidir. Radyoaktif kaynaklar veya kaynak taşıyıcı aygıtlar vücut yüzeyine, doku içine ve vücut boşluklarına yerleştirilebilir. Özellikle serviks ve korpus kanserlerinde, dışarıdan tedaviye ek olarak ya da tek başına yapılan vazgeçilmez bir yöntemdir [115]. Brakiterapi, tek başına ya da sıklıkla eksternal radyoterapi veya eş zamanlı kemoterapi ile birlikte uygulanır. Yöntemin uygulanmasında gama ışınları veren kapalı kaynaklar ve beta parçacıkları kullanılır [116]. Bu tedavinin amacı, radyasyon kaynağının hastanın cilt, beden boşluğu veya dokusu içine yerleştirilerek yalnızca o bölgede yüksek doz toplanmasını sağlamaktır. Doz kaynaktan uzaklaştıkça çok hızlı bir biçimde azalmaktadır. Böylece kaynağa temas halinde olan veya yakınına yerleşik olan tümör maksimum doz alırken, tümör etrafındaki normal doku elemanlarının dozu çok düşük olmaktadır [33, 117, 118].

2.2.3.3 Lineer Hızlandırıcı Sistemler (LINAC)

Lineer hızlandırıcılar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalar kullanarak yüklü parçacıkları hızlandıran; yüksek enerjili elektron ışınları ile doğrudan yüzeysel yerleşimli tümörlerin tedavisinde ya da hedefe çarptırılarak üretilen X-ışınları ile derin yerleşimli tümörlerin tedavisinde kullanılabilen cihazlardır (Şekil 2.7) [119].

MR (manyetik rezonans), CT (bilgisayarlı tomografi), vb. tıbbi görüntüleme cihazlarından alınan görüntüler vasıtasıyla, çevredeki sağlıklı dokulara zarar vermeden sadece kanser hücrelerine yüksek dozda radyoaktif ışın uygulayan eksternal tedavi cihazıdır [120].



Şekil 2.7 Lineer hızlandırıcı temel bileşenleri ve yardımcı sistemleri

LINAC, yüksek gerilim altında metal hedeften koparılan elektronları akseleratör tüpü içerisinde hızlandırarak, bu elektronların 'Gantry'de (cihazın kafa bölgesi) bir hedefe çarptırılması sonucu oluşan X-ışınlarını, belli kolimatörler vasıtasıyla hastaya odaklar [122]. Uygulanan bu radyasyon vücutta saniyeler içerisinde tepkimelere yol açar ve bu tepkimeler sonucunda oluşan moleküller kanser hücrelerin genetik kodu olan DNA'larda kırılmalar meydana getirir. Böylece genetik kodu hasarlanan tümör hücreleri bundan sonra bölünemez ve ölmeye başlarlar. Bu işlem sırasında hastada herhangi bir kanama, yara, acı, vs. gözlenmez [123].

- **LINAC Yardımcı Elemanları (Şekil 2.8)**

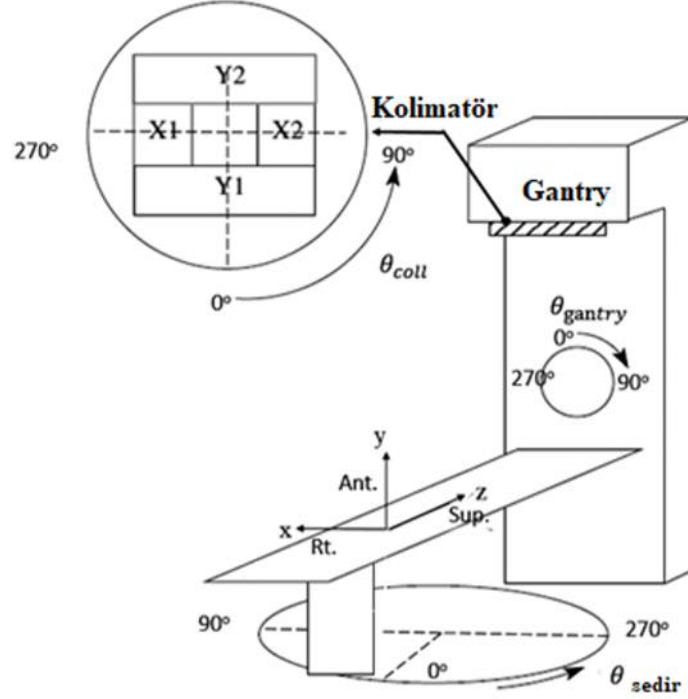
SAD (Source Axe Distance): Kaynak - eksen mesafesi [124]

SSD (Source Skin Distance): Kaynak - cilt mesafesi [124]

Gantry: Kolimatör bloğunu içinde bulunduran hastaya uygulanan ışının çıktığı son kısımdır. Çok yüksek bir hareket kabiliyetine sahip olması sayesinde hastanın tedavi bölgesine konumlanabilmektedir. 360°'ye kadar dönebilme ve yukarı aşağı hareket edebilme kabiliyetine sahiptir [123, 125].

Kolimatör: Lineer hızlandırıcıdan çıkan ışınları rastgele dağılmamaları için belirli bir doğrultuya yönlendirmeye ya da daraltmaya yarayan, X-ışını demetlerini tümörün fiziki yapısına göre şekillendiren cihazdır [123, 125].

Bolus: Hastanın düzensiz kontürlerini düzeltmek ve huzmeye uygun düz yüzeyi oluşturmak için cilt yüzeyine direkt olarak yerleştirilen doku eşdeğeri bir maddedir [123].



Şekil 2.8 Lineer hızlandırıcı temel bileşenleri ve yardımcı sistemleri

2.3 MikroRNA (miRNA)

MiRNA'lar uzunluğu 19-25 nükleotitten oluşan küçük, endojen, tek iplikçikli ve protein olmayan kodlayıcı RNA ailesidir. İlk miRNA lin-4 1993 yılında *Caenorhabditis elegans* lin4 lokusundan kopyalanan küçük bir RNA olarak keşfedilmiştir [126]. MiRBase miRNA dizisi veritabanına göre insan genomu bugüne kadar 2654 olgun miRNA dizisini içerir [127]. MiRNA'lar oldukça spesifik etkileşimler ve karmaşık düzenleyici ağlar aracılığıyla farklı dokulardaki ve gelişim aşamalarındaki gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenleyicileri olarak görev yapar [128, 129, 130].

2.3.1 MiRNA Biyogenezi

MiRNA biyogenezi mekanizmaları, çekirdekte miRNA transkripsiyonundan başlayarak stoplazmada olgunlaşmaya giden önemli biyolojik adımları içerir [8]. MiRNA genleri intergenik ya da intragenik olabilir. İntergenik miRNA genleri

promotorler, transkript sekansları ve sonlandırıcı üniteleri de dahil olmak üzere kendi transkripsiyon üniteleri ile bağımsızdır [131, 132]. İntragenik genler ise konakçı genlerin intronik veya ekzonik bölgelerinde bulunur ve aynı transkripsiyonel üniteleri bu konakçı genler ile paylaşır [133, 134]. MiRNA biyogenezinin ilk aşaması olan Drosha prosesi primer miRNA'dan (pri-miRNA) premiRNA'nın üretilme evresidir. Memelilerde miRNA genleri birincil transkriptleri (pri-miRNA) üretmek için RNA Polimeraz II/III ile kopyalanır. Pri-miRNA'lar tipik olarak bir 5'- cap ve bir poli-A zincii ile stem-loop (kök halka) yapıya sahip birkaç bin baz uzunlukta tek zincirli bir yapıya sahiptir [135, 136]. RNA Polimeraz-I| miRNA transkripsiyonunda kullanılan temel polimeraz türüdür. Ancak RNA Polimeraz-II ile transkripsiyona sokulan Alu elemanları ile ilişkili küçük miRNA grupları da bulunmaktadır [137, 138]. Pri-miRNA'lar bir mikroişlemci kompleksi olan DGCR8 (Drosha-DiGeoger sendromu kritik bölge geni) aracılığı ile işlenerek yaklaşık 70 nükleotit uzunluğunda ve saç tokası formundaki bir ya da birkaç pre-miRNA'ya dönüştürülür [139, 140].

Drosha pri-miRNA'yı parçalayan RNase III tipi endonükleazdır. Mikroişlemci komplekste DGCR8 ise pri-miRNA'yı tanıyan, Drosha katalitik bir alt birim fonksiyonu gösteren bir proteindir. Drosha çift iplikli ilmek yapısını pri-miRNA'dan ayırarak 52 ucunda monofosfat ve 3' ucunda 2 nükleotit hidroksil bulunan pre-miRNA'ya dönüştürür [127, 141, 142].

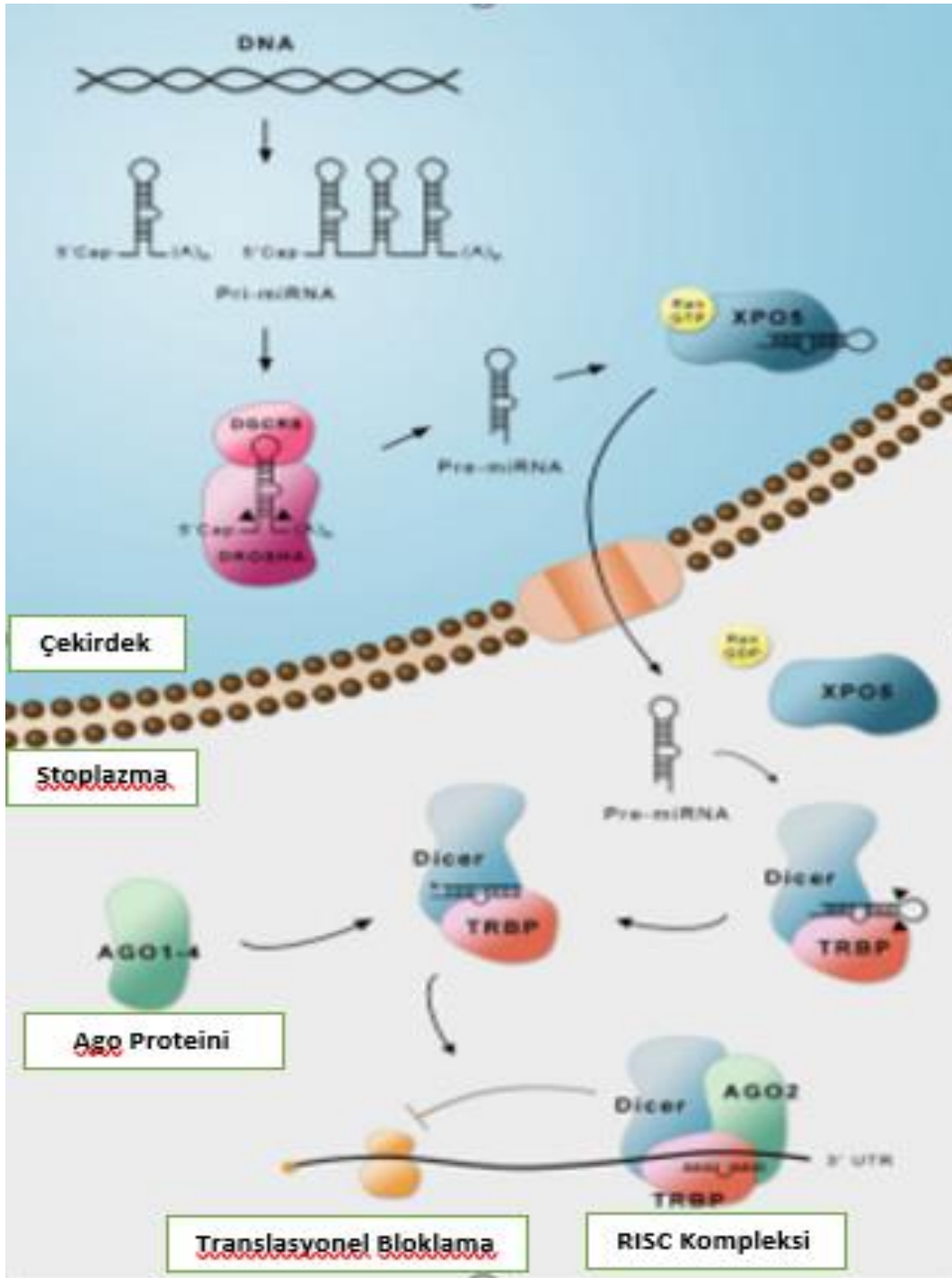
Daha sonra pre-miRNA'lar RanGTP/ XPO5 (exportin 5) kompleksi aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Özel taşıyıcı bir protein olan XPOS'in pre-miRNA'ları tanımak ile görevli olduğu bu mekanizme RAN-GTP bağlı olarak ilerlemektedir. Pre-miRNA'nın da katıldığı taşıma kompleksi taşımanın ardından GTP'nin hidrolizi ile dağılır ve pre-miRNA serbest bir şekilde stoplazmaya salınır [143, 144].

Sitoplazmaya taşınan pre-miRNA, sitoplazmada bulunan bir RNaz III enzimi olan Dicer tarafından TRBP (transaktivasyon-yarut bağlanma proteini) ve PACT (aktivasyon proteini) aracılığı ile yaklaşık 20 nükleotit uzunluğunda bir miRNA/miRNA* dubleksi oluşur [145].

miRNA dubleksleri daha sonra Dicer-TRBP kompleksi yardımıyla RISC (RNA kaynaklı susturma kompleksi) oluşumu amacıyla Ago (Argonaute) protein alt

ailesinin bir üyesi haline gelir. miRNA dubleksleri RNA helikazları tarafından iki tekli zincire ayrılır ya da bölünür. İpliklerden biri kılavuz iplik (miRNA olgun iplik) olarak adlandırılır ve miRNA aracılı RNA baskılanmasında işlev görür. Diğer iplik ise tamamlayıcı ya da yolcu iplik adını alır. Kılavuz iplik RISC kompleksine bağlı olarak kalır yolcu iplik ise degrade olur [143, 146, 147].

Ago proteinine bağlı olgun miRNA daha sonra miRISC olarak bilinen bir efektör kompleksi içine monte edilir. MiRNA'nın da dahil olduğu RISC kompleksi hedef mRNA'ya yönelir. Olgun miRNA daha sonra tohum dizisi (miRNA 5' ucundan 2 ile 8 nükleotit) ile hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3'-UTR ucuna bağlanır. Bu bağlanma kısmi ya da tam komplementerlik (mükemmel eşleşme) göstererek gerçekleşebilir. Mükemmel eşleşmenin gerçekleşmesi durumunda RISC hedef mRNA'yı degrade eder, kısmi bir eşleşme gerçekleşirse hedef mRNA translasyonel olarak baskılanmış olur. Translasyon baskılanması ya da inhibisyonuna neden olan kısmi eşleşme daha yoğun görülen bir durumdur (Şekil 2.9) [145, 147, 148].



Şekil 2.9 miRNA biyogenez yolağı

2.3.2 MiRNA'ların Düzenleyici Rolü ve Kanser ile İlişkisi

Kısa miRNA-mRNA bağlanma bölgeleri nedeniyle tek bir miRNA birden çok hedeflenmiş mRNA'ya bağlanabilir ve çoklu yollar ile fonksiyonlarını düzenleyebilir. Tek bir mRNA'da aynı anda birkaç farklı miRNA tarafından

hedeflenebilir ve bağlanma gerçekleştirebilir [148, 149]. Protein kodlayan genlerin yaklaşık 1/3'ünün miRNA'lar tarafından regüle edilebileceği tahmin edilmektedir. Bu nedenle, miRNA'ların hedef genlerinin belirlenmesi çalışmaları büyük önem taşımaktadır [150, 151].

miRNA'lar hücre gelişmesi ve farklılaşması [152] hücre çoğalması ve apoptoz [153] gibi pek çok hücrel ve sinyalleşme yolağını düzenleyebilir [154, 155, 156].

Tek bir miRNA veya küçük bir miRNA alt grubunun düzensizliği hücrel hastalık durumlarının gelişmesine neden olabilir. Kanser de miRNA düzensizliğinin neden olduğu başlıca hastalıklardan biridir [155].

miRNA'ların rolü akciğer kanseri [156], meme kanseri [15], papiller tiroid kanseri [157], mide kanseri [158] ve kolon kanseri [159] gibi pek çok kanser türünde ispatlanmıştır.

miRNA'lar kanser metabolizmasında tümörün başlangıcı, metastazı ve farklılaşmasında rol alabilir. Bu özellikleri miRNA'ların kanserin hem teşhisi hem de tedavisi alanında uygulanmasına olanak sağlar [160].

Kanser ile ilgili miRNA'lar iki gruba ayrılır: Tümör baskılayıcı miRNA'lar ve onkogenik miRNA'lar. Kanser hücrelerinde ekspresyon seviyesi azalan miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar; ekspresyon seviyesi artan miRNA'lar onkogenik miRNA'lardır [19, 161].

Tümör baskılayıcı miRNA'lar genellikle onkogenik mRNA'ların translasyonunu baskılayan mRNA'ları hedefleyerek tümör ilerlemesini inhibe edebilir; Onkogenik miRNA'lar tümör baskılayıcı genlerin metastazı ve susturulması ile kanserin başlangıcı ve ilerlemesinde etkilidir [34].

2.3.2.1 MiRNA'ların Meme Kanseri ve Tedavisindeki Rolü

İnsan miRNA kod genlerinin yaklaşık %50'si kanser ile ilişkili bölgelerde ya da kırılmalı kromozomlarda bulunur [150]. miRNA düzensizliğinin meme kanserindeki rolü ilk kez 2005 yılında [15] bulunmuş ve o günden beri pek çok çalışma miRNA ekspresyon düzeylerinin meme kanseri ile değiştiğini göstermiştir [19, 162].

Meme kanseri ile ilişkili miRNA'lar da onkogenik miRNA'lar ve tümör baskılayıcı miRNA'lar olmak üzere iki gruba ayrılır. Onkogenik miRNA'lar genellikle meme

kanserinde up-regüle olur ve potansiyel tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu bastırır ve meme malignitesine yol açar [19]. Bunun tersine tümör baskılayıcı miRNA'lar meme tümörü oluşumunu destekleyen onkogenlerin ekspresyonunu inhibe eder. Bu nedenle tümör baskılayıcı miRNA'ların down-regüle olması meme malignitesine yol açabilir [34].

Meme kanseri tedavisinde kullanılan başlıca yöntemler cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi, endokrin (hormon) tedavisi ve hedefe yönelik tedavidir [24]. Göğüs koruma ameliyatı, lokalize meme kanseri tedavisinde yaygın bir yaklaşımdır. Ameliyat öncesinde tümör kitlesini küçültmek için neoadjuvan tedavi uygulanır. Cerrahiyi genellikle tam iyileşmeyi sağlamak ve metastaz riskini azaltmak için adjuvan tedavi izler. Ameliyat sırasında görülmeyen kanser hücreleri, lokal kanserin tekrarlama riskini azaltmak için radyasyonla öldürülebilir. Ameliyat sonrası radyoterapi, tümörü kemoterapi ile birlikte küçültür [163, 164].

2.4 MiRNA'ların Biyobelirteç Rolü

Kanser tedavileri her ne kadar tümörün tipi, lokasyonu ve evresine bağlı olarak hastadan hastaya farklılık gösterse de hastalarının büyük bir bölümü tedavi sürecinde radyoterapi almaktadır [165]. Günümüzde radyasyon tedavisi üzerine yapılan çalışmalar ile hedeflenen;

- Tümöre uygun ve etkili radyasyon dozunun uygulanması ile tedavinin daha başarılı bir şekilde uygulanmasını sağlamak,
- Normal (sağlıklı) dokunun daha az zarar görmesini sağlamak,
- Hastaların hayatta kalma sürelerini uzatmak,
- Hastaların yaşam kalitesini arttırmaktır [166, 167].

Biyolojik moleküllerin radyasyon ile etkileşimi uzun yıllar radyasyon tedavisine klinik yanıtların öngörülmesi konusunda bir sorun teşkil etmiştir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar farklı kanser türlerinde tutarlı radyasyon tepki modellerini belirlemeye başlamıştır [167]. Radyasyon yanıtlarının koordineli modellerini tanımlayabilmek için radyasyonun;

- Hücresel bileşenlerin moleküler fonksiyonu üzerindeki etkilerinin,
- Hücre canlılığı üzerine etkilerinin,

- Nükleik asitlerden proteinlere kadar tüm küçük molekül metabolitler üzerine etkilerinin geniş bir spektrumda ölçülmesi gerekmektedir [24].

Hücreler arası iletişim de tümörün gelişimi, radyasyon tedavilerinin tasarımı ve radyasyona dirençli tümörlerin tedavisi için kritik öneme sahiptir. Radyasyonun hedeflenen doku/organlarda oluşturduğu etkilere odaklanan çalışmalar ısıtılmış hücrelerde, komşu hücrelere yan etkilerin kısa ve uzun menzilli transferini göstermektedir [168, 169].

Radyasyona karşı oluşan hücresel yanıtlar DNA ile etkileşime dayanır. Radyasyon tedavisinde terapötik etkinin artırılmasında normal dokular ve tümörlü dokular arasındaki DNA hasar ve DNA hasar yanıt yollarında oluşan farklılıkların incelenmesi önem arz etmektedir [170, 171].

Günümüzde radyasyon tedavisinin genel terapötik sonucunu tahmin etmek hala zordur ve çoğu zaman radyasyon, direnç gösteren tümör hücreleri tarafından zayıflatılarak, sınırlı tedavi seçeneklerinin mevcut olduğu tekrarlayan tümörlere yol açar [172, 173].

miRNA'ların radyasyon yanıtlarında hücresel metabolik olayları regüle etmek suretiyle görev alıyor olması radyasyona dirençli tümörlerin tedavisinde potansiyel değerlerine işaret etmektedir [174, 175].

Biyobelirteçler, normal biyolojik süreçlerin, patogenezin veya tedaviye yanıtın göstergeleri olarak değerlendirilebilen ve ölçülebilen özellikler olarak tanımlanmaktadır. Kanser biyobelirteçleri diyagnostik, prognostik veya prediktif amaçlı kullanılabileceği gibi tedavi yanıtlarını izlemede de kullanılabilir [176, 177, 178].

Prognostik biyobelirteçler tedaviden bağımsız olarak hastanın genel kanser sonucu ile ilgili bilgi sağlar. Daha agresif tedavilerden faydalanabilecek yüksek riskli hastaları belirleyebilirler ancak hangi hastaların spesifik bir tedaviden klinik yarar sağlayacağı konusunda bir bilgi vermezler. Prediktif biyobelirteçler ise tam aksine bir hastanın spesifik bir tedaviden yarar elde etme olasılığını gösterebilir [179].

Tümör biyolojisine ve hastanın bireysel risklerine odaklanılarak kişiye özgü olarak tasarlanan radyoterapi uygulamaları hastaların iyileştirilmesinde daha etkili olacaktır [180]. Tümörün radyasyona yanıtını etkileyen pek çok faktör olduğu bilinmektedir. Radyoterapinin daha etkin sonuçlar verebilmesi için tedavi

öncesinde ve tedavi esnasında kullanılabilecek klinik olarak doğrulanmış biyobelirteçlerin tanımlanması gerekmektedir. Biyobelirteçler tedavi öncesinde radyoterapi yanıtlarının öngörülmesi; tedavi esnasında ise tümörün radyoterapiye yanıtının değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir [181]. Günümüzde klinikte rutin uygulamalarda kullanılmak üzere yeterince doğrulanmış radyosensitivite biyobelirteçleri bulunmamaktadır [182].

DNA hasar onarımı, hücre döngüsü, apoptoz ve radyasyon ile ilgili sinyal yollarında düzenleyici olarak görev yapan miRNA'lar hem kanser oluşum mekanizmasında hem de kanser hücrelerinin radyasyon yanıtlarında kritik rol oynamaktadır [154, 155, 156]. Dokuya spesifik ve sert çevresel koşullarda kararlı moleküller olan miRNA'ların ekspresyon seviyeleri genellikle hastalık ve organ hasarının bir sonucu olarak değişmektedir. miRNA'ların temel moleküler tekniklerle kolaylıkla ölçülebilir olmaları, bu moleküllerin klinik tanı ve prognozda biyolojik belirteç olarak kullanılma potansiyelini önemli ölçüde artırmaktadır [183].

Ayrıca, miRNA'ların kan ve idrar gibi biyolojik sıvılarda bulunmaları ve şiddetli fiziksel koşullarda dahi kararlılıklarını korumaları, onları protein ve mRNA seviyesinde halihazırda incelenmiş ve kısmen kabul görmüş biyobelirteçlere tamamlayıcı bir yaklaşım sunma konusunda ön plana çıkarmaktadır. Bu özellikler, miRNA'ların noninvazif yöntemlerle radyasyona maruz kalmış bireylerde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir [175]. miRNA'lar ile yapılan çalışmaların olumlu ilerlemesi durumunda birincil tümörü tedavi etmek ve metastaz olasılığını azaltmaya yönelik potansiyel tedavilere katkı sağlayacağı düşünülmektedir [184].

Her kanser tümör baskılayıcı genleri hedef alan yukarı regüle edilmiş oncomiRNA'lar ya da onkogenleri hedef alan aşağı regüle edilmiş tümör baskılayıcı miRNA'lar olmak üzere bir miRNA kombinasyona sahiptir [185]. Kanser türüne özgü bu miRNA ekspresyon profili belirli tümör türleri ile bunların alt türlerini potansiyel olarak tanımlayabilecek bir parmak izi oluşturmak amacıyla kullanılabileceği önerilmektedir [184].

Literatürde miRNA'ların biyobelirteç rollerini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, yapılan çalışmalar ile miR-105'in ekspresyon seviyesinin

hayatta kalma oranı düşük, üçlü negatif meme kanseri hastalarında oldukça yüksek olduğu ve hem tedaviye direnci hem de metastazı arttırdığı ve üçlü negatif meme kanserinde onkogenik özellik sergilediği belirlenmiş ve güçlü bir biyobelirteç potansiyeli taşıdığı ortaya konmuştur [186].

Azalan ekspresyon seviyesi ile meme kanserinde tümör baskılayıcı özellik gösteren miR-675-5p'de meme kanserinin erken tanısı ve tedavisi için biyomerker olarak önerilmiştir [187].

miRNA'ların kanser metabolizmasındaki iyonlaştırıcı radyasyon ile olan ilişkisi potansiyel biyobelirteç olabilmesine yönelik çalışmaların artırılması gerektiğini göstermektedir. Gen regülasyonunda görevli miRNA'ların kanser tedavisinde kişiselleştirilmiş terapötiklerin tasarlanması için çok büyük önem taşıdığı ve miRNA bazlı kanser tedavilerine yönelik araştırmaların artırılması gerektiği vurgulanmaktadır [183, 188].

3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Hücre Kültürü

Bu çalışmada, farklı özelliklere sahip iki ayrı hücre hattı olan MCF7 ve MDA-MB-231 kullanılmıştır. MCF7 hücreleri, meme epiteline özgü bir dizi özelliği nedeniyle in vitro araştırmalarda sıklıkla kullanıldıkları göz önünde bulundurularak seçilmiştir [189]. Meme kanserinin üçlü negatif bir alt türü olan MDA-MB-231 hücre hattı ise agresif davranışı ile MCF7'den farklı özellikler taşıması nedeniyle seçilmiştir [190].

MCF7 hücreleri Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü bünyesinde yer alan Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR yürütücülüğündeki Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'ndan, MDA-MB-231 hücreleri, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü ve Biyoloji Bölümü'nün bir parçası olan İleri Kök Hücre ve Biyomoleküler Teknoloji Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

Hücre kültürü prosesinde kullanılan kimyasallar aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

FBS (Fetal Sığır Serum) hazırlanması: Deneysel prosedürlere uygun olarak hazırlanmıştır. Öncelikle 56°C'de 1 saat süreyle ısı ile inaktive edilmiştir. Daha sonra, önceden filtrelenmiş serum kullanılmıştır; serum filtrelenmemişse 0,22 µm gözenek çapına sahip filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir, ardından küçük hacimlere bölünmüş ve -20°C'de saklanmıştır.

PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat Tamponlu Tuzlu Su) hazırlanması: 1 adet PBS tablet, 4 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ bileşenleri kullanılarak hazırlanmıştır. pH 7.4'e ayarlanır. Sterilize etmek için 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavlanır. Steril PBS çözeltisi 4°C'de saklanmıştır.

Bir diğer seçenek olarak 1 adet PBS tablet (Sigma) 100 mL su eklenerek çözülür ve ardından steril PBS kullanım için +4°C'de saklanır.

EDTA (Tripsin-Etilen diamin tetra asetik asit) tamponu hazırlanması: Önceden hazırlanan PBS solüsyonuna %0,05 Tripsin ve 0,5 mM EDTA eklenmiştir. Daha sonra otoklavlanmış ve -20°C'de saklanmıştır.

3.1.2 İyonlaştırıcı Radyasyon Uygulaması

Işınlama uygulaması, Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Radyasyon Onkolojisi bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Işınlama planlaması için Monoco tedavi planlama sisteminin 5.1 sürümü kullanılmıştır. Işınlama uygulaması Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Radyasyon Onkolojisi bünyesinde bulunan LINAC (Elekta Versa HD) (Stockholm, İsveç) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.3 Hücre Canlılık Tayini

MTT ((4,5-Dimetiltiazol-2-Yl) -2,5-Difeniltetrazolium Bromür) Hazırlanması: Hücrelerin canlılık tayini için kullanılan MTT, ticari olarak liyofilize formda satın alınmıştır. 0,25 g tartılmış ve 50 mL steril PBS'de çözülmüştür. MTT etiketleme reaktifi 0,25 mg / 50 mL'lik son konsantrasyonda hazırlanmış ve ışık olmadan +4°C'de saklanmıştır.

DMSO (Dimetil sülfoksit): Organik çözücü

3.1.4 Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit (Qiagen miRNeasy Mini Kit) kullanılarak yapılmıştır.

3.1.5 Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizi

Çalışmada incelenen miRNA'ların ifadelerini analiz etmek için, miRNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılmış ve total RNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Seçili miRNA'ların, U6 (GeneGlobe ID: ENSG00000206625), miR-208a (GeneGlobe ID: YP00205398), miR124 (GeneGlobe ID: YP00206026), miR-145 (GeneGlobe ID: YP00204483) ifade analizi, Rotor-Gene Q 5plex HRM

(Qiagen) kullanılarak miRCURY LNA miRNA PCR Testi (Qiagen) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.6 Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihaz Adı	Kullanım Amacı
Hassas Terazı	Besiyerlerinin tartılması ve moleküler kantitatif analiz aşamasında kullanılmıştır.
-20 °C Buzdolabı- Beko	Kimyasalların saklanması kullanılmıştır. Total RNA'nın saklanması aşamasında kullanılmıştır.
-80°C Buzdolabı- Heto	cDNA'ların saklanması aşamasında kullanılmıştır.
Vorteks- Heidolph	Moleküler kantitatif analiz basamağında kullanılmıştır.
Mikropipet	Moleküler kantitatif analizlerde kullanılmıştır.
Etüv- Binder	Hücre kültürü aşamasında kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

Bu tez çalışması kapsamında Şekil 3.1’de verilen akış şeması izlenmiştir.



Şekil 3.1 İş akış şeması

3.2.1 In Vitro Çalışmalar

3.2.1.1 Hücre Kültürü Prosedürü

Hücre kültürü prosedürü Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü bünyesinde yer alan Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR yürütücülüğündeki Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir. Çözülen hücrelerin kültürü, 25 cm²’lik polistiren yüzeyli şişelerde (NEST) ve uygun büyüme ortamı kullanılarak sürdürülmüştür.

MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin kültürü, %10 fetal sığır serumu (FBS) ile desteklenmiş Dulbecco’nun Modifiye Eagle Ortamı (DMEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü, deney boyunca aşağıdaki koşullar altında sürdürülmüştür: 37°C, %95 nem ve %5 CO₂. MCF7 ve MDA-MB-231 hücreleri, %80-90 konfluansta enzimatik olarak ayrılmıştır. Daha sonra 1000 rpm ve 25 °C’de beş dakika santrifüj edilmiştir. Hemositometre destekli hücre sayımının ardından, 96 kuyulu plakalara kuyu başına 1x10⁴ hücre aşılanmıştır. Plakalar, 37°C, %95 nem ve %5 CO₂’de bir kez daha inkübe edilmiştir. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir [191].

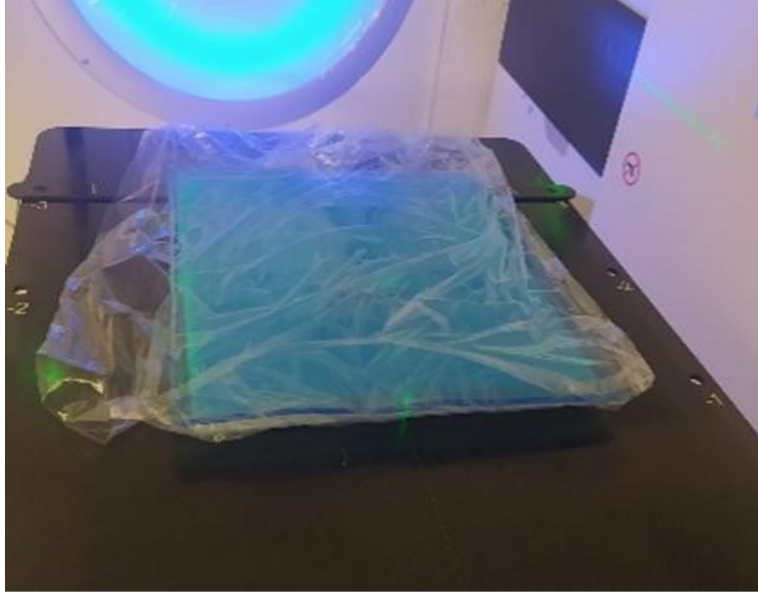
3.2.1.2 İyonlaştırıcı Radyasyon Uygulaması

Tedavi planlamasının ardından ışınlama koordinatları belirlenmiş ve tüm ışınlamalar bu planlamaya uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Işınlama esnasında 0,5 cm kalınlığında bolus kullanılmıştır. 96 kuyulu plakalara ekilmiş olan hücrelere 6MV foton değerine sahip X-ışını uygulanmıştır. Uygulama esnasında radyasyon dozu 4 Gray (Gy)/1 fraksiyon ve 8 Gy/1 fraksiyon olarak ayarlanmıştır (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3).

Işınlanan hücrelerin canlılık izleme süreleri 48 saat, 96 saat ve 7 gün olarak belirlenmiş olduğundan her zaman dilimi için her iki hücre hattı (MCF7 ve MDA-MB-231) ve her iki radyasyon dozu (4 Gy ve 8 Gy) için ayrı ayrı ışınlama uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.4). Ayrıca her zaman dilimi ve hücre hattı için kontrol örnekleri de hazırlanmıştır.



Şekil 3.2 Işınlanmak üzere well-plate içerisinde hazırlanan hücreler



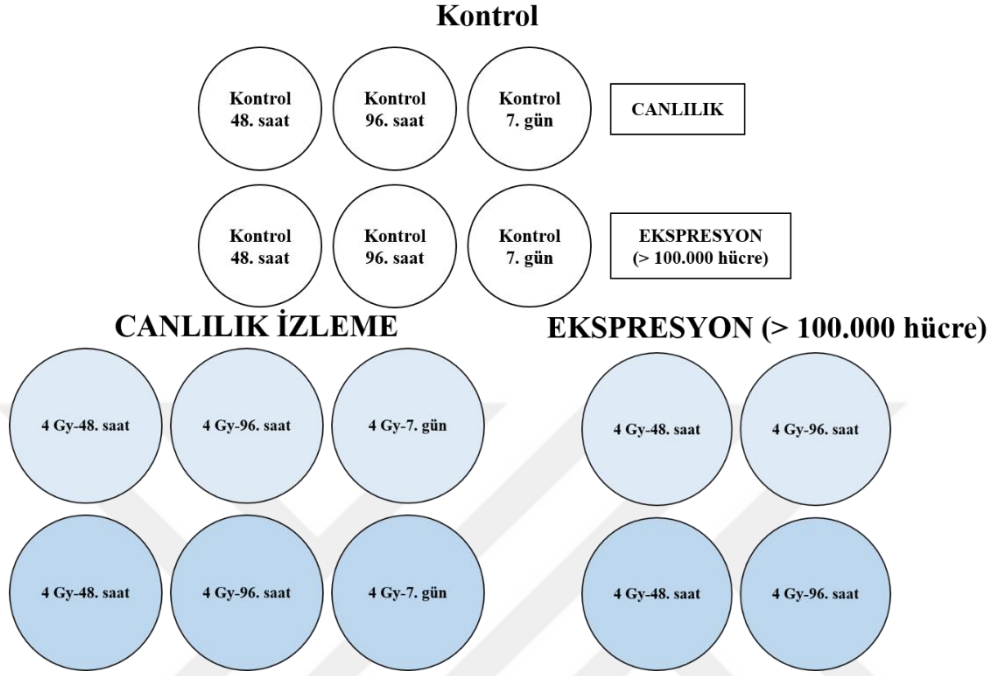
Şekil 3.3 Hücrelerin ışınlanması



Şekil 3.4 LINAC cihazı

Işınlama deney planı Şekil 3.5'te verilmektedir.

Kullanılan hücre hatları: MCF-7 ve MDA-MB-231	Canlılık izleme süreleri: 48. saat, 96. saat, 7. gün
Uygulanacak Doz: 4 Gy/1 fraksiyon ve 8 Gy/1 fraksiyon	Hücre ekim sayısı: 10.000/kuyu
Bolus kalınlığı: 0,5 cm	



Şekil 3.5 Işınlama deney planı

3.2.1.3 Hücre Canlılığı Tayini

Işınlamadan sonra, hem ışınlanmış hem de ışınlanmamış hücreler, fosfat tamponlu salin (PBS) içinde hazırlanan 10 µl MTT çözeltisi (10 mg/ml) ile muamele edilmiştir. Daha sonra plakalar, 37 °C'de inkübasyon için CO₂ inkübatörüne yerleştirilmiştir. 4 saatlik inkübasyonun ardından, canlı hücrelerde üretilen formazan kristalleri DMSO işlemiyle çözülmüştür. Mikro plakaların her bir kuyusu 100 µl DMSO çözeltisine maruz bırakılmış ve plakalar karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika tutulmuştur. Daha sonra, her bir kuyunun absorbansı bir mikro plaka okuyucusu (Mutiskan EX, Thermo Lab sistemleri) kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür. Canlılık kontrol (ışınlanmamış hücreler hücreler) %100 olarak kabul edilmiştir. Radyoterapi ile tedavi edilen meme kanseri hücrelerinin hücresel canlılık oranları, absorbans ölçümlerinin sonuçlarına göre kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır [192].

Hücre canlılık tayini ışınlamanın 48. saat, 96. saat ve 7. gün sonunda yapılmıştır.

3.2.1.4 Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu esnasında lizis, RNA bağlama, yıkama ve elüsyon prosedürleri, toplam RNA'yı izole etmek için RNeasy Mini Kit (Qiagen miRNeasy Mini Kit) kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Toplanan total RNA'nın miktarı ve kalitesi, ultraviyole-görünür (UV-VIS) spektrofotometre (Thermo scientific) ile ölçülmüştür. RNA özütleri -80 °C'de tutulmuştur.

3.2.1.5 MiRNA Seçimi ve Kantitatif PCR seçimi

İyonlaştırıcı radyasyonun çeşitli kanser türlerinde neden olduğu değişikliklerle bağlantılı olan biyolojik yollarla ilişkili miRNA'lar, DisGeNET [193], NCBI [194], miRPathDB [195], miRWalk [196] ve miRbase [197] dahil olmak üzere halka açık veritabanlarından seçilmiştir. Çalışmamızda analiz için seçilen miRNA'lardan biri olan miR-208a'nın IR'ye duyarlılığı sayesinde akciğer kanserinde terapötik biyobelirteç potansiyeli gösterdiği ortaya konmuştur [198]. Literatürde miR-145 [41] ve miR-124 [199] miRNA'larının meme kanserinde tümör gelişimi üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğunu doğrulayan çalışmalar yer almaktadır. IR'ye maruz kalan meme kanseri hücrelerinde bu üç miRNA'nın seviyelerindeki değişikliklerin incelenmesinin bu alandaki çalışmaları daha da ileri götüreceği değerlendirilmiştir. miRNA'ların ifadelerini analiz etmek için, miRNeasy Mini Kit (Qiagen) ile toplam RNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir.

MiR-208a, miR-124 ve miR-145 ifade analizi miRCURY LNA miRNA PCR Testi (Qiagen) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.6 İstatistiksel Analiz

qPCR verilerinin istatistiksel analizleri, farklı dozlar için etki değerlerini göstermek üzere iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gerçekleştirilmiştir. Farklı gruplar arasındaki gen ifade seviyelerini karşılaştırmak için çoklu t-testleri kullanılmış, çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış ve istatistiksel anlamlılık $p < 0$ olarak belirlenmiştir.

3.2.2 Biyoinformatik Çalışmalar

3.2.2.1 Mikro Dizi Veri Seçimi

İyonlaştırıcı radyasyon ile tedavi edilen insan meme kanseri örneklerinden gen ifadesi profillerinin genel veri kümeleri, GEO (Gen İfade Omnibus) veritabanı kullanılarak analiz edilmiştir [190]. Biyoinformatik çalışmalar kapsamında incelenen veri setleri GSE40640 [200], GSE59733 ve GSE108895 [201] dir. GSE40640 veri seti, meme veya baş ve boyun kanseri olan 24 hastanın lenfositlerinden türetilmiş ve Illumina humanRef-8 v2.0 ifade boncuk çip platformu kullanılarak analiz edilmiştir. Veri setinden yalnızca meme kanseri örnekleri seçilmiş ve (IR) iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalıp kalmama durumlarına göre kontrol ve tedavi başlıkları ile gruplandırılmıştır. Çalışmada cinsiyet, yaş, klinik radyo duyarlılık ve kemoterapi alıp almama durumları ihmal edilmiştir. GSE59733 veri seti, 10 meme kanseri hastasının tümör örneklerinden türetilmiş ve Affymetrix Human Almac Xcel Dizisi kullanılarak analiz edilmiştir. GSE108895 veri seti, IR ile tedavi edilen veya p21 genini ektopik olarak ifade eden MCF7 hücre hatlarından türetilmiş ve Illumina HumanHT-12 V4.0 ifade boncuk çipi kullanılarak analiz edilmiştir. Biyoinformatik çalışmalar için seçilen örnekler yalnızca kontrol örnekleri ve IR ile tedavi edilen meme kanseri örnekleri olarak seçilmiştir.

3.2.2.2 Farklı Düzeyde İfade Edilen Genler (DEG)'in Tespiti

DEG'ler, GEO'da bulunan GEO2R aracıyla doğrulanmıştır. Benjamini & Hochberg yöntemi (Yanlış Keşif Oranı), zorunlu normalizasyon kullanılmadan düzeltilmiş P değerini hesaplamak için kullanılmıştır. Tarama eşikleri $P < 0,05$ ve $|\log FC| > 1$ olarak seçilmiştir. Ortak genleri bulmak için çeşitli veri setlerinden DEG'ler analiz edilmiş ve Bioinformatics & Evolutionary Genomics Venn aracı (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn.>) kullanılarak bir Venn diyagramı oluşturulmuştur.

3.2.2.3 Gen Ontoloji Analizi

GO (gen ontolojisi) analizi için DEG'ler, ağ tabanlı bir genomik sınıflandırma sistemi olan PANTHER veri tabanı kullanılarak analiz edilmiştir [202]. Bu çalışmada DEG'ler moleküler işlevlerine ve biyolojik süreçlerine göre sınıflandırılmıştır.

3.2.2.4 Protein-Protein Etkileşim (PPI) Analizi

Biyoinformatik çalışmalar sonucunda PPI ağı, STRING veritabanı kullanılarak oluşturulmuştur [203]. PPI ağı, hem işlevsel hem de fiziksel protein ilişkilerini gösterme amacıyla 50 gene kadar DEG kullanılarak oluşturulmuştur. Metin madenciliği, deneyler, veritabanları, birlikte ifade, komşuluk, gen füzyonu ve birlikte bulunma, aktif etkileşim kaynakları olarak seçilmiş ve 0,4 etkileşim puanının altındaki ilişkiler önemsiz olarak kabul edilmiştir [203]. En büyük mutlak log katlama değişim değerlerine sahip ilk 20 DEG kullanılarak eksiksiz bir STRING ağı oluşturulmuştur.



4 BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 In Vitro Çalışmalar

Kadınlarda teşhis edilen en yaygın kanser türü olan meme kanseri [42] tedavisinde kullanılan en yaygın yöntemler; cerrahi, radyoterapi, hormonal tedavi, immünoterapi ve kemoterapi tedavisidir [204]. Radyoterapi, tüm kanser hastalarının %50'sinden fazlasında kullanılan bir yöntemdir. Kanser hücrelerinin radyasyona karşı normal hücrelere göre daha hassas bir davranış sergileyip radyasyona karşı daha belirgin tepki verirken normal hücreler direnç göstermektedir. Bu durum radyasyonun kanser hücrelerinde terapötik olarak kullanılabilmesini açıklamaktadır [205].

İnsan vücudunda genomun protein kodlayan genlerinin %30'unu düzenleyen yaklaşık 2000 miRNA bulunmaktadır [206]. miRNA'ların kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişiminde önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir [50, 153].

miRNA'ların farklı koşullar altında stabil kalması ve aynı türe ait bireylerde tekrarlanabilir sonuçlar sunması, onları biyobelirteç olarak kullanılmak üzere tercih edilen adaylar haline getirmektedir. Literatürdeki araştırmalar, dolaşımdaki miRNA'ların, türler arası farklılıktan bağımsız olarak, genellikle IR etkisi altında doza bağlı bir şekilde değişiklik sergilediğini ve IR maruziyetinin etkilerini değerlendirmek için güçlü biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermektedir [207, 208]. IR etkisi ile ifade seviyelerinde değişiklik gösteren miRNA'lar, gen ekspresyonunu düzenleyerek organizmanın radyasyon tedavisine verdiği yanıtı belirlemede kritik bir rol oynamaktadır [209].

miRNA'lar, radyasyonla ilgili biyolojik süreçlere katılarak hücrelerin radyasyon duyarlılığını modüle etme potansiyeline sahiptir [210]. miRNA'ların meme kanserinde klinik uygulamalar için büyük bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir, ancak meme kanseri biyobelirteçlerinin ve moleküler hedeflerin klinik kullanımına ilişkin çalışmalar halen sınırlıdır [211]. Farklı tümörlerdeki miRNA ifadelerinin moleküler yollar ile ilişkilendirilmesinin radyasyon biyolojisine yönelik araştırmaların derinleştirilmesine katkı sunabilir. Bu bağlamda, iyonlaştırıcı radyasyonun biyolojik etki mekanizmalarında rol oynayan miRNA'ların tanımlanması terapötik iyonlaştırıcı radyasyon yaklaşımları açısından kritik bir öneme sahiptir [212].

Bu tez çalışması ile kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü olan meme kanserinde terapötik iyonlaştırıcı radyasyonun moleküler etkilerinin miRNA ifade düzeyinde incelenmesi amaçlanmaktadır. Çalışmada MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları, 4 ve 8 Gy dozlarında iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılmıştır. Radyasyonun etkilerini gözlemlemek amacıyla hücre canlılığı 7 gün boyunca izlenmiştir. Hücresel moleküler mekanizmaların en belirgin hale geldiği 48 ve 96. saatlerde RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İyonlaştırıcı radyasyonun meme kanseri üzerine etkilerini incelemek amacıyla literatür kaynakları ve açık erişimli veri tabanları kullanılarak belirlenen miRNA'ların (miR-208a, miR-124 ve miR-145) kantitatif ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Analiz edilen miRNA'ların iyonlaştırıcı radyasyona yanıt mekanizmalarında oynadıkları rol, gen ekspresyonu üzerine düzenleyici etkileri tartışılmıştır. Çalışmamız iyonlaştırıcı radyasyonun meme kanseri üzerindeki moleküler etkilerini aydınlatmaya ve potansiyel terapötik hedeflerini belirlemeye yönelik çalışmalara katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

4.1.1 Hücre Kültürü

Çalışmamızda iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılmak üzere kullanılacak hücre hatlarının seçimi, meme kanseri alt türlerinin biyolojik özelliklerini temsil etmeleri göz önünde gerçekleştirilmiştir. ER-pozitif özellik gösteren MCF7 hücre hattı, en sık teşhis edilen meme kanseri alt sınıfını temsil etmesi ve bu özelliği ile klinik araştırmalarda önem taşıyor olması nedeniyle tercih edilmiştir. MCF7 hücrelerinin kolay kültürlenebilir bir yapıya sahip olması bu hücreleri deneysel çalışmalar için ideal bir model haline getirmektedir [213]. Buna karşılık üçlü negatif meme kanseri alt sınıfının bir üyesi olan ve agresif bir fenotipe sahip olduğu bilinen MDA-MB-231 hücre hattı, iyonlaştırıcı radyasyona karşı gösterdiği direnç ile radyasyon biyolojisi alanında yapılan çalışmalarda ön plana çıkmaktadır [214, 215]. MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları, birbirinden farklı biyolojik özellikler taşıması ve iyonlaştırıcı radyasyona karşı farklı yanıtlar oluşturması karşılaştırmalı analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır.

4.1.2 Hücre Canlılık Tayini

MCF7 ve MDA-MB-231 hücreleri 4 Gy ve 8 Gy dozlarında iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığı ışınlamadan 48 saat, 96 saat ve 7 gün sonra MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar her iki hücre hattında da iyonlaştırıcı radyasyonun hücre canlılığına doza bağlı olarak etki ettiğini ortaya koymuştur. Işınlanmış hücreler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Veriler, üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuş ve istatistiksel analiz ANOVA yöntemi kullanılarak tamamlanmıştır ($p < 0,05$). Elde edilen bulgular, iyonlaştırıcı radyasyonun hücre proliferasyonu üzerinde doz-bağımlı bir yanıt mekanizması üzerinden inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu desteklemektedir.

MCF7 hücrelerinin iyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti sonrasında 48. Saat, 96. Saat ve 7. günde hücre canlılığı değerleri Tablo 4.1’de verilmektedir.

Tablo 4.1 MCF7 hücre hattı canlılık sonuçları

48. saat		
Hücre Hattı	Ort	% Canlılık
MCF7 (K)	0,726	100,0
MCF7 (4 Gy)	0,608	83,8
MCF7 (8 Gy)	0,579	79,7
96. saat		
Hücre Hattı	Ort	% Canlılık
MCF7 (K)	0,708	97,6
MCF7 (4 Gy)	0,627	86,3
MCF7 (8 Gy)	0,588	81,0
7. gün		
Hücre Hattı	Ort	% Canlılık
MCF7 (K)	0,341	46,9
MCF7 (4 Gy)	0,306	42,1
MCF7 (8 Gy)	0,274	37,7

İyonlaştırıcı radyasyon sonrası MCF7 hücrelerinin canlılığı incelendiğinde, hücre canlılığının doza ve süreye bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. 48 saat sonunda 4 Gy ve 8 Gy radyasyon dozları canlılığı sırasıyla %83,8 ve %79,7 değerine düşürmüştür. 96 saat sonunda hücre canlılığı değerlerinin stabil kaldığı (%86,3 ve % 81,0), 7 gün sonunda ise tüm gruplar için hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlenmiştir.

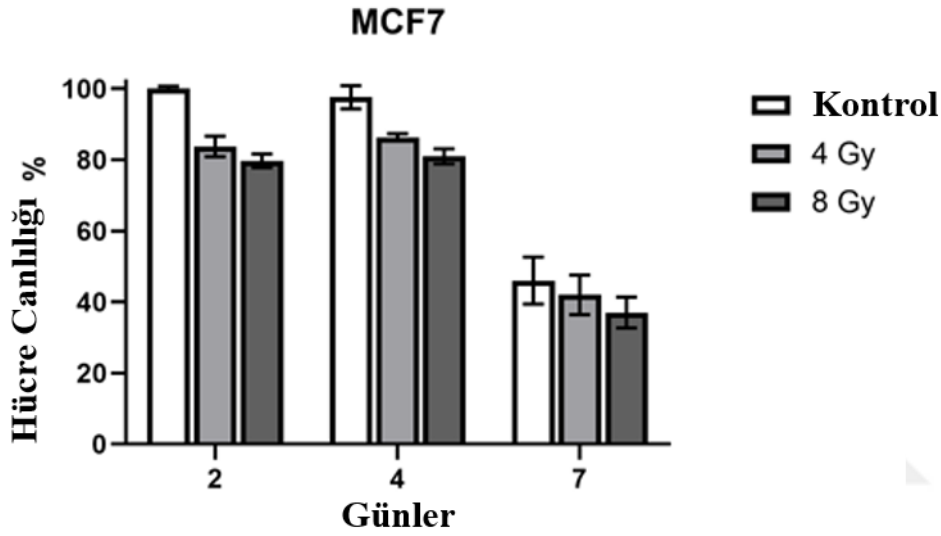
MDA-MB-231 hücrelerinin iyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti sonrasında 48. saat, 96. saat ve 7. gün hücre canlılığı değerleri Tablo 4.2’de verilmektedir.

Tablo 4.2 MDA-MB-231 hücre hattı canlılık sonuçları

48. saat		
Hücre Hattı	Ort	% Canlılık
MDA-MB-231 (K)	0,664 (n=3)	91,5
MDA-MB-231 (4 Gy)	0,635 (n=3)	87,4
MDA-MB-231 (8 Gy)	0,589 (n=3)	81,2
96. saat		
	Ort	% Canlılık
MDA-MB-231 (K)	0,586 (n=3)	80,7
MDA-MB-231 (4 Gy)	0,493 (n=3)	67,9
MDA-MB-231 (8 Gy)	0,454 (n=3)	62,5
7. gün		
	Ort	% Canlılık
MDA-MB-231 (K)	0,280	38,5
MDA-MB-231 (4 Gy)	0,265	36,5
MDA-MB-231 (8 Gy)	0,256	35,2

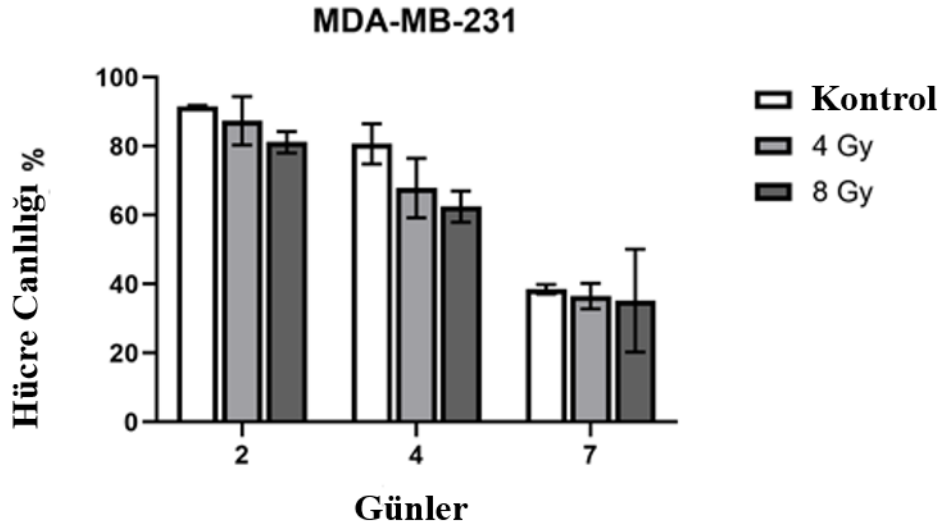
İyonlaştırıcı radyasyonun MDA-MB-231 hücre hattı üzerine etkileri incelendiğinde, hücre canlılığının uygulanan radyasyonu dozu ve süreye bağlı

olarak azaldığı gözlenmiştir. 48 saat inkübasyon sonunda, 4 Gy ve 8 Gy radyasyon dozlarının canlılığı sırasıyla %87,4 ve %81,2 değerlerine düşürdüğü gözlenmiştir. 96 saatlik inkübasyon sonunda, radyasyonun etkilerinin daha belirgin hale geldiği ve hücre canlılığının 8 Gy radyasyon dozunda % 62,5'e kadar düştüğü gözlenmiştir. 7. gün sonunda ise kontrol grupları da dahil olmak üzere tüm gruplarda hücre canlılığında belirgin bir azalma saptanmış ve kontrol, 4 Gy ve 8 Gy için canlılık değerlerinin sırasıyla %38,5, %36,5 ve %35,2 değerine düştüğü saptanmıştır.



Şekil 4.1 4 Gy ve 8 Gy IR'ye maruz kalan MCF hücre canlılığının karşılaştırmalı analizi

MCF7 hücrelerinde 48 saat sonunda hücre canlılığının 4 Gy'de %83,8 ve 8 Gy'de %79,7'ye düşmüş olması DNA hasarı ve reaktif oksijen türlerinin artışı nedeniyle p53 geni aracılı apoptoz mekanizmalarının aktive olduğunu düşündürmektedir. 96. saat sonunda canlılık değerlerinin stabil kalması DNA hasar yanıt mekanizmalarının devreye girdiğini gösterse de 8 Gy'de kalıcı bir hasar gözlenmiş olması artan radyasyon dozunun canlılık üzerinde daha belirgin bir etki oluşturduğunu göstermektedir. 7. gün sonunda canlılığın tüm gruplarda belirgin şekilde azalmış olması oksidatif stressin hücresel yaşlanmayı hızlandırıcı rolünü desteklemektedir. Elde edilen bulgular iyonlaştırıcı radyasyonun hücre canlılığını inhibe edici etkisini literatür ile uyumlu bir şekilde ortaya koymaktadır [216].



Şekil 4.2 4 Gy ve 8 Gy IR'ye maruz kalan MDA-MB-231 hücre canlılığının karşılaştırmalı analizi

MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saat sonunda hücre canlılığının 4 Gy'de %87,4 ve 8 Gy'de %81,2 değerine düştüğü gözlenmiştir. MCF7 hücrelerine göre daha yüksek bir düşüş gözlenmiş olması üçlü negatif fenotipe sahip MDA-MB-231'in invaziv karakteri ve radyasyona duyarlı olması özellikleri ile uyumlu bulunmuştur [217]. 96. Saat sonunda radyasyonun etkilerinin daha belirgin olarak gözlenmesi, DNA onarım kapasitesinin aşılmış olması nedeniye hücresel ölüm mekanizmalarının active olduğunu göstermektedir. 7 gün sonunda tüm gruplarda gözlenen belirgin canlılık kaybı iyonlaştırıcı radyasyonun geç etkileri ile ilişkili olabileceği gibi hücresel yaşlanma ya da besin tükenmesi gibi nedenlerle de ilişkilendirilebilir. Ancak literatür verileri yüksek radyasyon dozlarının klonojenik hayatta kalmayı azaltıcı etki gösterdiğini desteklemekte olup çalışmamızda elde edilen bulgularımız bu sonuçlar ile uyum göstermektedir [218].

Çalışmamız iyonlaştırıcı radyasyonun etki ettiği hücredeki hücre canlılığını belirgin bir şekilde etkilediğini göstermektedir. Elde edilen bulgular hem MCF7 hem de MDA-MB-231 hücre hatlarının canlılıklarında radyasyon dozu ile orantılı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiğini ortaya koymaktadır (MCF7: $P < 0.0001$; MDA-MB-231: $P = 0.0031$). 8 Gy radyasyon dozu uygulanan hücrelerde hücre canlılığının 4 Gy uygulanan hücrelere kıyasla daha belirgin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin radyasyona verdikleri yanıtlar MDA-MB-231 hücre hattının iyonlaştırıcı radyasyona daha duyarlı olduğunu ve bilhassa 96 saatlik inkübasyonda hızlı bir öldürme etkisi gösterdiğini ortaya koymaktadır. 96 saat sonundaki değerler mukayese edildiğinde MDA-MB-231 hücrelerinde %40 oranında bir hücresel inhibisyon saptanırken aynı koşullarda MCF7 hücrelerinde bu oranın %20 düzeyinde olduğu görülmüştür. Bunun yanında MCF7 hücrelerinde iyonlaştırıcı radyasyonun antikanser etkilerinin 7. gün inkübasyon sonunda daha belirgin bir şekilde gözlenmiştir. 7 gün inkübasyon sonunda 8 Gy dozunda iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan MCF7 hücrelerinde yaklaşık %65 oranında hücre inhibisyon tespit edilmiş ve bu değer kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark oluşturmuştur (Şekil 4.1).

MDA-MB-231 hücrelerinde ise iyonlaştırıcı radyasyon uygulamasına bağlı inhibe edici etkinin 7 günlük inkübasyon süresi sonunda kontrol grubuyla hemen hemen eşit bir değere ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.2). Bu durum 7 gün süreli inkübasyon esnasında hücre kültürü ortamında besin tükenmesi ve hem ışınlanmış hücreler grubunda hem de kontrol grubunda bulunan hücrelerin bu koşullara karşı gösterdiği duyarlılık ile açıklanabilmektedir [219]. MDA-MB-231 hücrelerinde özellikle 96 saatlik inkübasyondan elde edilen canlılık verileri, iyonlaştırıcı radyasyonun bu hücre hattında daha hızlı ve belirgin bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Aynı uygulamanın tekrarlanması ile meme kanseri üzerinde etkili olabilecek inhibe edici bir aktivite oluşturabileceği tartışılabilir.

4.1.3 Total RNA İzolasyonu

RNA'nın protein ve diğer kontaminantlardan ayrıştırılma düzeyini tayin etmek amacıyla gerçekleştirilen izolasyon işlemi için toplam RNA'nın saflığı, 260 nm'deki absorbans değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Toplam RNA saflığının değerlendirilmesi için optik yoğunluk (OD) 260/280 oranı kullanılmıştır. Elde edilen OD 260/280 oranları, RNA'nın sonraki deney aşamaları için yeterli saflıkta olduğunu göstermiştir. Kontrol grubu hücreleri ve ışınlama uygulamasına tabi tutulan hücrelere ait RNA izolasyon sonuçları Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.3 Işınlama sonrasında 48 saat inkübe edilen MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin total RNA izolasyon sonuçları

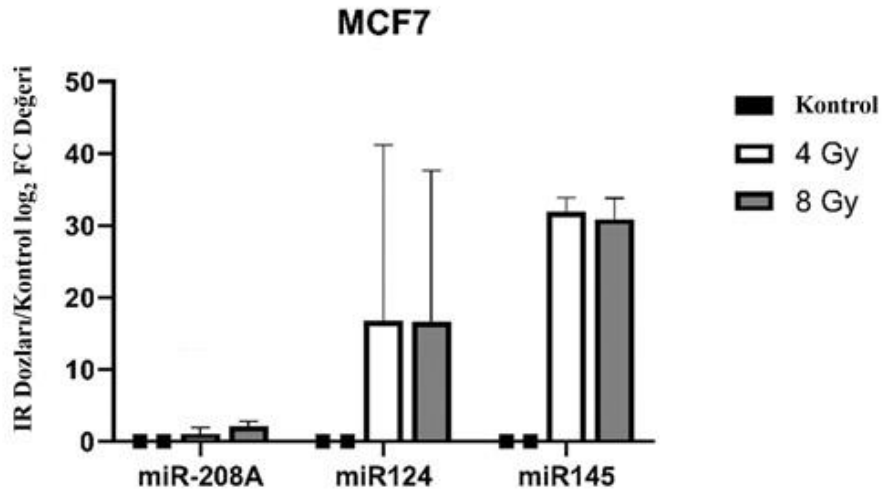
Hücre	Absorbans (260 nm)	ng/mL
MCF7 (Kontrol)	0.022	88
MCF7 (4 Gy)	0.039	156
MCF7 (8 Gy)	0.014	56
MDA-MB-231 (Kontrol)	0.024	96
MDA-MB-231 (4 Gy)	0.021	84
MDA-MB-231 (8 Gy)	0.025	100

Tablo 4.4 Işınlama sonrasında 96 saat inkübe edilen MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin total RNA izolasyon sonuçları

Hücre	Absorbans (260 nm)	ng/mL
MCF7 (Kontrol)	0.076	304
MCF7 (4 Gy)	0.045	180
MCF7 (8 Gy)	0.058	232
MDA-MB-231 (Kontrol)	0.045	180
MDA-MB-231 (4 Gy)	0.040	160
MDA-MB-231 (8 Gy)	0.046	184

4.1.4 Kantitatif PCR Analizi

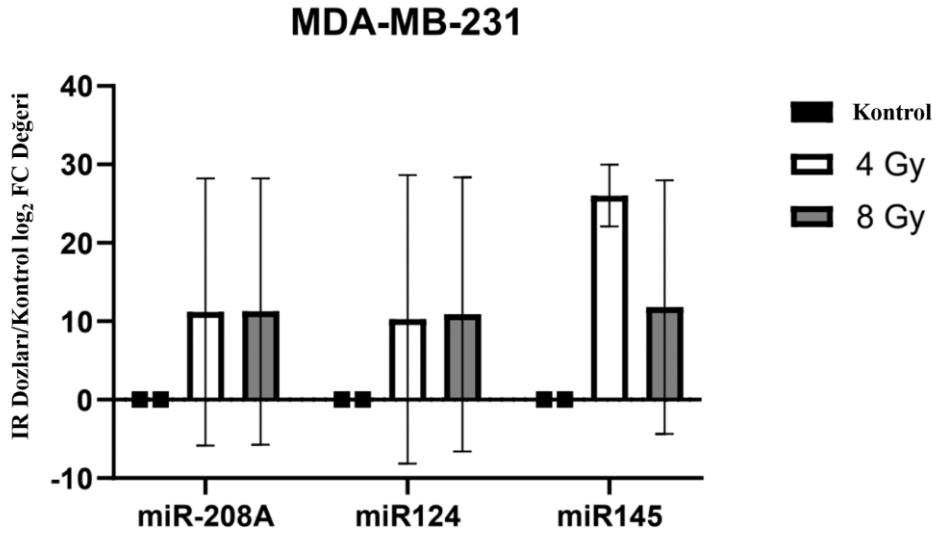
Çalışmamızın kantitatif PCR (qRT-PCR) analizi basamağında, 4 Gy ve 8 Gy dozlarında iyonlaştırıcı radyasyon uygulanan MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 96 saatlik inkübasyon sonunda miRNA ekspresyon analizi yapılmıştır. Bu kapsamda incelenmek üzere seçilen 3 miRNA olan miR-208a, miR-124 ve miR-145'e ait ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Ekspresyon seviyeleri referans gen olarak kullanılan U6'ya göre normalize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar iyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti sonrasında her iki hücre hattında da miRNA ekspresyon profillerinde belirgin değişiklikler meydana geldiğini göstermiştir. Ekspresyon profilindeki değişiklikler hem 4 Gy hem de 8 Gy radyasyon dozunda, doz bağımlı olarak farklılık göstermiştir. Analiz verileri üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. Gruplar arasında oluşan istatistiksel farklılıklar tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiş olup negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ değerinin anlamlı farklılıklar oluşturduğu belirlenmiştir. MiRNA ekspresyon profillerine ilişkin analizler, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.3 4 ve 8 Gy IR maruziyeti sonrasında MCF7 hücrelerinde miRNA ekspresyon analizi

MCF7 hücre hattında miRNA ekspresyon analizi sonuçları incelendiğinde miR-208a'da IR uygulamasına karşı anlamlı bir değişiklik oluşmadığı gözlenmiştir. Ekspresyon seviyesi 8 Gy'de hafif bir artış göstermiş olsa da kontrol grubuna oldukça yakın kalmıştır. miR-124 ekspresyon seviyesi hem 4 Gy hem de 8 Gy radyasyon dozunda da belirgin bir artış göstermiştir. Ancak 4 Gy ve 8 Gy dozları

arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. IR uygulaması sonucunda en yüksek ekspresyon artışı miR-145’de görülmüştür. 4 Gy ve 8 Gy dozlarında yine belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. miR-145 ekspresyon seviyesinde gözlenen büyük artış bu miRNA’nın DNA hasar yanıtı ve hücre döngüsü mekanizmaları ile ilgili bir düzenleyici olabileceğini düşündürmektedir. Ancak grafikteki hata çubukları göz önünde bulundurularak istatistiksel anlamlılığın değerlendirilmesi için daha fazla veriye ihtiyaç duyulabileceği değerlendirilmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.4 4 ve 8 Gy IR maruziyeti sonrasında MDA-MB-231 hücrelerinde miRNA ekspresyon analizi

MDA-MB-231 hücre hattında miR-208a ekspresyon seviyesinde hem 4 Gy hem de 8 Gy için kontrol grubuna kıyasla bir artış gözlenmiştir. miR-124 ekspresyon düzeyi de benzer şekilde her iki doz değerinde de artış göstermiştir. Bu iki miRNA’da 4 Gy ve 8 Gy dozlarının ekspresyon değişimi sonuçlarının belirgin bir farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir. miR-145’in ekspresyon seviyesi ise 4 Gy dozda büyük bir artış, 8 Gy’de ise anlamlı bir düşüş göstermiştir. Bu sonuçlar MDA-MB-231 hücrelerinde miR-145’in IR etkisine karşı önemli bir düzenleyici rolü oynayabileceğini işaret etmektedir. Ancak grafikteki hata çubukları göz önünde bulundurularak istatistiksel anlamlılığın değerlendirilmesi için daha fazla veriye ihtiyaç duyulabileceği değerlendirilmektedir (Şekil 4.4).

miR-208a, genellikle kalp kası hücrelerinde bulunan ve kalp ile ilişkili biyolojik süreçlerde rol oynayan bir miRNA’dır. MiR-208a’nın ekspresyon seviyesindeki değişim kalp kasının büyüme tepkisini de etkileyebilmektedir. miR-208a’nın

değişen ekspresyon seviyesinin genleri de etkilemesi özelliğinden yararlanılarak gerçekleştirilen çalışmalar ile kardiyovasküler hastalıklarda potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir [220] [221].

miR-208a'nın ekspresyon seviyesi iyonlaştırıcı radyasyon etkisi ile de değişmektedir. Çeşitli kanser türlerinde iyonlaştırıcı radyasyon etkisi ile ekspresyon seviyesi artan miR-208a'nın kanser hücrelerin proliferasyonunu da arttırdığı bu durumun radyasyona karşı bir direnç oluşturduğu belirtilmektedir. Kanser hücrelerinde radyasyon direnci oluşmasında miR-208a'nın p21 genini hedeflemesi ve dolaylı olarak AKT/mTOR yolağını aktive etmesi mekanizması etkili olmaktadır [41, 222, 223]. Bu bilgiler ışığında miR-208a'nın artan ekspresyonunun hücrelerin radyoterapiye direnç geliştirmesinde rol oynadığı ve bu özelliği ile kanser tedavisi araştırmaları için önem taşıdığı söylenebilmektedir. MiR-208a'nın artan ifade düzeyinin radyasyon direncine neden olduğu değerlendirildiğinde bu miRNA'nın inhibe edilmesinin de radyasyona karşı duyarlılığı arttırabileceği düşünülebilir. Artan radyasyon duyarlılığının radyoterapinin etkinliğini de arttırabilecek olması bu alandaki çalışmaların önemini arttırmaktadır.

miR-208a farklı kanser türlerinde tümörün gelişmesine yönelik etkiler gösterebilmektedir. Lu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile miR-208a'nın kolon kanserinde, kanserin ilerlemesinde katkıda bulunduğu, kanser hücresinin çoğalması ve metastazı gibi süreçlerde etkili olabildiği gösterilmektedir [220]. Zou ve arkadaşlar tarafından yapılan çalışma ile miR-208a'nın artan ifade düzeyinin prostat kanserinde de tümörün büyümesine neden olduğu bulunmuştur [223].

Genel olarak kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilen miR-208a'nın kanser ile ilgili süreçlerde de etkili olduğu hatta biyobelirteç olma potansiyeli bazı kanser türlerinde ortaya konmuştur. Bazı kanser türlerinde yapılan çalışmalar ile miR-208a'nın biyobelirteç olarak özelliği ortaya konmuştur. Örneğin akciğer kanserinde yapılan bir çalışma ile miR-208a'nın aşırı ekspresyonu ile hücre proliferasyonunu arttırdığı ve kanser metastazının arttığı bulunmuştur. Bu durum hücrelerin radyasyon tedavisine direnç göstermesi ile ilişkilendirilmiş ve miR-208a'nın biyobelirteç özelliği tartışılmıştır [224]. Prostat kanserinde diğer bazı miRNA'lar ile birlikte miR-208a'nın ekspresyon değişiminin hücrelerin iyonlaştırıcı radyasyona verdiği yanıtları etkilediği incelenmiştir [225].

miR-208a, hücre büyümesi, proliferasyonu, apoptozu ve göçünü düzenleyen PI3K/AKT sinyal yolağını baskılayan PTEN genini düzenlemekte olduğundan bu genin işlevini kaybetmesi prostat kanseri hücrelerinin ilerlemesine neden olur. miR-208a'da PTEN genini baskılamak suretiyle tümörün gelişmesine ve tümör hücrelerinin radyasyona karşı direnç göstermesine neden olmaktadır. Bu özelliği ile miR-208a'nın prostat kanseri için biyobelirteç olabilme potansiyeli vurgulanmaktadır. miR-208a'nın PTEN üzerindeki etkisini engellemek radyoterapiye duyarlılığı ve tedavi başarı olasılığını arttıracaktır. Tedavi stratejilerinde göz önünde bulundurulması gereken bir husus olduğu değerlendirilmektedir [199].

miR-208a artan ifade düzeyi artışı kolorektal kanser hücrelerinde de tümörün büyümesi ve göçünü destekleyen sinyal yollarını etkilemekte olduğu düşünülmektedir. Salama ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile miR-208a'nın kolorektal kanser için diyagnostik ve prognostik bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmektedir [226].

miR-124 nörogenez, beyin gelişimi ve sinir hücrelerinin farklılaşması gibi fonksiyonlarda görevli bir miRNA'dır. Sinir sisteminde yoğun olarak bulunmakta olup nörolojik hastalıkların yanında kanser ile ilgili mekanizmalarda da etkili olabileceğine yönelik araştırmalar sürdürülmektedir [227].

MiR-124'ün ifade düzeyinin radyasyon maruziyeti ile değiştiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar ile miR-124'ün artan ifade düzeyinin hücreleri radyasyona duyarlı hale getirdiği ve tedavinin etkinliğini arttırmaya yönelik bir etki gösterdiği ortaya konmuştur. Bunun yanında miR-124'ün DNA hasar onarımı, apoptoz da dahil hücrel yanıtla ilişkin yolları da aktive edebileceği ve bir dış uyaran olarak radyasyona karşı hücrel yanıt mekanizmasında da etkili olabileceği belirtilmektedir Bu özellikleri ile miR-124'ün radyoterapi için terapötik bir hedef olabileceği düşünülmektedir [228].

miR-124'ün meme kanserindeki rolü ve meme kanseri ile ilişkisi alanında yapılan çalışmalar bu miRNA'nın tümör baskılayıcı bir rol oynadığını göstermektedir. Bu nedenle miR-124'ün artan ifade düzeyi meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu, gelişmesini metastazı baskılamaktadır. miR-124'ün azalan ifade düzeyi ise tümörün gelişmesine neden olmaktadır. Hücrede apoptozu da tetikleyebilme

özelliğine sahip miR-124 kanser hücrelerinin daha hızlı bir şekilde ölümüne ve tedavinin etkinliğinin arttırılmasına yardımcı olabilmektedir [228, 229]. .

miR-124'ün tümör baskılayıcı özellikleri meme kanserinde ve farklı kanser türlerinde de araştırılmıştır. Ancak bu miRNA'ya yönelik ilave çalışmalar yapılarak radyasyon yanıt mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir [231, 232].

MiR-124'ün meme kanserinde radyosensitiviteyi arttırdığı ve bu özelliğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların ortak özelliği miR-124'ün meme kanserini baskılamak suretiyle kanser hücrelerinin radyasyona karşı hassasiyetini arttırdığını belirtmesidir. Yapılan çalışma ile miR-124'ün meme kanseri üzerindeki etkileri incelenmiş ve potansiyel bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür [233].

miR-145 kalp hastalıkları ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda rol oynadığı belirlenmiş bir miRNA'dır. Kanser hücrelerinde göçü ve metastazı etkileyen genleri hedefleyip düzenleyerek tümör oluşum mekanizmalarında da görev alabilmektedir [234, 235].

miR-145 ifade düzeyi meme kanseri [236], prostat kanseri [237] ve kolorektal kanser [238] gibi kanser türlerinde genellikle düşük düzeyde ifade edilmektedir. Bu miRNA'nın düşük seviyede ifadesi de kanser hücresinin gelişmesini ve metastazını hızlandıran bir durum oluşturmaktadır.

Radyasyon ile ilgili yapılan çalışmalar miR-145'in hücrel radyasyon yanıtlarının düzenlenmesinde etkin bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Radyasyon maruziyeti sonucunda hücrelerin DNA onarımı, proliferasyonu, apoptoz ya da canlılığı ile ilgili yolları düzenlediği bilinmektedir. miR-145'in artan ifade düzeyinin kanser hücrelerinin radyasyona karşı hassasiyetini arttırdığını göstermektedir [239].

miR-145 meme kanserinde tümör baskılayıcı bir özellik göstermektedir. Bu nedenle hücrede miR-145'in artan ifade düzeyi tümörün gelişmesini engellerken azalan ifade düzeyi tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü artırır. miR-145 meme kanserinde metastazik süreçleri de inhibe edilebilmektedir. Dolayısıyla düşük miR-145 seviyesinin metastaza riskini arttırabileceği yorumlanabilmektedir. miR-145 meme kanserinde Bcl-2, KRAS, RAD51 ve CCND1 gibi genleri

hedefleyerek DNA onarımı, apoptozu ve hücre döngüsünü regüle edebilmektedir [239, 240] .

miR-145 meme kanseri hücrelerinin radyasyon hassasiyetini arttırmaktadır. Bu özelliği ile tedavinin etkinliğini arttırabilme ve radyobiyo belirteç olarak incelenmesi gerektiği işaret edilmektedir [240].

miR-145 çeşitli kanser türlerinde biyo belirteç potansiyeli farklı çalışmalar ile ortaya konmuştur. Wang ve arkadaşları tarafında yapılan çalışmada nazofarenks karsinomada miR-145'in radyasyon etkisi ile apoptozu arttırdığı ve biyo belirteç olarak incelenmesi gerektiği belirtilmektedir [237]. Prostat kanserinde de RAD51'i hedefleyerek radyasyon duyarlılığını artırma potansiyeli incelenmiştir [38]. Takahashi ve arkadaşları da miR-145'in radyoterapi sonrasında tümör hücrelerinin apoptozunu arttırdığını bulmuştur [241]. Tüm bu çalışmalar miR-145'in radyasyon tedavileri için biyo belirteç özellik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bu alanda yapılacak ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızın kantitatif PCR analizi basamağı ile belirlenen miR-208a, miR-124 ve miR-145 ekspresyon profilleri incelendiğinde MCF7 ve MDA-MD-231 hücre hatları için yer yer benzer yer yer farklılık gösteren bulgular elde edilmiştir. Kardiyovasküler sistem ve enerji metabolizmasında görev aldığı bilinen miR-208a'nın bu yollarda görev alan genleri hedeflemesi MCF7 hücrelerinde IR'ye karşı anlamlı bir fark oluşturmamasının nedeni olarak açıklanabilmektedir. miR-124, nörolojik metabolizmalar yanında hücre döngüsü, apoptoz gibi moleküler yollarda da düzenleyici rol oynamaktadır. IR uygulaması sonucunda artan ekspresyon düzeyi, hücre döngüsü duraklatma ya da DNA hasar yanıt mekanizmalarına katılımını desteklemektedir. Tümör baskılayıcı bir miRNA olduğu bilinen ve çalışmamızda aşırı ekspresyonu ile en belirgin ekspresyon değişimini gösteren miR-145'in ise IR etkisi karşısında DNA hasar yanıtını tetiklediği çıkarımı yapılabilir. Ekspresyon seviyesindeki bu artış, hücrelerin büyümesi ve proliferasyonunu inhibe etmek ya da apoptoza yönlendirmek için etkili bir mekanizma olarak değerlendirilebilir. miR-145'in ve muhtemelen miR-124'ün hücre döngüsünün G1/S ya da G2/M gibi kontrol noktalarında duraklamayı indükleyebileceği ve DNA onarımı yapılmayan hasarlı hücrelerin bölünmesini engelleyebileceği düşünülmektedir.

MCF7 hücre hattında, miR-208a, miR-124 ve miR-145 ekspresyon değişimleri içerisinde anlamlı sonuç veren miR-124 ve miR-145 için 4 Gy ve 8 Gy doz arasında belirgin bir fark gözlenmemesinin, her iki dozun da maksimum yanıt tetiklemesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bu durumun nedeni, hücrelerin bir doz eşik değerine sahip olması ve bu eşiği aşan dozlar için doza bağımlı bir etki gözlenmeyeceği ile yorumlanabilmektedir.

Tüm veriler değerlendirildiğinde miR-145'in IR yanıt mekanizmasında önemli bir düzenleyici olarak görev alıyor olabileceği ve biyobelirteç olarak kullanılabileceği önerilmektedir. Ancak sonuçlardaki hata payları, biyolojik varyasyon gibi parametreler göz önünde bulundurularak sonuçların doğrulanması için çalışmaların zenginleştirilmesi gerekmektedir. miR-124'ün terapötik hedef olma olasılığı miR-145'e göre daha düşük görünmekle birlikte ilave çalışmalar ile daha net bir yorum yapılması mümkün olabilecektir.

miR-208a ekspresyon seviyesinin IR uygulamasına karşı MCF7 hücre hattında olduğu gibi MDA-MB-231 hücrelerinde de anlamlı bir değişiklik göstermemesi IR maruziyetine doğrudan bir yanıt oluşturmadığını düşündürmektedir. Bu durum ilgili olduğu moleküler yollar ile ilişkilendirilebilir. Hücre döngüsü ve DNA onarım mekanizmalarında görev aldığı bilinen miR-124'ün IR uygulaması sonucunda ekspresyon seviyesinde gözlenen artış, radyasyona yanıt metabolizmasında düzenleyici rol oynayabileceğini göstermektedir. Tümör baskılayıcı özellik taşıyan miR-145'in IR uygulaması sonucunda ekspresyon düzeyindeki belirgin artış, bu miRNA'nın IR dozuna karşı aktive olan hücre savunma mekanizmasında önemli bir rol üstleniyor olabileceğini işaret etmektedir. miR-145'in hücre döngüsünde duraklamayı indükleyebileceği, G1/S ya da G2/M kontrol noktalarında durmasını sağlayabileceği ve DNA'sı hasar gören hücrelerde DNA'nın onarımına olanak sağlayabileceği tahmin edilmektedir. Artan ekspresyonu ile meme kanserinde hücre proliferasyonunu baskılayabilme ya da apoptozu tetikleyebilme potansiyeli taşıyan miR-145'in IR uygulamasına verdiği yanıt terapötik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığını güçlendirmektedir.

MDA-MB-231'de miR-208a ve miR-124'ün ekspresyon seviyelerinde değişen radyasyon dozlarında (4 Gy ve 8 Gy) anlamlı bir fark görülmezken miR-145'de doza bağımlı belirgin bir farklılık gözlenmiştir. miR-208a ve miR-124 ekspresyon düzeylerinde doza bağımlı bir fark görülmemesi bu hücrelerin bir eşik doza sahip

olması ve her iki doz değerinin de (4 Gy ve 8 Gy) bu eşiğin üzerinde bir değer olmasından kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmektedir.

Tüm bu sonuçlar miR-145'in MDA-MB-231 hücrelerinde IR maruziyetine karşı gösterdiği yanıt ile potansiyel bir hedef ve biyobelirteç olabileceğini desteklemektedir. IR uygulaması sonucunda ifade düzeyinde artış gözlenen miR-124 için daha fazla örneklem üzerinde çalışmalar yapılması gerektiği değerlendirilmektedir.

Tüm bu bilgiler ve çalışmamızda edindiğimiz bulgular ışığında miR-208a, miR-124 ve miR-145'in IR'ye karşı yanıtı module etmedeki roller göz önüne alındığında miR-208a'nın meme kanseri için radyoetapide terapötik hedef olabileceğine yönelik yeterli bir veri elde edilememiştir. MiR-124 ve özellikle miR-145'in ise radyasyon tedavisinin etkinliğini arttırmaya yönelik terapötik hedefler olarak araştırılma potansiyeline sahip olduğu ve bu alanda ilave çalışmaların yapılmasının son derece kritik olduğu değerlendirilmektedir. Bu miRNA'ların ifadesinin modüle edilmesi, kanser hücrelerini radyasyona karşı daha duyarlı hale getirerek ve normal hücreleri radyasyonun neden olduğu hasardan koruyarak kanser tedavisini geliştirebilecektir.

Araştırmamızın çeşitli kısıtlamaları bulunmaktadır. İlk olarak, deneylerimizin in vitro doğasının, tümör biyolojisinin ve tümör mikro ortamının in vivo karmaşıklığını tam olarak yansıtmayabileceği düşünülmektedir. İkinci olarak çalışmamız, sonuçlarımızın genellenebilirliğini sınırlayabilecek iki spesifik meme kanseri hücre dizisine odaklanmıştır. Ek olarak, gözlemlenen miRNA ekspresyon değişimlerinden sorumlu spesifik moleküler süreçler henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Gelecekteki araştırmalar, bulgularımızın in vivo olarak doğrulanmasına öncelik vermeli ve çalışmayı daha geniş bir meme kanseri hücre dizisi ve hasta kaynaklı örnekleri içerecek şekilde genişletmelidir. IR tepkisinin modüle edilmesinde tanımlanan miRNA'ların fonksiyonel rollerinin araştırılması da önem taşımaktadır. miRNA bazlı tedavileri IR ile entegre etme olasılığının araştırılmasının, meme kanseri tedavisinin etkinliğinin artırılması için yeni yollar açabileceği değerlendirilmektedir.

4.2 Biyoinformatik Çalışmalar

Biyoinformatik teknikler, kanser hücrelerindeki gen ifadesi değişikliklerini analiz etmek, farklı şekilde ifade edilen genleri belirlemek ve bunları kanser tedavisi için moleküler yollar ile ilişkilendirebilmek için özellikle son yıllarda büyük önem kazanmıştır [242]. Biyoinformatik araştırmalar yolu ile literatürde yeni prognostik ve terapötik biyobelirteçler belirlenmiş ve klinik çalışmalar ile doğrulanmıştır [243].

Çalışmamızın biyoinformatik analiz basamağının amacı, meme kanserinde radyoterapi ile ilişkili olarak farklı düzeyde ifade edilen genlerin tespit edilmesi ve bu genlerin ilgili olduğu moleküler yollar ve biyolojik süreçler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi, böylelikle potansiyel terapötik hedef özelliklerinin tartışılmasıdır.

Bu kapsamda, öncelikle radyoterapi ile ilişkili, meme kanserine özgü kritik genlerin belirlenmesi çalışmaları için Gen İfade Omnibus (GEO) açık erişim veritabanındaki radyoterapiye ilişkin veri kümeleri analiz edilmiştir. Analiz edilen genler içerisinde farklı düzeyde ifade edilenler tanımlanmış, daha sonra bu genlere ait gen ontoloji (GO) analizi yapılmıştır. Son aşamada ise protein-protein etkileşim (PPI) ağları oluşturulmuş ve incelenmiştir.

Radyoterapi ile ilişkili olabilecek kritik genlerin belirlenmesi için GEO veri tabanından üç farklı gen ifadesi veri seti (GSE40640, GSE59733 ve GSE108895) seçilmiştir. Bu veri setleri, meme kanseri hastalarının lenfositlerinden alınan veriler, tümör örneklerinden alınan veriler ve meme bezi adenokarsinom hücre hatlarından (MCF-7) alınan verilere ilişkin gen ifadesi profillerini içermektedir. Bu çalışma ile analiz edilen genlerin radyoterapi mekanizmalarını aydınlatma; yeni radyobiyobelirteçlerin keşfi ya da radyoterapiye yönelik adjuvan ajanların geliştirilebilmesi konularında fikir verici olabileceği öngörülmektedir.

4.2.1 Farklı Düzeyde İfade Edilen Genlerin Tespiti

GSE40640 veri seti analizinde, baş-boyun ve meme kanseri vakaları içerisinde yalnızca meme kanseri hastalarına ait örnekler seçilmiş ve değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık kriterleri olan $P < 0.05$ ve $|\log FC| > 1$ dikkate alınarak incelenen radyasyon uygulamasının etkisi, sonuçlarına göre 45 adet farklı düzeyde ifade edilen gen (DEG) belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre, tedavi edilmeyen

(radyasyona maruz kalmayan) kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında 32 genin yukarı yönlü, 13 genin ise aşağı yönlü düzenlendiği tespit edilmiştir.

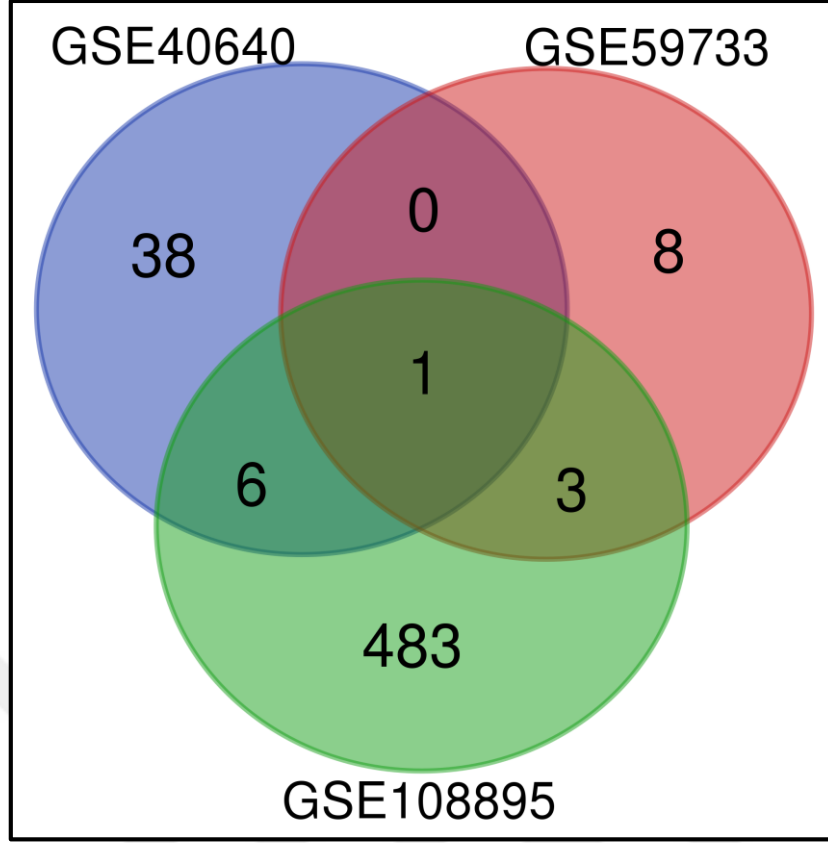
GSE59733 veri seti üzerinde gerçekleştirilen analizler ile radyasyon tedavisi öncesi ve sonrası tümör örnekleri karşılaştırılmıştır. Bu veri setinde, 10 meme kanseri hastasına ait radyasyon sonrası (n=10) tümör örnekleri ve radyasyon öncesi (n=9) tümör örnekleri incelenmiştir. Tanımlanamayan genler elendikten ve yinelenen girişler birleştirildikten sonra, istatistiksel olarak anlamlılık kriterlerine ($P < 0.05$ ve $|\log FC| > 1$) uygun olarak 12 DEG tanımlanmıştır. Bu genlerin tamamının yukarı yönlü düzenlendiği belirlenmiştir.

GSE108895 veri setine ait analizlerde ise MCF7 meme kanseri hücrelerinin radyasyon uygulaması ile gen ifadelerinde oluşan değişim, kontrol örnekleriyle karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık kriterlerine ($P < 0.05$ ve $|\log FC| > 1$) göre, toplamda 493 DEG tespit edilmiştir. Bu genlerden 303'ünün yukarı yönlü, geriye kalanların ise aşağı yönlü düzenlendiği tespit edilmiştir. Radyasyon uygulamasının hücrelerde stres yanıtını nasıl etkilediği ve gen ekspresyonunda nasıl değişiklikler oluşturduğuna yönelik sonuçlar derlenmiş ve ekspresyon değişimlerinde belirgin farklılık gösteren genler Tablo 4.5'te listelenmiştir.

Tablo 4.5 GSE40640, GSE59733 and GSE108895 veri setlerinden kontrol örnekleri ve radyasyon uygulanan örnekler arasında ilk 20 DEG

GSE59733			GSE108895			GSE40640		
Gen Sembolü	adj. P. Değ.	logFC	Gen Sembolü	adj. P. Değ.	logFC	Gen Sembolü	adj. P. Değ.	logFC
NR4A1	4.04E-02	-3.4081	S100A9	2.05E-04	-4.1628	FDXR	9.57E-14	-3.6083
FOS	3.93E-02	-3.3591	APOD	1.91E-04	-3.8241	CD70	1.82E-12	-2.6785
DUSP1	1.50E-02	-3.1771	C15orf48	5.59E-05	-3.7803	PCNA	9.87E-13	-2.5501
CDKN1A	3.96E-03	-2.9208	CEACAM6	1.09E-04	-3.7428	AEN	4.41E-18	-2.5135
SLC2A3	5.19E-03	-2.6514	RASD1	1.14E-04	-3.519	TNFRSF10B	5.36E-16	-2.0818
ZFP36	1.50E-02	-2.404	ALDH1A3	1.33E-04	-3.3548	GADD45A	8.52E-08	-1.9524
EGR1	1.50E-02	-2.3105	GDF15	1.15E-05	-3.2808	GNG7	1.07E-08	1.94587
NAMPT	3.13E-02	-2.0363	PAQR7	8.47E-05	-3.0541	TNFSF4	2.55E-08	-1.8082
GDF15	4.04E-02	-2.0154	S100P	8.47E-05	-2.995	VWCE	2.84E-07	-1.7816
FTH1	3.13E-02	-1.8593	ACTA2	3.59E-04	-2.8737	CD79B	3.13E-07	1.71534
MDM2	3.13E-02	-1.7767	MATN3	1.44E-04	-2.7737	DDB2	3.43E-09	-1.6507
PIM1	4.33E-02	-1.1901	TAGLN	1.68E-04	-2.7432	SLC2A5	2.04E-06	1.64892
			BCAS1	6.22E-05	-2.7345	VPREB3	2.61E-06	1.58592
			ACTG2	1.07E-04	-2.731	TRIAP1	4.19E-12	-1.5792
			HES2	8.47E-05	-2.7246	PHPT1	3.40E-09	-1.5532
			MIR21	2.27E-04	-2.6827	PHLDA3	3.26E-09	-1.5394
			ISG15	3.13E-04	-2.6821	SESN1	4.19E-12	-1.4724
			RCAN1	5.15E-03	-2.6213	CXCL9	2.96E-02	-1.3665
			PARP9	1.44E-04	-2.6116	CD79A	2.61E-05	1.36057
			CEL	1.20E-04	-2.6104	EBI3	2.67E-02	-1.3457

Tespit edilen genler Venn analizi ile incelenmiştir. Venn analizi sonuçlarına göre CDKN1A, incelenen 3 veri seti içerisinde farklı seviyede ekspresyon gösteren ortak gen olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.5). GSE108895 ve GSE59733 veri setlerinin DEG'leri arasında 3 ortak gen (GDF15, FOS ve EGR1); GSE108895 ve GSE40640 veri setlerinin DEG'leri arasında 6 ortak gen (PHLDA3, GADD45A, IER5, FHL2, ACTA2 ve ZMAT3) tespit edilmiştir.



Şekil 4.5 GSE40640, GSE59733 and GSE108895 veri setlerinden DEG olarak belirlenen ortak genlerin Venn diyagramı

CDKN1A (p21) ifadesi, tümör baskılayıcı protein p53 tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir ve proteinin farklı stres olaylarına yanıt olarak hücre döngüsü G1 fazı durmasını indüklemesine olanak tanır ve çoğalan hücre nükleer antijeni, bir DNA polimeraz aksesuar faktörü ile etkileşime girer ve S fazı DNA replikasyonunu ve DNA hasar onarımını düzenler [244]. P53, hücre döngüsünü etkileyen iyonlaştırıcı radyasyon sürecinde bir transkripsiyon faktörü olarak hareket eder ve p21 ekspresyonuna ve ardından hücre döngüsü durmasına yol açar [245]. Bu gen, bu temel mekanizmadaki katılımı nedeniyle genellikle tüm veri kümelerinde değişken bir ifade sergiler.

GDF15, iltihaplanma, kanser, obezite ve kardiyovasküler bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli klinik durumlarda rol oynar. Ayrıca, ağız kanseri ve akciğer kanserinde bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir. Araştırmalar, radyasyona maruz kalma nedeniyle artan GDF15 seviyelerinin meme kanseri hücrelerinde radyodirence yol açabileceğini ve bunu olası bir terapötik gösterge haline getirebileceğini göstermektedir [246]. Azaltılmış GDF-15 seviyeleri fibroblast hücrelerinin

radasyona duyarlılığını artırmaktadır [247]. GSO108895 ve GSO59733 veri kümelerinde GDF15 ekspresyonunda değişiklik tespit edilmiş ancak GSO40640'ta tespit edilmemiştir. Li ve diğerleri, GDF15 ekspresyonunun 3 ila 8 Gy aralığındaki dozlara maruz kaldığında lenfoblastoid hücrelerde ve periferik kan lenfositlerinde değişmeden kaldığını göstermiştir [247]. Çalışmamızda incelenen uygulamada tek bir 5 Gy dozunun uygulandığı göz önüne alındığında, GDF15'in ekspresyonunda herhangi bir değişiklik göstermediği sonucuna varılmıştır.

FOS proteinleri hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve dönüşümünü düzenlemede rol oynamaktadır. FOS gen ekspresyonu bazı durumlarda apoptotik hücre ölümüyle de ilişkilendirilmiştir [248].

Araştırmalar, EGR1 geninin bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü göstermektedir [249]. Bir hücre hattı kullanan bir çalışma, EGR1'in IR kaynaklı otofajiyi etkileyerek hepatosellüler karsinom (HCC) hücrelerinde radyasyon direncini desteklediğini göstermektedir. EGR1'i hedeflemek, HCC için bir tedavi yaklaşımı olarak önerilmektedir [250]. İçsel apoptotik sinyal yolunda rol oynayan PHLDA3, p53'ün doğrudan hedef genidir [251]. Bu gen, CDKN1A ve MDM2 genleriyle birlikte, p53 tarafından indüklendiğinde bir AKT inhibitörü olarak işlev görmektedir [252].

GADD45A, büyüme durması stresine ve DNA'ya zarar veren ajanlara maruz kalmaya yanıt olarak yüksek transkript seviyeleri gösteren bir gen kümesinin parçasıdır. Bu genin DNA hasarına yanıt olarak transkripsiyonu hem p53'e bağımlı hem de p53'ten bağımsız yollarla düzenlenir [253]. GADD45A, hücre büyümesinin engellenmesi, apoptozu tetikleme ve p53 ile etkileşime girme dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde rol oynayan bir gendir. İşlevsel özellikleri nedeniyle genomik bütünlüğün korunmasında, DNA hasarına yanıt vermede ve kanser mekanizmalarında önemli bir rol oynamaktadır [254].

IER5, DNA hasarı yanıtında görev alan bir gendir. Yu ve arkadaşlarının Hela hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalar IR maruziyeti sonucunda DNA hasarının, IER5'in bulunmadığı hücrelerde kontrol grubu olan IER5 taşıyan hücrelere göre daha belirgin olduğunu göstermiştir [255]. Liu ve arkadaşları ise yaptıkları çalışma ile servikal kanser tedavisinde iyonlaştırıcı radyasyon kullanımının IER5 ekspresyonunu artırdığını doğrulamıştır. Elde edilen bulgular ile IER5'in servikal

kanser için radyoterapide olası bir terapötik biyobelirteç olarak rol alabileceği öne sürülmüştür [256].

FHL2, transkripsiyonel bir kofaktör olarak işlev gören bir adaptör proteindir. FHL2, birden fazla genin transkripsiyonunu kontrol ederek hücre çoğalması, apoptoz ve hücre döngüsü dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik aktiviteleri kontrol eder [257, 258]. MDA-MB-231 hücrelerinde G2/M geçişinin hızlanması, FHL2 ekspresyonunun baskılanmasıyla bağlantılı olup bu da hücre döngüsü inhibitörü ve FHL2'nin hedef geni olan p21 geninin uyarılmasına yol açmıştır [258]. Wang ve arkadaşları, FHL2 geninin DNA onarımını geciktirdiğini ve MCF7 hücre kültüründe iyonlaştırıcı radyasyondan sonra tümör hücrelerinde radyasyona duyarlılığı azalttığını bulmuştur [259].

ACTA2, altı farklı aktin proteininden birini kodlar. Aktinler, hücre hareketinde, yapısında, stabilitesinde ve hücreler arası sinyallemede önemli roller oynayan evrimsel olarak korunmuş proteinlerdir. Kodlanan protein, vasküler kontraktilite ve kan basıncının korunmasında rol oynayan düz kas aktinidir. ACTA2 geni, tümör hücresi göçünde ve penetrasyonunda önemli bir rol oynamaktadır [260].

RNA bağlayıcı bir protein olan ZMAT3'ün, p53'e dayanan bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü kanıtlanmıştır. ZMAT3'ün, p53'e bağlı tümör baskılama mekanizmasında önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür [261]. ZMAT3'ün aşırı ekspresyonu, tümör hücresi gelişimini engeller ve p53'e bağlı büyüme düzenleyici yolda potansiyel katılımını gösterir. Bu genin alternatif olarak eklenmesi, yalnızca bir amino asitle değişen iki izoform üreten iki transkript varyantı üretmektedir [261].

NR4A1, steroid-tiroid hormonu-retinoid reseptör süper ailesinin bir parçasıdır. Fitohemaglutinin insan lenfositlerinde ifadeyi indüklerken, serum uyarımı tutuklanmış fibroblastlarda ifadeyi tetikler. Protein nükleer bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir [262]. Nükleer bir reseptör olan NR4A1, normal meme dokularına kıyasla meme tümörü dokularında yukarı yönlü düzenlenmektedir. Bu özellik, katı tümör kaynaklı malignitelerde pro-onkogenik bir faktör olarak tanımlanmaktadır [263].

DUSP1, bir fosfataz kodlar ve çevresel strese karşı insan hücrel tepkisinde ve hücre çoğalmasını engellemede önemli görünmektedir. Kodlanan protein, katı

tümörlere kemoterapi ve radyasyona karşı direnç sağlayabilir ve bu da onu kanser tedavisi için potansiyel bir hedef haline getirmektedir [264].

Çalışmamızda en fazla ekspresyon değişimi gözlenen ilk 20 geni analiz ettiğimizde, CDKN1A'nın GSE59733'te tanımlanan 13 gen arasında 4. sırada yer aldığını, ancak üç veri setinin hepsinde tutarlı bir şekilde ifade edilmesine rağmen GSE40640 ve GSE108895 veri setlerinde ilk 20 gen arasında yer almadığı görülmüştür. Venn şeması ile tespit edilen veri setleri arasında ekspresyon düzeyinde değişiklik saptanan ortak genlerden (CDKN1A, GDF15, FOS ve EGR1 PHLDA3, GADD45A, IER5, FHL2, ACTA2 ve ZMAT3) yalnızca GSE59733 ve GSE108895 veri setleri arasında ortak olarak tespit edilen GDF15, Tablo 4.1'de yer almaktadır.

Tablo 4.1 incelendiğinde hücrel stres yanıtlarında rol oynayan NR4A1, FOS ve EGR1 genlerinin ifadelerinin azaldığı görülmüştür. Bu genlerdeki ifade düzeyinin azalması, IR uygulaması sonrası hücrelerin radyasyon yanıt mekanizmalarının baskılandığını gösterebilir.

Venn şemasına göre (Şekil 4.5) her üç veri setinde de ifade düzeyinde değişim olduğu belirlenen ancak yalnızca GSE59733 veri setinde ilk 20 gen arasında bulunan CDKN1A'nın DNA hasarı mekanizmasında hücre döngüsünü durdurma ve tamir mekanizmalarını düzenleme rolü göz önünde bulundurularak radyasyona maruz kalan hücrede DNA'nın zarar gördüğü doğrulanmaktadır. DNA hasarına duyarlı bir gen olan FDXR, radyasyon yanıtında da önemli bir rol oynamaktadır. Bu genin GSE40640 veri setinde belirgin olarak aşağı yönlü düzenlenmiş olması radyasyon etkisi ve radyasyon ile ilişkisini doğrular nitelik taşımaktadır.

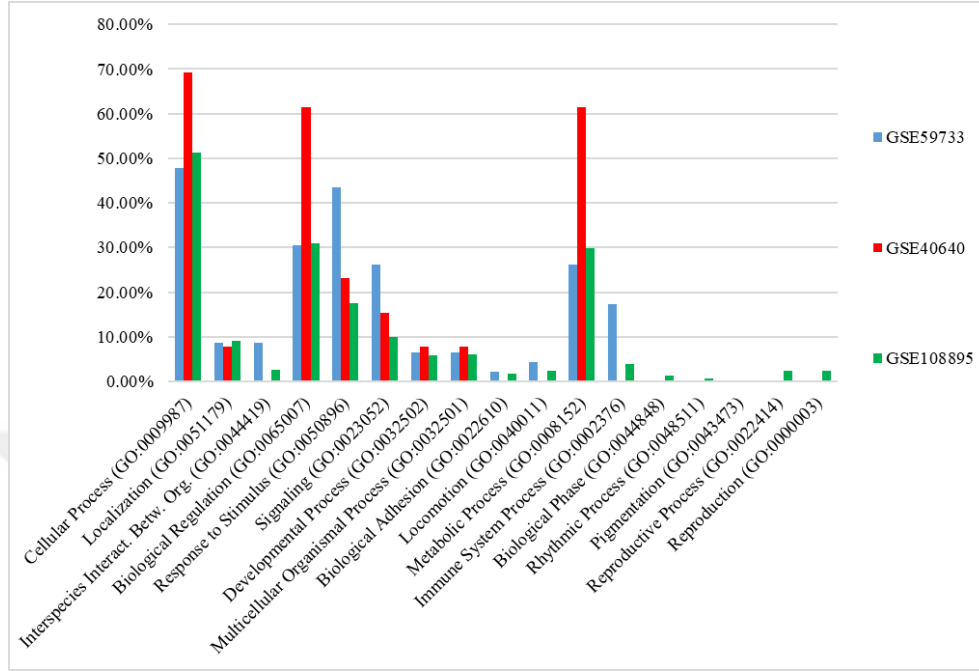
Hücre büyümesinde metabolizması ile ilişkili GDF15 geninin GSE59733 ve GSE108895 veri setlerine azalan ekspresyonu radyasyonun hücre büyümesi üzerinde etkilerini desteklemektedir.

4.2.2 Gen Ontoloji Analizi

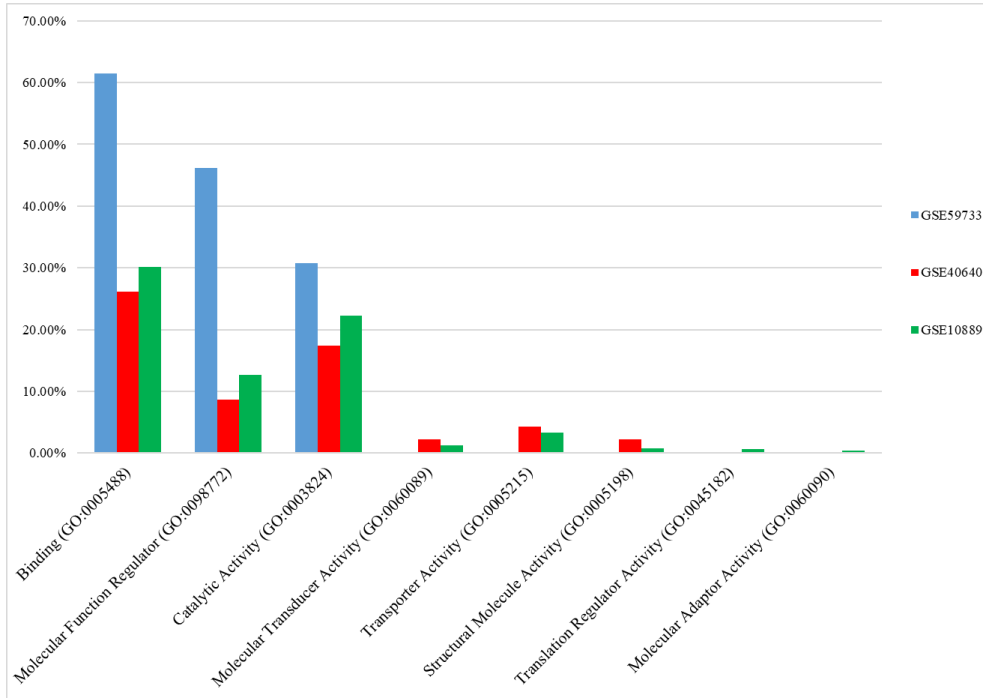
GO analizi, biyolojik prosesleri ve moleküler fonksiyonları sınıflandırmak için sırasıyla GSE40640, GSE59733 ve GSE108895 veri setlerinden elde edilen 45, 12 ve 493 DEG üzerinde gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, en yaygın moleküler işlevler; bağlanma, moleküler işlev kontrolü ve katalitik aktivite olarak belirlenmiştir. Biyolojik süreçlere ilişkin analiz sonuçları içerisinde ise en yaygın

olarak hücrel ve metabolik süreçler, biyolojik düzenleme, uyarılara tepki ve sinyalleme tanımlanmıştır (Şekil 4.6).

(A) Biyolojik prosesler



(B) Moleküler fonksiyonlar



Şekil 4.6 GSE40640, GSE59733 and GSE108895 veri setlerinin DEG ontoloji analizi. (A) Biyolojik proses, (B) Moleküler fonksiyon

Gen ontolojisi verileri analiz edildiğinde, GSE40640 veri setinin hücresel süreç, biyolojik düzenleme ve metabolik süreç kategorilerinde diğer veri setlerine kıyasla belirgin bir şekilde daha yüksek değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu veri seti, IR için bir maruz kalma belirteci olarak kullanılan, radyasyonun biyolojik etkilerinin incelenmesinde en radyoduyarlı [265] memeli hücresi olarak kabul edilen lenfositlere odaklanmakta ve kanser prognozu ve tedavisinde radyasyon yanıtları üzerine devam eden araştırmalara katkı veri sağlamaktadır.

GSE59733 veri seti, diğer veri setlerine kıyasla, uyarı ve sinyal süreçlerine verilen yanıtlarda daha yüksek seviyede bir aktivite sergilemiştir. Şekil 4.6, GSE59733 ve GSE108895 veri setlerinin uyarı ve sinyal süreçlerinde anlamlı farklılıklar taşıdığını ancak bu iki süreç dışında benzer özellikler taşıdığını ortaya koymaktadır. Bu farklılıkların, GSE59733'ün kanser hastalarından, GSE108895'in ise hücre kültürlerinden elde edilmiş örneklerden alınmış olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

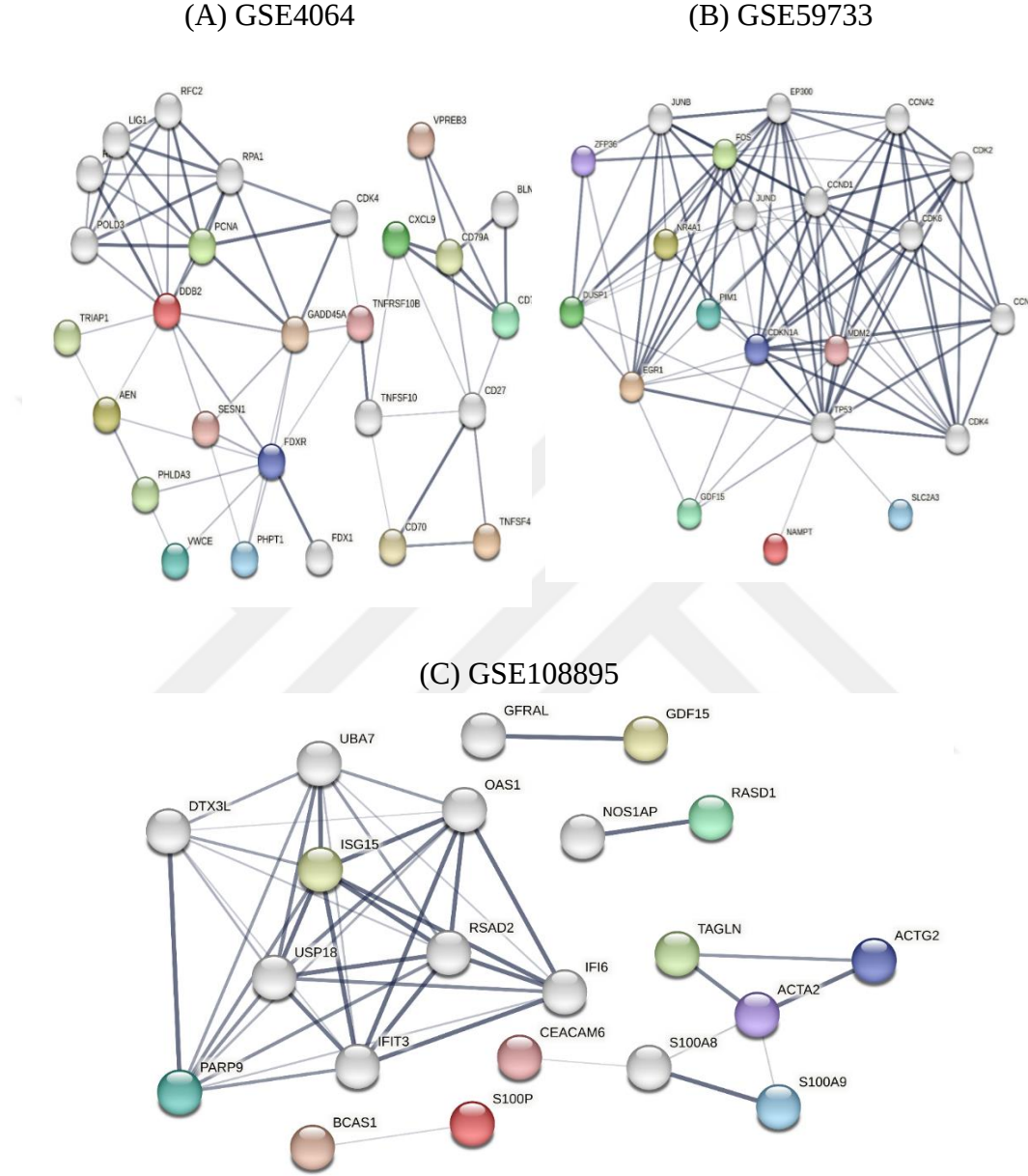
GSE108895 veri seti belirgin ayırt edici bir özellik göstermemiştir. GSE59733 veri setinin sinyalleme ve uyaran tepkisi biyolojik süreçleri açısından zengin olduğu gözlemlenmiştir. Moleküler işlev açısından yapılan değerlendirme ile bu veri setinin diğer veri setlerine kıyasla bağlanma, düzenleme ve katalitik aktivite profillerini daha üstün bir şekilde sergilediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, GSE59733 veri setinde çeviri düzenleme ve adaptör aktiviteleri saptanamamıştır.

Biyolojik süreçlerin detaylı analizine göre, GSE40640 veri seti, diğer iki veri setine kıyasla hücresel süreç, biyolojik düzenleme ve metabolik süreç kategorilerinde daha yüksek bir aktivite sergilemiştir. Bu veri setinde, ifadede en anlamlı değişikliği gösteren gen FDXR olarak belirlenmiştir. FDXR üzerine ex vivo yürütülen çalışmalar, bu genin kanda bulunan lökosit hücrelerinde iyonlaştırıcı radyasyona maruziyet için güvenilir bir biyobelirteç olara rol alabileceğini ortaya koymuştur [266].

4.2.3 Protein-Protein Etkileşim Analizi

Protein-protein etkileşim analizi basamağında en yüksek mutlak log katlama değişim değerlerine sahip ilk 20 DEG kullanılarak kapsamlı bir STRING ağı oluşturulmuştur. Analizde sorgu proteinleri birinci kabukta konumlandırılmıştır. En güvenilir etkileşimlere sahip ve en fazla 10 proteinden oluşan ikinci kabuk da ağı

eklenmiştir. Dikkat çeken proteinler ağ içerisinde renkli düğümler ile gösterilirken, bu proteinler ile etkileşime giren ikinci kabukta yer alan proteinler beyaz düğümler ile gösterilmiştir (Şekil 4.7).



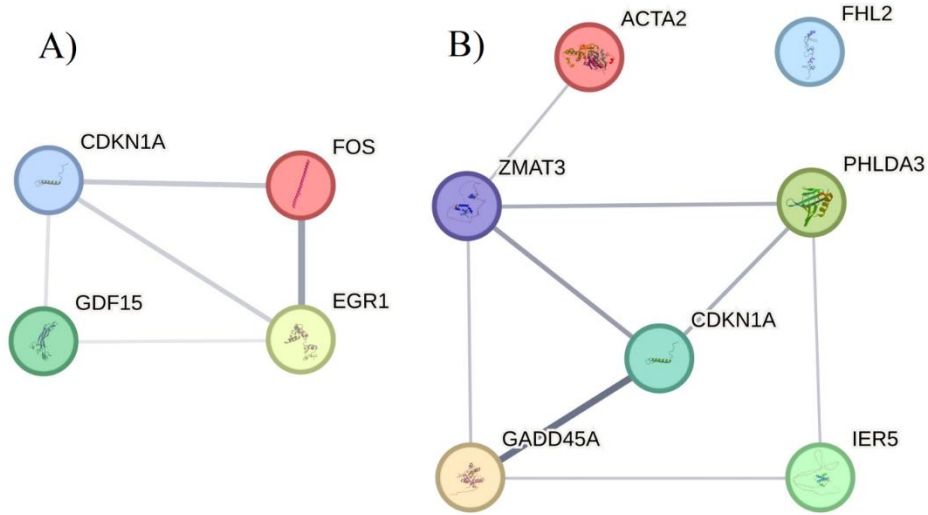
Şekil 4.7 Üç veri setine ait analizler sonucunda belirlenen en belirgin 20 DEG'e ait protein-protein etkileşim ağı (A) GSE40640 (B) GSE59733 ve (C) GSE108895

PPI analizi (Şekil 4.7) ile GSE40640 veri setinde PCNA geni ile LIG1, RFC2, RPA1, DDB2, GADD45A, POLD3 ve CDK4 genleri arasında önemli bir ilişki olduğu ortaya konmuştur. Özellikle, POLD3, LIG1, RFC2, RPA1, CDK4 ve GADD45A genlerinin birbirleriyle güçlü bir etkileşim sergilediği gözlenmiştir. Buna ilave olarak CD79A, CXCL9, CD79B, BLNK, VPREB3 genlerinin hem

birbirleriyle hem de diğer genler ile arasında dikkat çeken bir etkileşim olduğu tespit edilmiştir. CDKN1A geni, her 3 veri setinde de istikrarlı bir ifade değişikliği göstermiş olmasına rağmen GSE46040 veri setindeki en yüksek ifade değişikliğine sahip ilk 20 gen arasında yer almamış ve PPI analizine dahil edilmemiştir.

Tablo 4.6 GSE40640, GSE59733 and GSE108895 veri setlerinden radyasyon öncesi/kontrol ve radyasyon sonrasında ortak olarak tespit edilen DEG’ler

GSE59733			GSE108895			GSE40640		
Gen Sembolü	adj. P. Değ.	logFC	Gen Sembolü	adj. P.Değ.	logFC	Gen Sembolü	adj. P. Değ.	logFC
FOS	3,93E-02	-3,359	FOS	6,65E-04	1,434			
EGR1	1,50E-02	-2,310	EGR1	1,21E-03	-1,530			
GDF15	4,04E-02	-2,015	GDF15	1,15E-05	-3,280			
CDKN1A	3,96E-03	-2,920	CDKN1A	9,94E-04	2,164	CDKN1A	1,17E-06	-1,064
			ACTA2	3,59E-04	-2,873	ACTA2	5,33E-07	-1,340
			FHL2	3,97E-04	-2,323	FHL2	2,10E-08	-1,092
			GADD45A	1,16E-03	-2,296	GADD45A	8,52E-08	-1,952
			ZMAT3	1,54E-04	-2,042	ZMAT3	7,22E-03	-1,117
			PHLDA2	1,57E-03	-2,041	PHLDA3	3,26E-09	-1,539
			IER5	4,28E-03	1,208	IER5	8,87E-08	-1,291



Şekil 4.8 Ortak olarak tespit edilmiş DEG'lerin protein-protein etkileşimi (PPI) ağları (A) GSE59733 ve GSE108895 veri setlerinin ortak DEG ilişkisi (B) GSE40640 ve GSE108895 veri setlerinin ortak DEG ilişkisi

GSE59733 veri setinin analizi, bazı güçlü protein-protein etkileşimlerini ortaya koymuştur (Şekil 4.8A). Bunlar arasında en güçlü etkileşimler FOS-JUND, FOS-JUNB ve FOS-CCND1 çiftleri arasında meydana gelmiştir. Jun ve FOS ailelerinin kombinasyonu arasındaki ilişki, meme kanserinde CCND1 geninin aktivasyonunu destekliyor olmalarına dayanarak açıklanmaktadır [267, 268]. CDKN1A geni, TP53, NR4A1, EP300, CCND1, CCNA2, CDK2, CDK6, CCNE1, MDM2 ve CDK4 genleri ile güçlü etkileşimler göstermektedir. EGR1 geninin ise JUNB, FOS, EP300 ve JUND genleri ile anlamlı ilişkiler gösterdiği ve TP53 ile güçlü bir bağa sahip olduğu görülmektedir. EP300 geni, JUNB, DUSP1, NR4A1, EGR1, JUND, CDKN1A, TP53, MDM2 ve CCND1 genleri ile güçlü bir etkileşim sergilemiştir. CCNA2 geni, en güçlü bağlarını TP53, MDM2, CDKN1A, CDK6, CDK4, CCNE1 ve CDK2 genleri ile oluşturmuştur.

GSE108895 veri seti analiz edildiğinde, diğer veri setlerine kıyasla daha az karmaşık bir etkileşim ağı elde edilmiştir. En dikkat çekici etkileşimler ISG15, RSA2, IFI6, UBA7, IFIT3, USP18 ve OAS1 genleri arasında saptanmıştır. Bunun yanında DTX3L ve PARP9 genleri arasında da anlamlı bir etkileşim bulunmaktadır. GFRAL ve GDF15 ile NOS1AP ve RASD1 genleri arasındaki etkileşimler bağımsız etkileşim olarak dikkat çekmektedir. Kardiyovasküler olayların doğrulanmış prognostik göstergelerinden olan GDF15 ve GFRAL genlerinin

biyokimyasal bir yolda birlikte görev aldığı göz önünde bulundurulduğunda [269], bu etkileşimin beklenen bir bulgu olduğu değerlendirilmiştir.

IR maruziyeti sonucu ekspresyon değişimi gösteren genler arasındaki etkileşimler, önemli bağlantılar ortaya koymuştur. GSE59733 ve GSE108895 veri setlerinde yaygın olarak değişim gösteren genlerin karşılaştırılması sonucunda, FOS, EGR1, GDF15 ve CDKN1A genleri tanımlanmıştır (Tablo 4.6). GSE59733 veri setinde, bu genlerin her biri aşağı yönlü olarak düzenlenmiştir. Ancak GSE108895 veri setinde, EGR1 ve GDF15 genleri aşağı yönlü düzenlenirken, FOS ve CDKN1A genleri yukarı yönlü düzenlenmiştir. Özellikle FOS ve EGR1 genleri arasında güçlü bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8A). EGR1'in düşük ekspresyonunun kötü prognoz ve terapötik direnç ile ilişkili olduğunu ortaya koyan literatür bulguları [270], çalışmamızda elde edilen analiz sonuçlarını desteklemektedir. Ancak veri seti analizimiz, FOS geminin IR maruziyeti sonrasında, GSE108895 veri setinde (MCF7 hücre hattı) yukarı yönlü regüle edildiği, ancak GSE59733 veri setinde (meme kanseri tümör örnekleri) aşağı yönlü regüle edildiği ortaya koymuştur. Bu bulgular, EGR1 ve FOS genlerinin ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların IR'ye karşı hücrel yanıtta varyasyonu yansıttığını ve bu genlere ilişkin fonksiyonel görevlerin daha ayrıntılı bir şekilde araştırılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

GSE108895 ve GSE40640 veri setleri arasında, ekspresyon değişimi gösteren ortak genlerin incelenmesi sonucunda, CDKN1A, ACTA2, FHL2, GADD45A, ZMAT3, PHLDA3 ve IER5 genleri tanımlanmıştır (Şekil 4.8B). Bu genlerin tümü GSE40640 veri setinde aşağı yönlü regüle edilmiştir. GSE108895 veri setinde ise, CDKN1A ve IER5 genleri hariç diğer tüm genler de aşağı yönlü regüle edilmiştir. GSE108895 ve GSE40640 veri setlerinin her ikisinde de GADD45A geninin ekspresyon seviyesindeki azalma dikkat çekici bir bulgudur, çünkü GADD45A hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücrel yaşlanma ve DNA hasarına yanıt gibi çeşitli hücrel süreçlerde kritik rol oynayan bir genidir [271, 272]. GADD45A genindeki azalan ekspresyon çoğunlukla bu genin meme kanseri vakalarında sıklıkla bildirilen metilasyonu ile ilişkili olabilir. GADD45A geminin metilasyonu, normal meme epiteline kıyasla daha düşük bir gen ekspresyonuna neden olmaktadır. Epigenetik değişikliklerin kanser hücrelerinin hayatta kalması için hayatın bir fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir. Çünkü GADD45A ve

GADD45G genlerinin NF- κ B tarafından baskılanması, kanser hücrelerinin hayat sürekliliği için gereklidir. GADD45A geninin ekspresyonu, farklı tipte katı tümörlerde ve hematopoietik hücrelerde düzensiz olarak gözlenmektedir. Bu durum, bu proteinlerin hücrel stres yanıtlarındaki önemini vurgulamaktadır.

Çalışmamızın biyoinformatik analiz basamağında; IR'nin kanser hastalarından alınan tümör dokuları, lenfosit hücreleri ve meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla üç veri seti (GSE40640, GSE59733 ve GSE108895) analiz edilmiş ve bu veri setlerinde gen ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikler hem ortak noktalar hem de farklılıklar açısından değerlendirilmiştir.

CDKN1A geni, tüm veri setlerinde ekspresyon değişimi göstermiştir. IR'nin DNA hasarına neden olduğu bilinen etkileriyle uyumlu olan bu bulgu, analizimizin literatür çalışmalarını destekler nitelikte olduğunu doğrulamaktadır. Araştırmamız, IR'ye karşı bazı genlerin ortak bir tepki oluşturduğunu, bazı genlerin ise farklı tepkiler sergilediğini göstermiştir. Elde edilen bulgular, belirlenen genlerin meme kanserinde prognostik göstergeler olarak potansiyelini araştırmanın yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanında CDKN1A geninin meme kanseri doku hücrelerinde, lenfosit hücrelerinde ve meme kanseri hücre kültürlerinde IR'ye verdiği yanıt, bu alanlarda yeni terapötik ajanların geliştirilmesine yönelik araştırılmasının önemini vurgulamaktadır.

5.1 Sonuçlar

Tez çalışması kapsamında, terapötik radyasyonun (IR) meme kanseri hücreleri üzerindeki moleküler etkileri incelenmiştir. Bu amaçla en yaygın kullanılan meme kanseri hücre hatları arasında yer alan MCF7 ve MDA-MB-231 hücreleri 4 ve 8 Gy/1 fraksiyon X-ışınına maruz bırakılmıştır. Kanser tedavisinde kullanılan LINAC sistemi ile yapılan ışınlama uygulamasının ardından 48. saat, 96. saat ve 7. gün sonunda hücre canlılıkları tayin edilmiştir. İyonlaştırıcı radyasyonun moleküler kantitatif analizi için literatür araştırmaları ve veri tabanları aracılığı ile yapılan araştırma ile 3 miRNA belirlenmiş ve bu miRNA'ların iyonlaştırıcı radyasyon etkisi ile ifade düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. İncelenmek üzere seçilen miRNA'lar belirlenirken iyonlaştırıcı radyasyon ile ilişkisi ve meme kanseri dışındaki diğer kanser türlerinde radyobiyo-belirteç olma potansiyeli göz önünde bulundurulmuştur. İyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan hücrelerin moleküler kantitatif analizleri 96. saat sonunda yapılmıştır. Bu hücrelerden elde edilen total RNA'lar üzerinden cDNA sentezlenmiş ve sonrasında miRNA ifade düzeylerindeki değişimler belirlenmiştir.

Hücre canlılığı analizleri, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarından MDA-MB-231'in IR'ye karşı daha duyarlı olduğunu ve özellikle 96 saatlik inkübasyon sonunda hızlı bir öldürme etkisi gösterdiğini ortaya koymuştur. Aynı uygulamanın tekrarlanması ile meme kanseri hücreleri üzerinde inhibe edici bir etki oluşturulabileceği düşünülmektedir. MCF7 hücre hattında ise IR'nin anti kanser etkilerinin 7 gün inkübasyon sonunda daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Ancak 7.

gün sonundaki hücresel inhibisyonun hücre kültürü ortamında besin tükenmesinden de kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir.

Hücre canlılığı analizlerinden elde edilen, iyonlaştırıcı radyasyonun hücre canlılığı üzerine doza ve zamana bağlı etkileri, literatür çalışmaları [273, 274] ile uyumludur. Bununla birlikte, bu hücre hatlarında IR'ye maruz kalmanın ardından canlılıkta herhangi bir değişiklik olmadığını bildiren çelişkili çalışmaların da bulunduğunu belirtmekte fayda vardır. Bu sonuçlar, radyasyon tedavisi planlarını tasarlarken hem zaman hem de dozun dikkate alınmasının önemini vurgulamaktadır. Dozu artırmak ve ışınlamadan sonraki süreyi uzatmak, daha yüksek hücre ölümü oranına yol açarak potansiyel olarak radyoterapinin etkinliğini arttırabilmektedir. DNA hasarı, apoptoz ve hücre döngüsü bozulması, IR'nin aktive edebileceği birkaç biyolojik fonksiyondur ve bu fonksiyonlara etki ediyor olması IR etkisi ile hücre canlılığında gözlenen azalmayı açıklayabilmektedir [275].

Moleküler kantitatif analiz basamağında MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 4 Gy ve 8 Gy IR uygulamasını takiben 96 saatlik inkübasyon sonrasında miR-208a, miR-124 ve miR-145'e ait ekspresyon profilleri tayin edilmiştir. MCF7 hücre hattında miR-208a anlamlı bir ekspresyon değişimi göstermemiştir. miR-124 ve miR-145'in ekspresyon seviyesinde ise artış gözlenmiştir. Ancak bu miRNA için 4 Gy ve 8 Gy dozları arasında sonuçlarda belirgin bir fark gözlenmemiştir. Bu durum, her iki dozun da hücrede maksimum yanıtı tetiklemiş olmasından kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmiştir. En belirgin ekspresyon değişimi gösteren miR-145'in, IR'ye yanıt mekanizmasında önemli bir düzenleyici rol üstlenebileceği ve radyasyon tedavisinde terapötik hedef olarak kullanılma potansiyelinin araştırılması gerektiği önerilmektedir.

MDA-MB-231 hücre hattında miR-208a yine anlamlı bir sonuç vermemiş ve miR-208a ve miR-124 ekspresyon seviyelerinde 4 Gy ve 8 Gy dozları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu durum, hücrelerin bir eşik doza sahip olmasından kaynaklanabilir ve her iki dozun da bu eşiği aşması, doza bağımlı etkinin gözlemlenmemesine yol açmış olabilir. Öte yandan, miR-145 ekspresyonu, IR uygulamasıyla doza bağımlı olarak belirgin bir farklılık göstermiştir. Bu bulgular, miR-145'in MDA-MB-231 hücrelerinde IR maruziyetine karşı potansiyel bir hedef ve biyobelirteç olabileceğini desteklemektedir.

Her iki hücre hattının sonuçları birlikte değerlendirildiğinde miR-145'in radyasyon tedavilerinde terapötik biyobelirteç adayı olabileceği değerlendirilmektedir. miR-124'ün terapötik hedef olma potansiyeli ise miR-145'e göre daha düşük görünmekle birlikte, ilave çalışmalarla bu konuda daha net bir sonuca varılabilir.

Genel olarak, miR-145 ve miR-124'ün radyasyon tedavisinin etkinliğini artırmaya yönelik terapötik hedef olarak araştırılma potansiyeline sahip olduğu, ancak miR-208a'nın meme kanseri için radyoterapi tedavisinde terapötik hedef olabileceği yönünde yeterli verinin elde edilmediği sonucuna varılmıştır. Elde edilen bulguların doğrulanması için biyolojik varyasyon gibi faktörlerin göz önünde bulundurularak çalışmaların daha da zenginleştirilmesi gerekmektedir.

Biyoinformatik çalışmalar sonucunda CDKN1A geninin incelenen üç veri setinde (GSE40640, GSE59733, GSE108895) ifade seviyeleri değişen ortak gen olarak tespit edilmiştir. Venn şeması analizi sonuçlarına göre veri setleri arasında ortak olarak tespit edilen DEG'ler olan FOS, EGR1, PHLDA3, GADD45A, IER5, FHL2, ACTA2 ve ZMAT3 genlerinin IR'ye verdikleri tepkilerin farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu genlerin ileri moleküler incelemeler ile meme kanserinde prognostik göstergeler olarak potansiyelinin araştırması önerilmektedir.

FOS, EGR1, PHLDA3, GADD45A, IER5, FHL2, ACTA2 ve ZMAT3 genlerinin, in vitro analizlerde incelenen miRNA'lar olan miR-208a, miR-124 ve miR-145 ile hedef gen olma potansiyelleri, mevcut literatür bilgileri doğrultusunda, DNA hasar yanıtı, hücre döngüsü ve apoptoz gibi moleküler yollar üzerinden ilişkilendirilerek değerlendirilmiştir. İyonlaştırıcı radyasyon (IR) uygulamasını takiben yapılan moleküler kantitatif analizlerde, anlamlı ekspresyon değişimi gözlemlenen miR-124 ve miR-145 üzerinde yoğunlaşmıştır.

Hücre döngüsü ve apoptoz yollarında yer aldığı bilinen CDKN1A, PHLDA3 ve GADD45A genlerinin miRNA'lar aracılığıyla baskılanması, potansiyel terapötik etkilerin sınırlandırılmasına yol açabilir. Çalışmamızda, GDF15 geninin ekspresyon seviyesindeki artış, bu genin IR'ye bağlı hücrel stres yanıtındaki rolünü desteklemektedir.

In vitro çalışmalarla en belirgin artışı gösteren miR-145'in, DNA hasar yanıtının anahtar genlerinden biri olan ve iyonlaştırıcı radyasyona hücrel tepkide kritik rol

oynayan CDKN1A genini doğrudan hedefliyor olması, elde edilen bulguların literatür verisiyle uyumlu olduğunu desteklemektedir.

5.2 Öneriler

Araştırmamız miR-208a, miR-145 ve miR-124'ün IR'ye hücresel yanıtta hayati bir rol oynadığını göstermektedir. Bu mikroRNA'lar, terapötik müdahaleler için hem biyobelirteçler hem de hedefler olarak hizmet etme potansiyeline sahiptir Ancak çalışmanın bazı kısıtları bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmaların devamı için;

Yalnızca iki hücre hattı üzerinden yapılmış olan bu çalışmanın in vivo doğrulanması ve daha geniş in vivo doğrulamasına ve daha geniş hücre hatlarında da test edilmesine ihtiyaç vardır.

Yenilikçi miRNA tabanlı yaklaşımlar kullanılarak bu miRNA'ların IR'ye yanıtlarının mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir.

Yapılan tüm çalışmaların radyoterapinin moleküler bilgilere dayalı olarak hastaya özgü hale getirilebilmesi, tedavi esnasında tümörlü dokular tahrip edilirken sağlıklı dokuların korunmasına yönelik bir optimizasyonun sağlanması ile hasta prognozu ve sağ kalımının artırılmasına yönelik çalışmalara katkı sağlayacak bir düzeye ulaşması gerekmektedir.

- Yalnızca MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinden yapılmış olan bu çalışmanın daha büyük örneklemeler ile ve daha geniş sayıda miRNA'lar ile in vitro ve devamında in vivo doğrulanması ve biyobelirteç olarak tanımlama yapılabilmesi durumunda bunların bir panel/kit olarak geliştirilmesi,
- Yenilikçi miRNA tabanlı yaklaşımlar kullanılarak bu miR-208a, miR-145 ve miR-124'ün IR'ye yanıtlarının mekanizmalarının aydınlatılması,
- Biyoinformatik çalışma sonucunda elde edilen bilgiler ışığında CDKN1A geninin ve belirlenen diğer genlerin (FOS, EGR1, GDF15, ACTA2, FHL2, GADD45A, ZMAT3, PHLDA3) daha derin bir araştırma ile incelenmesi,

Böylelikle yapılan çalışmaların radyoterapinin moleküler bilgilere dayalı olarak hastaya özgü hale getirilebilmesi, tedavi esnasında tümörlü dokular tahrip edilirken sağlıklı dokuların korunmasına yönelik bir optimizasyonun

sağlanması ile hasta prognozu ve sağ kalımının arttırılmasına yönelik çalışmalara katkı sağlayacak bir düzeye ulaşması sağlanabilecektir.



KAYNAKÇA

- [1] M. Chanatip and J. S. Frank, "MicroRNAs in the Ionizing Radiation Response and in Radiotherapy," *Curr. Opin. Genet. Dev*, vol. vol. 23, no. no. 1, p. pp. 12–19, 2013.
- [2] Z. Liang, J. Ahn, D. Guo, J. Votaw and H. Shim, "MicroRNA-302 replacement therapy sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation," *Pharm. Res*, vol. vol. 30, p. pp. 1008–1016, 2013.
- [3] B. Zhang, X. Pan, G. Cobb and T. A. Anderson, "MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors," *Dev. Biol.*, vol. vol. 302, p. pp. 1–12, 2007.
- [4] A. Mao, Y. Liu, H. Zhang, C. Di and C. Sun, "MicroRNA expression and biogenesis in cellular response to ionizing radiation," *DNA Cell Biol.*, vol. vol. 33, no. no. 10, 2014.
- [5] "ICRP Recommendations of the International Commission on Radiological Protection," *Ann. ICRP ,ICRP Publication 26,*, vol. vol. 1, no. 3, 1977.
- [6] O. C. Maes, J. An, H. Sarojini, H. Wu and E. Wang, "Changes in microRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation," *J. Cell. Biochem.*, vol. 105, p. 824–834, 2008.
- [7] M. Wagner-Ecker, C. Schwager, U. Wirkner, A. Abdollahi and P. E. Huber, "MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells," *Radiat. Oncol.*, vol. 5, p. 25, 2010.

- [8] P. Ahmad, J. Sana, M. Slavik, P. Slampa, P. Smilek and O. Slaby, "MicroRNAs involvement in radioresistance of head and neck cancer," *Dis. Markers*, vol. 8245345, 2017.
- [9] X. C. Wang, L. Q. Du, L. L. Tian, H. L. Wu, X. Y. Jiang, H. Zhang, D. G. Li, Y. Y. Wang, H. Y. Wu, Y. She, Q. F. Liu, F. Y. Fan and A. M. Meng, "Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 72, pp. 92-99, 2011.
- [10] L. Zhao, X. Lu and Y. Cao, "MicroRNA and signal transduction pathways in tumor radiation response," *Cell. Signal.*, vol. 25, p. 1625–1634, 2013.
- [11] I. Summerer, K. Unger, H. Braselmann, L. Schuettrumpf, C. Maihoefer, P. Baumeister, T. Kirchner, M. Niyazi, E. Sage, H. M. Specht, G. Muthoff, S. Moertl, C. Belka and H. Zitzelsberger, "Circulating microRNAs as prognostic therapy biomarkers in head and neck cancer patients," *Br. J. Cancer*, vol. 113, pp. 76-82, 2015.
- [12] J. S. Dickey, F. J. Zemp, O. A. Martin and O. Kovalchuk, "The role of miRNA in the direct and indirect effects of ionizing radiation," *Radiat. Environ. Biophys*, vol. 49, 2011.
- [13] M. Halimi, S. M. Asghari, R. Sariri, D. Moslemi and H. Parsian, "Cellular response to ionizing radiation: a microRNA story," *IJMCM*, vol. 1, pp. 1-7, 2013.
- [14] T. A. Farazi, J. I. Spitzer, P. Morozov and T. Tuschl, "miRNAs in human cancer," *J. Pathol*, vol. 223, 2011.
- [15] M. V. Iorio et al., "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 16, p. 7065–7070, 2005.

- [16] M. Z. Michael, S. M. O'Connor, v. H. Pellekaan, G. P. Young and R. J. James, "Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia," *Mol. Cancer Res*, vol. 1, no. 12, pp. 882-891, 2003.
- [17] J. Takamizawa et al., "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 11, p. 3753–3756, 2004.
- [18] M. A. K. F. A. M. a. R. F. M. R. Kayani, M. R. Kayani, M. A. Kayani, F. A. Malik and R. Faryal, "Role of miRNAs in Breast Cancer," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 12, p. 3175–3180, 2011.
- [19] W. Wang and Y. Luo, "MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential," *J. Zhejiang Univ.-Sci. B Biomed. & Biotechnol.*, vol. 16, no. 1, pp. 18-31, 2015.
- [20] G. Chen, W. Zhu, D. Shi, L. Lv, C. Zhang, P. Liu and W. Hu, "MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2," *Oncol. Rep.*, vol. 23, p. 997–1003, 2010.
- [21] Y.-J. Liu, Y.-F. Lin, Y.-F. Chen, E.-C. Luo, Y.-P. Sher, M.-H. Tsai, E. Y. Chuang and L. C. Lai, "MicroRNA-449a enhances radiosensitivity in CL1-0 lung adenocarcinoma cells," *PLoS One*, vol. 8, no. e62383, 2013.
- [22] K. M. Lee, E. J. Choi and I. A. Kim, "MicroRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR-associated signaling," *Radiother. Oncol.*, vol. 101, p. 171–176, 2011.
- [23] B. C. Gomes, M. Martins, P. Lopes, I. Morujao, M. Oliveira, A. Araujo, J. Rueff and A. S. Rodrigues, "Prognostic value of microRNA-203a expression in breast cancer," *Oncol. Rep.*, vol. 36, p. 1748–1756, 2016.
- [24] Z. Damavandi, S. Torkashvand, M. Vasei, B. M. Soltani, M. Tavallaei and S. J. Mowla, "Aberrant expression of breast development-related

- microRNAs, miR-22, miR-132, and miR-212, in breast tumor tissues," *J. Breast Cancer*, vol. 19, p. 148–155, 2016.
- [25] A. C. Begg, F. A. Stewart and C. Vens, "Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 4, p. 239–253, 2011.
- [26] V. F. Mikhailova, L. V. Shulenina, I. M. Vasilyeva, M. I. Startseva and G. D. Zasukhin, "The miRNA as human cell gene activity regulator after ionizing radiation," *Russian J. Genet.*, vol. 53, no. 3, p. 265–278, 2017.
- [27] C. Grinán-Lison ve ark., "miRNAs as radio-response biomarkers for breast cancer stem cells," *Mol. Oncol.*, vol. 14, p. 556–570, 2020.
- [28] V. Bravatà, C. Cava, L. Minafra, G. P. Cammarata, G. Russo, M. C. Gilardi, I. Castiglioni and G. I. Forte, "Radiation-induced gene expression changes in high and low grade breast cancer cell types," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 1084, 2018.
- [29] P. J. Lee ve ark., "The UK standardisation of breast radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials," *Lancet Oncol.*, vol. 14, p. 1086–1094, 2013.
- [30] M. Nitsche, J. Dunst, U. M. Carl and R. M. Hermann, "Emerging role of hypofractionated radiotherapy with simultaneous integrated boost in modern radiotherapy of breast cancer," *Breast Care*, vol. 10, p. 320–324, 2015.
- [31] H. Bartelink, P. Maingon, P. Poortmans, C. Weltens, A. Fourquet, J. Jager and ve ark., "Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial," *Lancet Oncol.*, vol. 16, pp. 47-56, 2015.
- [32] N. Masoudi-Khoram, P. Abdolmaleki, N. Hosseinkhan, A. Nikoofar, S. J. Mowla, H. Monfared and G. Baldassare, "Differential miRNAs expression

pattern of irradiated breast cancer cell lines is correlated with radiation sensitivity," *Nature Research*, vol. 10, p. 9054, 2020.

- [33] M. Fazel, P. Mehnati, B. Baradaran and J. Pirayesh, "Evaluation of gamma radiation-induced cytotoxicity of breast cancer cells: Is there a time-dependent dose with high efficiency?," *Indian J. Cancer*, vol. 53, no. 1, pp. 25-28, 2016.
- [34] C. Corcoran, A. M. Friel, M. J. Duffy, J. Crown and L. O'Driscoll, "Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer," *Clin. Chem.*, vol. 57, pp. 18-32, 2011.
- [35] Y. Shi, T. Cao, H. Huang, C. Lian, Y. Yang, Z. Wang and J. Xia, "Arsenic trioxide inhibits cell growth and motility via up-regulation of Let-7a in breast cancer cells," *Cell Cycle*, vol. 16, no. 24, p. 2396–2403, 2017.
- [36] C. Stahlhut and F. J. Slack, "Combinatorial action of microRNAs let-7 and miR-34 effectively synergizes with erlotinib to suppress non-small cell lung cancer cell proliferation," *Cell Cycle*, vol. 14, no. 13, p. 2171–2180, 2015.
- [37] S. Han, S. Belsare, D. Zhang, M. Beveridge, C. Rinaldi, J. G. Trevino and S. J. Hughes, "Exosomal delivery of stroma-derived miR-145 inhibits pancreatic cancer cell proliferation," in *AACR Annual Meeting*, Washington, DC, 2017.
- [38] M. Kato, A. Kurozumi, Y. Goto, N. Nohata, T. Arai, A. Okato and N. Seki, "Dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p) are involved in castration-resistant prostate cancer pathogenesis," in *AACR Annual Meeting*, Washington, DC, 2017.
- [39] M. Ouyang, Y. Li, S. Ye, J. Ma, L. Lu, W. Lv and W. Wang, "MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e96228, 2014.

- [40] M. Sachdeva, J. K. Mito, C. -. L. Lee, M. Zhang, R. Dodd and D. G. Kirsch, "MicroRNA-182 drives metastasis of primary sarcomas by targeting multiple genes," *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, pp. 1-10, 2014.
- [41] E. A. Mandujano Tinoco, A. García Venzor, J. Melendez Zajgla and V. Maldonado, "New emerging roles of microRNAs in breast cancer," *Breast Cancer Res. Treat*, vol. 171, p. 247–259, 2018.
- [42] F. Bray, M. Laversanne, H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, I. Soerjomataram and A. Jemal, "Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA Cancer J. Clin*, vol. 74, no. 3, p. 229.
- [43] X. Dai, L. Xiang, T. Li and Z. Bai, "Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes," *J. Cancer*, vol. 7, no. 10, p. 1281–1294, Jun. 2016.
- [44] O. Yersal and S. Barutca, "Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications," *World J. Clin. Oncol.*, vol. 5, no. 3, p. 412–424, Aug 2014.
- [45] F. K. Al-thoubaity, , "Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study," *Ann. Med. Surg.*, vol. 49, p. 44–48, 2020.
- [46] N. Eliyatkin, , E. Yalçın, , B. Zengel, S. Aktaş and E. Vardar, "Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way," *J. Breast Health*, vol. 11, no. 2, p. 59–66, Apr 2015.
- [47] C. M. Perou ve ark., "Molecular portraits of human breast tumours," *Nature*, vol. 406, no. 6797, p. 747–752, 2000.
- [48] T. Sorlie ve ark. , "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 14, p. 8418–8423, 2003 Jul.

- [49] J. I. Herschkowitz ve ark., "Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors," *Genome Biol.*, vol. 8, no. 5, p. 76, 2007 May.
- [50] A. A. Mohammed, "The clinical behavior of different molecular subtypes of breast cancer," *Cancer Treat. Res. Commun.*, vol. 29, p. 100469, 2021 Sep.
- [51] L. Pusztai, C. Mazouni, , K. Anderson, Y. Wu and W. F. Symmansc, "Molecular Classification of Breast Cancer: Limitations and Potential," *The Oncologist*, vol. 11, p. 868–877, 2006.
- [52] S. Park ve ark., "Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry," *Breast*, vol. 21, no. 1, p. 50–57, Feb 2012.
- [53] M. Ignatiadis ve ark., "A meta-analysis of gene expression profiling studies identifies clinically relevant oncogenic pathways in basal-like breast cancer," *Cancer Res.*, vol. 69, p. 106, 2009.
- [54] C. J. Creighton, "The molecular profile of luminal B breast cancer," *Biologics*, vol. 6, p. 289–297, Aug 2012.
- [55] R. Rouzier ve ark., "Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy," *Clin. Cancer Res*, vol. 11, pp. 5678–5685,, 2005.
- [56] F. Schettini ve ark., "HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 84, p. 101965, Mar 2020.
- [57] S. Tsutsui , S. Ohno , S. Murakami , A. Kataoka , J. Kinoshita and Y. Hachitanda, "Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer," *Am J Surg*, vol. 185, pp. 165-167, 2003.

- [58] L. Yin , J. J. Duan , X. W. Bian and S. C. Yu, "Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress.," *Breast Cancer Res.*, vol. 9, no. 22(1), p. 61, Jun 2020.
- [59] G. J. Morris ve ark., "Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database," *Cancer*, vol. 110, no. 4, p. 876–884, 2007.
- [60] R. Dent ve ark., "Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence," *Clin Cancer Res.*, vol. 13, no. 15 Pt 1, p. 4429–4434, 2007.
- [61] N. U. Lin ark., "Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases," *Cancer*, vol. 113, no. 10, p. 2638–2645., 2008.
- [62] G. O. Gey, W. D. Coffman and M. T. Kubicek , "Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium," *Cancer Research*, vol. 12, pp. 264-265, 1952.
- [63] L. Deborah , D. L. Holliday and V. Speirs*, "Choosing the right cell line for breast cancer research," *Holliday and Speirs Breast Cancer Research*, vol. 13, p. 215, 2011.
- [64] E. Y. Lasfargues and L. Ozzello , "Cultivation of human breast carcinomas," *J Natl Cancer Inst*, vol. 21, pp. 1131-1147, 1958.
- [65] A. F. Gazdar, V. Kurvari , A. Virmani , L. Gollahon , M. Sakaguchi and M. Westerfield, "Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer," *International Journal of Cancers*, vol. 78, pp. 766-774, 1998.
- [66] D. Amadori, L. Bertoni , A. Flamigni , S. Savini , C. De Giovanni and S. Casanova, "Establishment and characterization of a new cell line from

- primary human breast carcinoma.," *Breast cancer research and treatment*, vol. 28, pp. 251-260, 1993.
- [67] R. Cailleau , M. Olive and Q. V. Cruciger , "Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization," *In vitro*, vol. 14, no. 911, p. 5, 1978.
- [68] H. D. Soule, J. Vasquez , A. Long , S. Albert and M. Brennan, "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma," *J Natl Cancer Inst*, vol. 51, pp. 1409-1413, 1973.
- [69] A. S. Levenson and V. C. Jordan, "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line," *Cancer Res*, vol. 57, pp. 3071-3078, 1997.
- [70] A. V. Lee, S. Oesterreich, and N. E. Davidson, "MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years.," *J Natl Cancer Inst*, vol. 107, no. 7, 2015.
- [71] D. H. Fagan , L. M. Fettiġ , S. Avdulov , H. Beckwith, H. S. Peterson, Y. Y. Ho, F. Wang, V. A. Polunovsky and D. Yee, "Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF4F-Mediated Translation," *HORM CANC*, , vol. 8, no. 219–229., 2017.
- [72] K. Venugopal , H. Ahmad , E. Manikandan , K. Thanigai Arul, K. Kavitha, M. K. Moodley, K. Rajagopal, R. Balabhaskar and M. Bhaskar, "The impact of anticancer activity upon Beta vulgaris extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (ag-NPs) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines.," *J Photochem Photobiol B*, vol. 173, pp. 99-107, 2017.
- [73] S. Comsa, A. M. Cimpean and M. Raica, "The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research.," *Anticancer Res.*, vol. 35, no. 6, p. 3147–3154, 2015.

- [74] X. Dai^{1,2*}, H. Cheng^{1,2}, Z. Bai^{1,2} and J. Li^{1,2}, "Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping," *Journal of Cancer*, vol. 8, 2017.
- [75] H. Liu, C. Zang, M. H. Fenner, K. Possinger and E. Elstner, "PPAR gamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 79, no. 1, pp. 63-74, 2003.
- [76] K. J. Chavez, S. V. Garimella and S. Lipkowitz, "Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer.," *Breast Dis.*, vol. 32, no. 1-2, pp. 35-48, 2010.
- [77] Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students, Training Course Series No: 42, Vienna: International Atomic Energy Authority, 2010.
- [78] Review of Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students,, IAEA, Vienna: International Atomic Energy Authority, 2012.
- [79] "Rao BS. Handbook of Radiobiology.," *J Med Phys.*, vol. 42, no. 3, pp. 194-5, 2017.
- [80] "Part 1: X- and Gamma (γ)-Radiation, and Neutrons," in *ARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ionizing Radiation*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2000.
- [81] "Sources and Effects of Ionizing Radiation, Report to the General Assembly," UN, New York, UNSCEAR (United Nations Scientific Committee On The Effects Of Atomic Radiation), 1994.
- [82] V. Chauhan, M. Howland, B. Kutzner, J. P. McNamee and P. V. Bellier, "Biological effects of alpha particle radiation exposure on human monocytic cells," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 215, no. 3, p. 339–344, 2011.

- [83] "Training Course Series No:6," in *Postgraduate Educational Course in Radiation Protection and the Safety of Radiation Sources*, Vienna., International Atomic Energy Authority, 2002.
- [84] M. Hasabelnaby ve ark., "The radioactivity levels and beta dose rate assessment from dental ceramic materials in Egypt," *Nuclear Engineering and Technology*, vol. 56, no. 9, p. 3898–3903, 2024.
- [85] S. Krane Kenneth , "Introductory nuclear physics," *John Wiley & Sons*, p. 246–269, 1988.
- [86] K. Zheng, C. Zhu, S. Guo and X. Zhang, , "Gamma-ray-responsive drug delivery systems for radiation protection," *Chemical Engineering Journal*, vol. 463, p. 142522, 2023.
- [87] "Principles of Ionizing Radiation," in *Toxicological Profile for Ionizing Radiation*, Atlanta (GA), Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), 1999 Sept.
- [88] D. L. Stricklin, J. VanHorne-Sealy , C. Rios and L. Scott Car, "Neutron Radiobiology and Dosimetry," *Radiat Res.*, vol. 195, no. 5, pp. 480-496, 2021 May.
- [89] "Appendix, Radiation Quantities and Units, Definitions, Acronyms," in *National Research Council (US) Committee on Evaluation of EPA Guidelines for Exposure to Naturally Occurring Radioactive Materials. Evaluation of Guidelines for Exposures to Technologically Enhanced Naturally Occurring Radioactive Materials*, Washington (DC), National Academies Press (US) , 1999.
- [90] C. Ferrari , G. Manenti and A. Malizia , "Sievert or Gray: Dose Quantities and Protection Levels in Emergency Exposure," *Sensors*, vol. 8, no. 23(4), p. 1918, Feb 2023.

- [91] "Mechanisms of Biological Effects," in *Toxicological Profile for Ionizing Radiation*. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), 1999 Sept 5.
- [92] N. J. Kleiman , T. J. Macvittie , B. M. Aleman , A. B. Edgar , K. Mabuchi and C. R. Murihead, "ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs: Threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context.," Vols. 41(1-2), ICRP, 2012 Feb, pp. 1-322.
- [93] "4, Basic Principles of Radiation Biology," in *Institute of Medicine (US) Committee to Study the Feasibility of, and Need for, Epidemiologic Studies of Adverse Reproductive Outcomes in the Families of Atomic Veterans*, Washington (DC), The Feasibility of Epidemiologic Studies. Washington (DC): National Academies Press (US), 1995.
- [94] A. H. W. Nias , "An introduction to radiobiology, 2nd ed.," 1998.
- [95] R. Baskar , J. Dai , N. Wenlong , R. Yeo and K. W. Yeoh , "Biological response of cancer cells to radiation treatment.," *Front Mol Biosci.*, vol. 17, no. 1, p. 24, Nov 2014.
- [96] "ICRP International recommendations on radiological protection," *Br J Radiol / Radiology*, vol. 24 / 56, p. 46–53 / 431–9, 1951.
- [97] "ICRP Publication 1," in *Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*, ICRP Oxford: Pergamon Press, 1958.
- [98] "ICRP Publication 60," in *ICRP 1990 recommendations of the International Commission on Radiological Protection*, vol. 21, Ann ICRP, 1991, pp. 1-3.
- [99] J. E. Turner, "Atoms, radiation and radiation protection (3rd ed.)," Weinheim: WILEY: VCH, 2007, pp. 978-3-527-40606-7..

- [100] A. Ulanowski , J. C. Kaiser , U. Schneider and L. Walsh, "Lifetime radiation risk of stochastic effects - prospective evaluation for space flight or medicine," *Ann ICRP* 2020, vol. 49, pp. 200-212, Dec 2020.
- [101] M. Donya , M. Radford , A. ElGuindy , D. Firmin and M. Yacoub , "Radiation in medicine: Origins, risks and aspirations," *Glob Cardiol Sci Pract.*, vol. 4, pp. 437-448, 31 Dec 2014.
- [102] "Institute of Medicine (US) Committee for Review and Evaluation of the Medical Use Program of the Nuclear Regulatory Commission; Radiation In Medicine: A Need For Regulatory Reform," Washington (DC), National Academies Press (US), 1996.
- [103] S. Kumar , "Second malignant neoplasms following radiotherapy," *Int J Environ Res Public Health.*, vol. 9, p. 4744–59, 2012.
- [104] S. Jain , "Radiation in medical practice & health effects of radiation: Rationale, risks, and rewards.," *J Family Med Prim Care.*, vol. 10, no. 4, pp. 1520-1524, Apr 2021.
- [105] A. K. Mueller, K. Lindner , R. Hummel and J. Haier, "(2016), MicroRNAs and Their Impact on Radiotherapy for Cancer," *Radiation Research*, vol. 185, no. 6, pp. 668- 677, 2016.
- [106] E. Korpela , D. Vesprini and S. K. Liu 3, "MicroRNA in radiotherapy: miRage or miRador?," *Br J Cancer.*, vol. 112, no. 5, pp. 777-782, 2015 Mar.
- [107] G. Marvaso, A. Barone and N. Amodio, "Emerging role of microRNAs in breast cancer radiotherapy," *RNA Dis* 2, p. e786, 2015.
- [108] R. Ronald and R. R. Bresell, "Radiation in Medicine—A Need for Regulatory Reform," *Med. Phys.*, vol. 23, no. 8, 1996.

- [109] T. Yecies, T. T. Averch and M. J. Semins, "Identifying and Managing the Risks of Medical Ionizing Radiation in Endourology," *Can J Urol*, vol. 25, no. 1, pp. 9154-9160., 2018.
- [110] S. Balukrishna , V. K. Pilaka, R. C. Michael , P. Samuel and P. B. Ravindran , "Hyper-fractionated Intensity Modulated Radiation Therapy (HF-IMRT) in Head and Neck Cancer: The Technical Feasibility and Results of a Short Clinical Series.," *J Clin Diagn Res.*, vol. 9, no. 5, p. XR0, 2015 May.
- [111] H. Hu and R. A. Gatti, "MicroRNAs: new players in the DNA damage response,," *J Mol Cell Biol*, vol. 3, pp. 151-158, 2011.
- [112] R. Baskar , K. A. Lee , R. Yeo and K. W. Yeoh, "Cancer and radiation therapy: current advances and future directions," *Int J Med Sci*, vol. 9, no. 3, pp. 193-9, 2012.
- [113] L. Zhao, A. M. Bode, Y. Cao and Z. Dong, "Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miRNA in tumor radiosensitivity," *Carcinogenesis*, vol. 33, p. 2220–2227, 2012.
- [114] G. Chaput and L. Regnier , "Radiotherapy: Clinical pearls for primary care.,," *Can Fam Physician.*, vol. 67, no. 10, pp. 753-757, 2021 OCT.
- [115] S. R. Mehta, M. V. Suhag, M. Semwal and M. N. Sharma, "Radiotherapy: Basic Concepts and Recent Advances," *MJAFI*, vol. 66, pp. 158-162, 2010.
- [116] S. Gianfaldoni, R. Gianfaldoni, U. Woine, J. Otti, G. Tchernev and T. Lotti, "An Overview on Radiotherapy: From Its History to Its Current Applications in Dermatology," 2017.
- [117] C. Brown 1 , W. M. Robert 1 R. and Y. H. Michele, "Benefits, risks, and safety of external beam radiation therapy for breast cancer," *Int J Womens Health.*, vol. 7, p. 449– 458, 2015.

- [118] A. Taylor, "Powell MEB. Intensity-modulated radiotherapy—what is it?," *Cancer Imaging*, vol. 4, no. 2, pp. 68-73, 2004.
- [119] "Code of Practise for Radiotherapy Accelerators: Report of AAPM Radiation Therapy Task Group No.45 Med Phys.," American Association of Physicist in Medicine (AAPM), 1994.
- [120] F. M. Khan, *The Physics of radiation Therapy*, 3rd Edition, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2003, p. 20.
- [121] *Lessons Learned from Accidental Exposures in Radiotherapy*, Safety Reports Series No. 17, IAEA, Vienna: International Atomic Energy Authority, 2000.
- [122] *Review of Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*, Vols. ISBN 92-0-107304-6,, IAEA, Vienna: International Atomic Energy Authority, 2012.
- [123] R. Corns , K. Yang , M. Ross, S. Bhandari , M. Aryal and P. A. Ciaccio, "3D star shot to determine the gantry, collimator, and couch axes positions.," *J Appl Clin Med Phys.*, vol. 23, no. 7, p. e13623, 2022 Jul.
- [124] W. Du and S. Gao, "Measuring the wobble of radiation field centers during gantry rotation and collimator movement on a linear accelerator.," *Med Phys*, vol. 38, p. 4575–78, 2011.
- [125] Z. Xu 1,3, R. Yao 2,3, M. B. Podgorsak 1,3 and I. Z. Wanf, "Effects of collimator angle, couch angle, and starting phase on motion-tracking dynamic conformal arc therapy (4D DCAT).," *Radiation Oncology Physics J Appl Clin Med Phys*, vol. 18, no. 5, p. 54–63, 2017.
- [126] R. C. Lee , R. L. Feinbaum and V. Ambrost, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*," *Cell*, vol. 75, pp. 843-854, 1993.

- [127] A. Kozomara, M. Birgaoanu and S. Griffiths-Jones, "miRBase: from microRNA sequences to function," *Nucleic Acids Research*, vol. 47, no. Database issue D155-D162, Mar 2019.
- [128] P. D. Zamore and B. Haley, "Ribo-ome: the big world of small RNAs," *Science*, vol. 309, pp. 1519-1524, 2005.
- [129] T. A. Anderson, "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors," *Developmental Biology*, vol. 302, pp. 1-12.
- [130] F. Cellini, A. Morganti and D. Gorovesi et al., "Role of microRNA in response to ionizing radiations: evidences and potential impact on clinical practice for radiotherapy," *Molecules*, vol. 19, pp. 5379-5401, 2014.
- [131] A. M. Monteys, R. M. Spengler, J. Wan and L. Tecedor, "Structure and activity of putative intronic miRNA promoters," *RNA*, vol. 76, pp. 495-505, 2010.
- [132] L. C. Hinske, G. S. França, H. A. Torres and D. T. Oh, "miRlAD-integrating microRNA inter- and intragenic data," *Database J. Biol. Databases Curation*, vol. bau099, 2014.
- [133] B. Liu, Y. Shyr, J. Cai and Q. Liu, "Interplay between miRNAs and host genes and their role in cancer," *Briefings in Functional Genomics*, vol. 18, pp. 255-266, 2019.
- [134] A. F. Olena and J. G. Patton, "Genomic organization of microRNAs," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 222, pp. 540-545, 2010.
- [135] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim, "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II," *EMBO Journal*, vol. 23, pp. 4051-4060, 2004.
- [136] B. C. Schanen and X. Li, "Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes," *Genomics*, vol. 97, pp. 1-6, 2011.

- [137] J. Liu , T. Yang, Z. Huang, H. Chen and Y. Bai, "Transcriptional regulation of nuclear miRNAs in tumorigenesis (Review)," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 50, p. 92, 2022.
- [138] G. M. Borchert , W. Lanier and B. L. Davidson, "RNA polymerase III transcribes human microRNAs," *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 13, pp. 1097-1101, 2006.
- [139] J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin and V. N. Kim, "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing," *Genes & Development*, vol. 18, pp. 3016-3027, 2004.
- [140] B. M. Roth , D. Ishimaru and M. Hennig, "The core microprocessor component DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) is a nonspecific RNA-binding protein," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, pp. 26785-26799, 2013.
- [141] Y. Chen, L. L. Fu, X. Wen, B. Liu, J. Huang, J. H. Wang and Y. Q. Wei, "Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy," *Apoptosis*, vol. 19, no. 8, pp. 1177-1189, 2014.
- [142] M. Ha and V. N. Kim , "Regulation of microRNA biogenesis," *Nature*, vol. 509, pp. 509-524, 2014.
- [143] J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed and C. Peng, "Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation," *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, vol. 9, p. 402, 2018.
- [144] H. Y. Loh , B. P. Norman, K. S. Lai, N. Rahman, N. B. M. Aiithen and M. A. OSman, "The regulatory role of microRNAs in breast cancer," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, p. 4940, 2019.
- [145] M. Yoda, T. Kawamata, Z. Paroo, X. Ye, S. Iwasaki, Q. Liu and Y. Tomari, "ATP-dependent human RISC assembly pathways," *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 17, p. 173, 2010.

- [146] S. K. Pong and M. Gullerova, "Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes—Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins," *FEBS Letters*, vol. 592, pp. 2973-2986, 2018.
- [147] C. A. Melo and S. A. Melo , "Biogenesis and physiology of microRNAs," *Non-coding RNAs and Cancer*, pp. 5-24, 2013.
- [148] S. K. Mallanna and A. Rizzino, "Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells," *Developmental Biology*, vol. 344, pp. 16-25, 2010.
- [149] S. A. Melo and M. Esteller , "Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire," *FEBS Letters*, vol. 585, pp. 2087-2099, 2011.
- [150] D. P. Bartel, "MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions," *Cell*, vol. 136, pp. 215-233, 2009.
- [151] J. Liu, "Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 20, pp. 214-221, 2008.
- [152] V. Scaria ve ark., "Host-virus interaction: a new role for microRNAs," *Retrovirology*, vol. 3, p. 68, 2006.
- [153] K. B. Reddy, "MicroRNA (miRNA) in cancer," vol. 15, p. 38, 2015.
- [154] J. P. Bruce, A. B. Hui , W. Shi, B. Perez-Ordenez, I. Weinreb and W. Xu ve ark., "Identification of a microRNA signature associated with risk of distant metastasis in nasopharyngeal carcinoma," *Oncotarget*, vol. 6, pp. 4537-4550, 2015.
- [155] A. Esquela-Kerscher and F. J. Slack, "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 4, pp. 259-269, 2006.

- [156] J. Takamizawa, H. Konishi and K. Yanagisawa ve ark., "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival," *Cancer Research*, vol. 64, pp. 3753-3756, 2004.
- [157] H. He , K. Jazdzewski and W. Li ve ark., "The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 102, pp. 19075-19080, 2005.
- [158] X. Yu, Y. Zhang and F. Luo ve ark., "The role of microRNAs in the gastric cancer tumor microenvironment," *Mol Cancer.*, vol. 23, p. 170, 2024.
- [159] M. Z. Michael, S. M. O'Connor and N. G. Van Holst Pel, "Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia," *Molecular Cancer Research*, vol. 1, pp. 882-891, 2003.
- [160] J. M. Cummins and V. E. Velculescu, "Implications of microRNA profiling for cancer diagnosis," *Oncogene*, vol. 25, pp. 6220-6227, 2006.
- [161] H. Mollaei , R. Safaralizadeh and Z. Rostami, "MicroRNA replacement therapy in cancer," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 234, pp. 12369-12384, 2019.
- [162] Y. A. Fouad and C. Aanei, "Revisiting the hallmarks of cancer," *American Journal of Cancer Research*, vol. 7, pp. 1016-1036, 2017.
- [163] C. Moses, B. Garcia-Bloj, A. R. Harvey and P. Blancafort, "Hallmarks of cancer: The CRISPR generation," *European Journal of Cancer*, vol. 93, pp. 10-18, 2018.
- [164] M. Akram and S. A. Siddiqui, "Breast cancer management: past, present and evolving," *Indian Journal of Cancer*, vol. 49, no. 3, pp. 277-282, 2012.
- [165] I. M. I. M. Fatema ElAmrawy, Ahmed, N. Abdelraouf, K. Goda and S. Qhattal, "Breast cancer: Conventional diagnosis and treatment modalities

- and recent patents and technologies," *Breast Cancer (Auckland)*, vol. 9, no. Suppl. 2, pp. 17-34, 2015.
- [166] C. M. Furdai, "Ionizing radiation: Mechanisms and therapeutics," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 21, no. 2, 2014.
- [167] D. A. Jaffray and M. K. Gospodarowicz, "Radiation therapy for cancer," in *Cancer: Disease Control Priorities*, Third Edition ed., vol. 3, Washington, DC, The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, 2015.
- [168] H. Majeed and V. Gupta, "Adverse effects of radiation therapy," in *StatPearls [Internet]*, Treasure Island, StatPearls Publishing, 2024.
- [169] S. R. Mehta, M. V. Suhag, M. Semwal and M. N. Sharma, "Radiotherapy: Basic concepts and recent advances," *Medical Journal Armed Forces India*, vol. 66, pp. 158-162, 2010.
- [170] K. M. Prise and J. M. O'Sullivan, "Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy," *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, pp. 351-360, 2009.
- [171] W. L. W. L. Santivasi and F. Xia,, "The role and clinical significance of DNA damage response and repair pathways in primary brain tumors," *Cellular Bioscience*, vol. 3, p. 10, 2013.
- [172] F. Rödel and U. Gaipl, "Future prospects in radiation oncology from the perspective of innovative radiation biology," *Strahlentherapie und Onkologie*, vol. 199, no. 12, pp. 1077-1079, 2023 Dec..
- [173] M. Glazer and J. Czochove ark., "Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 49, no. 2, pp. 116-139, 2013.

- [174] M. A. Cortez , C. Bueso-Ramos and J. Ferdin ve ark., "MicroRNAs in body fluids - the mix of hormones and biomarkers.," *Nat Rev Clin Oncol.*, vol. 8, p. 467–477, 2011.
- [175] J. Meehan ve ark., "Precision medicine and the role of biomarkers of radiotherapy response in breast cancer," *Frontiers in Oncology*, vol. 10, no. Article 628, 2020.
- [176] A. J. Atkinson , W. A. Colburn, V. G. DeGruttola, D. L. DeMets, G. J. Dowling and D. F. Hoth, "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework," *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, vol. 69, pp. 89-95, 2001.
- [177] S. J. Mandrekar and D. J. Sargent, "Clinical trial designs for predictive biomarker validation: theoretical considerations and practical challenges," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, p. 4027–4034, 2009.
- [178] FDA-NIH Biomarker Working Group, BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource, Silver Spring: MD: Food and Drug Administration (US), 2016.
- [179] J. Bernier, "Precision medicine for early breast cancer radiotherapy: opening up new horizons?," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 113, pp. 79-82, 2017.
- [180] L. J. Forker, A. Choudhury and A. Kiltie, "Biomarkers of tumour radiosensitivity and predicting benefit from radiotherapy," *Clinical Oncology*, vol. 27, p. 561–569, 2015.
- [181] L. L. Y. Tan and M. L. K. Chua, "Discovering biomarkers of radioresistance in a radiosensitive cancer: a clinical paradox in nasopharyngeal carcinoma," *Annals of Translational Medicine*, vol. 8, no. 20, p. Article 1284, 2020 Oct.

- [182] V. K. Singh and H. B. Pollard, "Ionizing radiation-induced altered microRNA expression as biomarkers for assessing acute radiation injury," *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 17, no. 10, p. 871–874, 2017.
- [183] A. Chakraborty, D. J. Patton, B. F. Smith and P. Agarwal, "miRNAs: Potential as biomarkers and therapeutic targets for cancer," *Genes*, vol. 14, p. 1375, 2023.
- [184] S. Sethi, S. Ali, S. Sethi and F. H. Sarkar, "MicroRNAs in personalized cancer therapy," *Clinical Genetics*, vol. 86, p. 68–73, 2014.
- [185] J. Li ve ark., "The diverse oncogenic and tumor suppressor roles of microRNA-105 in cancer," *Frontiers in Oncology*, vol. 9, no. Article 518, 2019.
- [186] L. Tan ve ark., "Dynamically decreased miR-671-5p expression is associated with oncogenic transformation and radiochemoresistance in breast cancer," *Breast Cancer Research*, vol. 21, p. 89, 2019.
- [187] E. Korpela, D. Vesprini and S. K. Liu, "MicroRNA in radiotherapy: miRage or miRador?," *British Journal of Cancer*, vol. 112, no. 5, pp. 777-782, 2015 Mar.
- [188] M. G. Davey, M. Davies, A. J. Lowery, N. Miller and M. J. Kerin, "The role of microRNA as clinical biomarkers for breast cancer surgery and treatment," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 15, p. 8290, 2021 Aug.
- [189] A. Mahmoud, Z. Casciati, H. Zakaria, T. Hamzah, T. A. Tengku Ahmad and M. H. Mohd Noor, "The detection of DNA damage response in MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines after X-ray exposure," *Genome Integr.*, vol. 14, p. 1, 2023.

- [190] "Home - Geo - NCBI," National Center for Biotechnology Information," U.S. National Library of Medicine, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>. [Accessed 30 Nov 2024].
- [191] M. Ihlamur, K. Kelleci, M. Özkan and E. Ş. Abamor, "A herbal treatment method for breast cancer: antitumor effect of momordica charantia," *İstanbul Ticaret Univ J Sci*, vol. 23, pp. 144-155, 2024.
- [192] M. Ihlamur, H. Başarı, Y. Zengin and E. Ş. Abamor, "Evaluation of immunostimulant/cytotoxic activity of human breast cancer prepared by different antigen preparation methods with adjuvants combination," *Süleyman Demirel Univ Fac Arts Sci J Sci*, vol. 17, no. 96, p. 11, 2022.
- [193] J. Piñero,, N. Queralt-Rosinach and A. Gutiérrez-Sacristán ve ark., "DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, p. D833–D839.
- [194] E. W. Sayers ve ark., "Database resources of the national center for biotechnology information," *Nucleic Acids Res.*, vol. 50, p. D20–D26, 2022.
- [195] C. Backes ve ark., "miRPathDB: a new dictionary on microRNAs and target pathways," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, p. D90–D96, 2017.
- [196] H. Dweep, N. Gretz and C. Sticht", "miRWalk database for miRNA-target interactions," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1182, p. 289–305, 2014.
- [197] S. Griffiths-Jones, "miRBase: the microRNA sequence database," *Methods Mol. Biol.*, vol. 342, p. 129–138, 2006.
- [198] Y. Tang, Y. Cui, Z. Li, Z. Jiao, Y. Zhang and Y. He, "Radiation-induced miR-208a increases the proliferation and radioresistance by targeting p21 in human lung cancer cells," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 35, p. 20, 2016.

- [199] N. Cha, B. Jia, Y. He, W. Luan, W. Bao and X. Han, "MicroRNA-124 suppresses the invasion and proliferation of breast cancer cells by targeting TFAP4," *Oncol. Lett.*, vol. 21, p. 237, 2021.
- [200] C. Mayer, "A radiation-induced gene expression signature as a tool to predict acute radiotherapy-induced adverse side effects,," *Cancer Lett.*, vol. 302, no. 1, pp. 20-28, 2011 Mar.
- [201] D. Wu, "A cmap-enabled gene expression signature-matching approach identifies small-molecule inducers of accelerated cell senescence," *BMC Genomics*, vol. 20, no. 1, p. 290, 2019.
- [202] H. Mi, "Protocol update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0)," *Nature Protocols*, vol. 14, no. 3, pp. 703-721, 2019.
- [203] D. Szklarczyk ve ark., "The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest,," *Nucleic Acids Res.*, vol. 6, no. 51(D1), pp. D638-646., 2023 Jan.
- [204] A. Aboussekhra ve ark., "Ionizing radiation normalizes the features of active breast cancer stromal fibroblasts and suppresses their paracrine pro-carcinogenic effects," *Transl Oncol*, vol. 37, 2023.
- [205] E. Elin and J. Staffurth, "Principles of cancer treatment by radiotherapy,," *Surgery (Oxford)*, vol. 36, pp. 111-16, 2018.
- [206] C. Del Val ve ark., "Gene expression networks regulated by human personality.".
- [207] B. Małachowska ve ark., "Circulating microRNAs as biomarkers of radiation exposure: a systematic review and meta-analysis," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 106, p. 390–402, 2020.

- [208] Z. Nowicka, "Serum miRNA-based signature indicates radiation exposure and dose in humans:a multicenter diagnostic biomarker study," *Radiother Oncol*, vol. 185, 2023.
- [209] L. Nguyen ve ark., "The emerging role of miRNAs for the radiation treatment of pancreatic cancer," *Cancers (Basel)*, vol. 12, p. 3703, 2020.
- [210] S. Soares, "The influence of miRNAs on radiotherapy treatment in prostate cancer - a systematic review.," *Front Oncol.*, vol. 11, p. 2021.
- [211] G. P. Holmes-Hampton ve ark., "Time- and sex-dependent delayed effects of acute radiation exposure manifest via miRNA dysregulation," *IScience*, vol. 27, 2024.
- [212] G. Ignacio, X. F. Camarillo, S. Madhivanan, T. Salameh, M. Nichols and L. M. Reece, "Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: an in vitro model study," *Electroporation-Based Therapies for Cancer.*, vol. 55, no. 102, 2014.
- [213] C. K. Osborne , K. Hobbs and J. M. Trent , "Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories.," *Breast Cancer Res Treat.*, vol. 9, no. 2, pp. 111-21, 1987.
- [214] D. L. Holliday and V. Speirs , "Choosing the right cell line for breast cancer research.," *Breast Cancer Res.*, vol. 13, no. 4, p. 215, 2011 Aug.
- [215] A. Wawruszak ve ark., "Assessment of Interactions between Cisplatin and Two Histone Deacetylase Inhibitors in MCF7, T47D and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines-An Isobolographic Analysis," *PLoS One.*, vol. 10, no. 11, p. e0143013, 2015 Nov.
- [216] M. Gray, A. K. Turnbull and C. Ward ve ark., "Development and characterisation of acquired radioresistant breast cancer cell lines.," *Radiat Oncol*, vol. 14, no. 64, 2019.

- [217] S. Unkel, C. Belka and K. Lauber, "On the analysis of clonogenic survival data: Statistical alternatives to the linear-quadratic model," *Radiat Oncol.*, vol. 11, no. 11, 2016.
- [218] M. Labbé M ve ark., "microRNAs identified in prostate cancer: Correlative studies on response to ionizing radiation.," *Mol Cancer.*, vol. 19, no. 1, p. 63, 2020 Mar.
- [219] J. Ni , J. Bucci , L. Chang , D. Malouf, P. Graham and Y. Li, "Targeting MicroRNAs in Prostate Cancer Radiotherapy.," *Theranostics.*, vol. 23, no. 7(13), pp. 3243-3259, 2017 Jul.
- [220] A. M. Salama ve ark., "MicroRNA-208a: a Good Diagnostic Marker and a Predictor of no-Reflow in STEMI Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention.," *J. of Cardiovasc. Trans. Res.*, vol. 13, p. 988–995, 2020.
- [221] D. Han , X. Dong , D. Zheng and J. Nao , "MiR-124 and the Underlying Therapeutic Promise of Neurodegenerative Disorders," *Front Pharmacol.*, vol. 17, no. 10, p. 1555, 2020 Jan.
- [222] Y. Sun , Z. M. Luo , X. M. Guo , D. F. Su and X. Liu , "An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review.," *Front Cell Neurosci.*, vol. 20, no. 9, p. 193, 2015 May.
- [223] X. Deng ve ark., "miR-124 radiosensitizes human glioma cells by targeting CDK4.," *J Neurooncol.*, vol. 114, no. 3, pp. 263-74, 2013 Sep.
- [224] D. Jurkovicova ve ark., "DNA Damage Response in Cancer Therapy and Resistance: Challenges and Opportunities.," *Int J Mol Sci.*, vol. 23, no. 23, p. 14672, 2022 Nov.
- [225] K. Gourishetti ve ark., "MicroRNA (miR)-124: A Promising Therapeutic Gateway for Oncology.," *Biology (Basel).*, vol. 28, no. 12, p. 922, 2023 Jun.

- [226] X. Jia ve ark., "MicroRNA-124: An emerging therapeutic target in cancer.," *Cancer Med.*, vol. 8, no. 12, pp. 5638-5650, 2019 Sep.
- [227] R. Khoshbakht ve ark., "MicroRNA-124 inhibits cell proliferation and invasion by targeting SNAI1 in breast cancer," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 120, no. 6, pp. 10647-10655, 2019.
- [228] M. Chen , Z. Medarova and A. Moore , "A. Role of microRNAs in glioblastoma," *Oncotarget*, vol. 12, no. 17, pp. 1707-1723, 2021 Aug.
- [229] B. F. Song , L. Z. Xu, K. Jiang and F. Cheng , "MiR-124-3p inhibits tumor progression in prostate cancer by targeting EZH2.," *Funct Integr Genomics.*, vol. 8, no. 23(2), p. 80, 2023 Mar.
- [230] E. A. Braga ve ark., "Regulation of the Key Epithelial Cancer Suppressor miR-124 Function by Competing Endogenous RNAs.," *Int J Mol Sci.*, vol. 23, no. 21, p. 13620, 2022 Nov.
- [231] Y. Liu , Y. Yang and X. Wang ve ark., "Function of microRNA 124 in the pathogenesis of cancer (Review).," *International Journal of Oncology.*, vol. 64, no. 6, 2024.
- [232] C. Zhang, "MicroRNA-145 in vascular smooth muscle cell biology: a new therapeutic target for vascular disease.," *Cell Cycle*, vol. 8, no. 21, pp. 3469-73, 2009 Nov.
- [233] N. Cha ve ark., "MicroRNA 124 suppresses the invasion and proliferation of breast cancer cells by targeting TFAP4," *2021*, vol. 21, p. 271, Oncology Letters.
- [234] Y. Zhang ve ark., "miR-145 enhances radiosensitivity of prostate cancer cells by targeting RAD51," *Oncology Reports*, vol. 39, no. 5, pp. 2200-2208, 2018.

- [235] L. Yuan ve ark., "MicroRNA-145 regulates radiation-induced cell death and apoptosis in human lung cancer cells," *Cancer Letters*, vol. 339, no. 1, pp. 154-164, 2013.
- [236] H. Qin ve ark., "MicroRNA-145 sensitizes breast cancer cells to radiation through the regulation of the p53 pathway," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 13, no. 8, pp. 1971-1982, 2014.
- [237] H. Wang ve ark., "miR-145 promotes radiation-induced cell apoptosis by targeting Bcl-2 in nasopharyngeal carcinoma," *Cell Death & Disease*, vol. 8, no. 3, p. e2636, 2017.
- [238] J. Zhao ve ark., "miR-145 suppresses the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by targeting CCND1," *Oncology Reports*, vol. 32, no. 5, pp. 1946-1952, 2017.
- [239] M. Zhou ve ark., "MicroRNA-145 inhibits the proliferation and invasion of liver cancer cells by targeting the HGF/c-MET signaling pathway," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 233, no. 8, pp. 6110-6121, 2018.
- [240] M. Gao ve ark., "miR-145 sensitizes breast cancer to doxorubicin by targeting multidrug resistance-associated protein-1," *Oncotarget.*, vol. 13, no. 7(37), pp. 59714-59726, 2016 Sep.
- [241] T. v. ark., "MicroRNA-145 as a suppressor of breast cancer stemness," *Scientific Reports*, vol. 5, p. 17703, 2015.
- [242] Y. X. Shi ve ark., "Genome-scale analysis identifies NEK2, DLGAP5 and ECT2 as promising diagnostic and prognostic biomarkers in human lung cancer," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 8072, 2017.
- [243] D. Guha , A. Mancini , J. Sparks and V. Ayyavoo, "HIV-1 Infection Dysregulates Cell Cycle Regulatory Protein p21 in CT Cells Through miR-20a and miR-106b Regulation.," *J Cell Biochem*, vol. 117, no. 8, pp. 1902-12, 2016.

- [244] P. Maier ve ark., "Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization," *Int J Mol Sci.*, vol. 17, no. 1, p. 102, 2016.
- [245] Zhao ve ark., "GDF15 Contributes to Radioresistance by Mediating the EMT and Stemness of Breast Cancer Cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, p. 10911, 2022.
- [246] Sandor ve ark., "Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) is a potential marker of radiation response and radiation sensitivity, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis," vol. 793, pp. 142-149, 2015.
- [247] L. v. ark., "GDF-15 gene expression alterations in human lymphoblastoid cells and peripheral blood lymphocytes following exposure to ionizing radiation," *Molecular Medicine Reports*, vol. 15, pp. 3599-3606, 2017.
- [248] "FOS Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit [Homo sapiens (human)]," Gene NCBI. (n.d.), [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2353>.
- [249] "EGR1 early growth response 1 [Mus musculus (house mouse)]," Gene – NCBI. (n.d.), [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> .
- [250] P. v. ark., "Egr-1 regulates irradiation-induced autophagy through Atg4B to promote radioresistance in hepatocellular carcinoma cells, Citation: Oncogenesis," vol. 6, p. e292; , 2017.
- [251] "PHDLA3 pleckstrin homology like domain family A member 3 [Homo sapiens (human)]," Gene – NCBI. (n.d.). , [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23612>.
- [252] Chrtistigen ve ark., "IPH-926 lobular breast cancer cells harbor a p53 mutant with temperature-sensitive functional activity and allow for profiling of p53-responsive genes," vol. 92, no. 11, pp. 1635-1647, 2012.

- [253] "GADD45A growth arrest and DNA damage inducible alpha [Homo sapiens (human)]," Gene – NCBI. (n.d.). , [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1647>.
- [254] Pietrasik ve ark., "Interplay between BRCA1 and GADD45A and Its Potential for Nucleotide Excision Repair in Breast Cancer Pathogenesis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, p. 870, 2020.
- [255] Yu ve ark., "IER5 is involved in DNA Double-Strand Breaks Repair in Association with PAPR1 in Hela Cells," *Int J Med Sci.*, vol. 14, no. 12, pp. 1292-1300, 2017.
- [256] Liu ve ark., "IER5 as a promising predictive marker promotes irradiationinduced apoptosis in cervical cancer tissues from patients undergoing chemoradiotherapy," *Oncotarget*, vol. 8, no. 22, pp. 36438-36448, 2017.
- [257] Johannessen ve ark., "The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2," *Cell Mol Life Sci*, vol. 63, p. 268–284, 2006.
- [258] Martin ve ark., "FHL2 regulates cell cycle-dependent and doxorubicin-induced p21Cip1/ Waf1 expression in breast cancer cells," *Cell Cycle*, vol. 6, p. 1779–1788, 2007.
- [259] Wang ve ark., "c-Abl kinase regulates cell proliferation and ionizing radiation-induced G2/M arrest via phosphorylation of FHL2," *FEBS Open Bio*, vol. 11, p. 1731–1738, 2021.
- [260] A. Lambrechts , M. Van Troys and C. Ampe, "The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility," *Int J Biochem Cell Biol.*, vol. 36, pp. 1890-1909, 2004.
- [261] Biegging-Rolett ve ark., "Zmat3 Is a Key Splicing Regulator in the p53 Tumor Suppression Program," *Molecular Cell.*, vol. 80, no. 3, pp. 452-469.e9, 2020.

- [262] O. X. Li, N. Ke, R. Sundaram and F. Wong-Staal F., "NR4A1, 2, 3--an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis.," *Histol Histopathol.*, vol. 21, no. 5, pp. 533-40, 2006.
- [263] Karki ve ark., "NR4A1 Ligands as Potent Inhibitors of Breast Cancer Cell and Tumor Growth," *Cancer*, vol. 13, p. 2682, 2021.
- [264] "DUSP1 dual specificity phosphatase 1 [Homo sapiens (human)]," Gene NCBI. (n.d.), [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1843>.
- [265] R. Pulvertaft, C. Wilson and H. Jayne, "Effect on Lymphocytes of Ionizing Radiation," *Nature*, vol. 171, p. 1157–1158, 1953.
- [266] Brien ve ark., "FDXR is a biomarker of radiation exposure in vivo.," *Scientific Reports*, vol. 8, p. 684, 2018.
- [267] Sobolev ve ark., "A. Role of the Transcription Factor FOSL1 in Organ Development and Tumorigenesis.," *Int J Mol Sci.*, vol. 23, no. 3, p. 1521, 2022.
- [268] Cicatiello ve ark., "Estrogens and Progesterone Promote Persistent CCND1 Gene Activation during G1 by Inducing Transcriptional Derepression via c-Jun/c-Fos/Estrogen Receptor(Progesterone Receptor) Complex Assembly to a Distal Reg. Element of Cyclin D1 to Its Own Gene Promoter," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 16, pp. 7260-7274, 2004.
- [269] Rochette ve ark., "Insights Into Mechanisms of GDF15 and Receptor GFRAL: Therapeutic Targets, Trends in Endocrinology & Metabolism.," 2020.
- [270] Shajahan-Haq ve ark., "REGR1 regulates cellular metabolism and survival in endocrine resistant breast cancer.," *Oncotarget.*, vol. 8, no. 57, p. 96865–96884, 2017.

- [271] Cretu ve ark. , "Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer," *Cancer therapy*, vol. 7(A), p. 268–276, 2009.
- [272] Zhang ve ark., "GADD45A inhibits autophagy by regulating the interaction between BECN1 and PIK3C3," *Autophagy*, vol. 11, no. 12, pp. 2247-2258.
- [273] R. L. Montgomery, T. G. Hullinger and H. M. Semus, "Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure," *Circulation*, vol. 124, p. 1537–47, 2011.
- [274] Y. Qu ve ark., "Differentially expressed miR-127, miR-150, and miR-145 in serum extracellular vesicles are novel diagnostic biomarkers of unstable angina," *Cardiovasc Diagn Ther.*, vol. 13, p. 866–78., 2023.
- [275] X. B. Lv ve ark., "miR-124 suppresses multiple steps of breast cancer metastasis by targeting a cohort of pro-metastatic genes in vitro," *Chin J Cancer*, vol. 30, p. 821–30, 2011.
- [276] McClendon ve ark., "Biegling-Rolett, K., Kaiser, A. M., Morgens, D. W., Boutelle, A. M., Seoane, J., Van Nostrand, E. L., Zhu, C., Houlihan, S. L., Mello, S. S., Yee, B. A.,".

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

- [1] Girgin^{1,2}, M., Uğurel^{1,3}, M.O., Akgül¹, B., Nalbant⁴, N., Karaçetin⁴, D., Abamor¹, E.Ş., Turgut-Balik¹, D., Meme Kanseri Hücre Hatlarında İyonlaştırıcı Radyasyonun Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, 26-30 Ekim 2022, Çeşme-TÜRKİYE.
- [2] Girgin^{1,2}, M., Uğurel^{1,3}, Turgut-Balik¹, D., Meme kanseri hastalarında radyoterapi yan etkilerinin izlenmesi ve önlenmesi için moleküler düzeyde belirteçlerin biyoinformatik olarak tanımlanması, Tıbbi Profilaktikanın Aktual Problemleri mövzusunda Beynəlxalq Elmi Konfransı 26-29 Ekim 2023, Bakü, AZERBAIJAN.

Makaleler

- [1] Girgin, M., Akat, A., Akgül, B., Nalbant, N., Karaçetin, D., Abamor, E., Uğurel, O. & Turgut-Balik, D. (2024). An in vitro assessment of ionizing radiation impact on the efficacy of radiotherapy for breast cancer. Turkish Journal of Biochemistry. <https://doi.org/10.1515/tjb-2024-0172>.
- [2] Merve GIRGIN^{1,2}, Ayberk AKAT^{1,4}, Osman Mutluhan UĞUREL^{1,3*}, Dilek TURGUT-BALIK^{1*} Bioinformatic Analysis of Gene Expression Datasets to Identify Key Genes Associated with Radiotherapy in Breast Cancer Patients and Cell Lines, Biochemical Genetics (Hakem değerlendirmesinde).