

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AİLESEL ve SPORADİK OVER KANSERLİ HASTALARDA
miR-423-5p ve miR-664b-5p'NİN ARAŞTIRILMASI**

BÜŞRA KURT

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YAZICI**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
KANSER GENETİĞİ PROGRAMI**


İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**


İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Bilim Dalı Programında Yüksek Lisans öğrencisi Büşra KURT tarafından Prof.Dr.Hülya YAZICI'nın danışmanlığında hazırlanan "Ailesel ve Sporadik Over Kanseri Hastalarda miR423-5p ve miR664b-5p'nin Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 10/06/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı
Prof.Dr.Semra DEMOKAN
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri-Danışman
Prof.Dr.Hülya YAZICI
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Kanser Genetiği Bilim Dalı



Jüri Üyesi
Doç.Dr.Mera YÜKSEL
Marmara Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

BÜŞRA KURT

İTHAF

Canım annem Makbule KURT'a ve tüm aile üyelerime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz *Prof. Dr. Ahmet KİZİR*'e,

Değerli Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanımız, *Prof. Dr. Hatice Bilge BECERİR*'e,

Tez çalışmalarımın her aşamasında bana yön veren, yardım ve tavsiyelerde bulunan, tez danışmanım, çok değerli hocam *Prof. Dr. Hülya YAZICI*'ya,

Yüksek lisans programı süresince ders aldığım tüm hocalarıma,

Tez çalışmamızda kullanmak için sağlıklı örnek toplamamıza yardımcı olan İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Patoloji ve Biyokimya Bölümü'ne,

Temel Onkoloji Anabilim Dalımızda bulunan, özellikle Kanser Genetiği Bilim dalında görev yapan desteklerini esirgemeyen *Dr. Demet AKDENİZ*'e, tüm meslektaşlarım ve çalışma arkadaşlarıma,

Kanser Genetiği bölümünün bana kazandırdığı iki güzel dostum *Yasemin GİDER* ve *Arash ADAMNEJAD*'a,

Her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili ailem *Makbule KURT*, *Memet KURT*, *Muhammet Onur KURT*, *Nezahat AKDAŞOĞLU*'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:31200

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KADIN ÜREME ORGANLARI	3
2.1.1. Kadın Anatomisini Hangi Parçalar Oluşturur?	3
2.1.2. Overler	4
2.2. OVER KANSERİ GELİŞİMİ ve METASTAZI	5
2.2.1. OVER KANSERİNİN KLİNİK, HİSTOPATOLOJİK VE MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ.....	6
2.2.2. ETİYOLOJİ	7
2.2.3. EPİDEMİYOLOJİ	8
2.2.4. RİSK FAKTÖRLERİ.....	9
2.2.4.1. Genetik Olmayan Risk Faktörleri	9
2.2.4.2. Genetik Risk Faktörleri	10
2.3. MikroRNA ve KANSER	10
2.3.1. MikroRNA Biyogenezi	12
2.3.2. Prognozun belirleyicisi olarak MikroRNA'lar	13
2.3.3. Non-invaziv biyolojik belirteçler olarak MikroRNA'lar.....	14
2.4. miRNA 423-5p.....	14
2.5. miRNA 664b-5p.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16

3.1. Materyal	16
3.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	16
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar ile Bilgisayar programları	17
3.4. Kullanılan Cihazlar	18
3.5. Tam Kandan Lenfosit İzolasyonu	19
3.6. Lenfositten RNA İzolasyonu	20
3.6.1. RNA İzolasyon Protokolü	20
3.7. RNA'ların saflık ve konsantrasyon ölçümleri	20
3.8. Kalite Kontrol Verilerinin Değerlendirilmesi	21
3.9. ID3EAL miRNA qPCR Starter Kit protokolü	21
3.9.1. cDNA Sentezi	21
3.9.2. RT qPCR Reaksiyonu	21
3.10. Kantitatif Real Time PCR Reaksiyonu	22
3.11. qPCR ile Çoğaltılan miRNA Moleküllerinin Analizi	23
3.12. Δ CT ve $\Delta\Delta$ CT Değerlerinin Hesaplanması	23
3.13. İstatistiksel Analiz	24
4. BULGULAR	25
4.1. Hastaların BRCA Mutasyon Varlığı ile Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırması	26
4.2. Hasta ve Kontrol Grubundaki Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	27
4.3. miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Hastaların Klinik Özellikleri İle Karşılaştırılması	31
4.4. miRNA Ekspresyon Durumlarının Hastaların Aile Hikayelerine Göre Değerlendirilmesi	35
5. TARTIŞMA	38
KAYNAKLAR	42
HAM VERİLER	46
FORMLAR	47
ETİK KURUL KARARI	48
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	50
ÖZGEÇMİŞ	51

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Over Kanseri Alt tiplerinin Klinik, Histopatolojik ve Genetik Özellikleri ile Davranışları.....	7
Tablo 3-1: Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	17
Tablo 3-2: Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar ile Bilgisayar Programları	18
Tablo 3-3: Kullanılan Cihazlar ve İşlevleri	19
Tablo 3-4: Bazı Örneklere Ait Nanodrop Ölçüm Değerleri	21
Tablo 3-5: Mic qPCR çalışma döngüsü	22
Tablo 4-1: ANOVA Sonuçları. *,istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$)	26
Tablo 4-2: BRCA durumları ile Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişki.....	27
Tablo 4-3: miR-423-5p ve miR-664b-5p ekspresyon durumlarının over kanseri ve over kanserli hastaların alt grupları arasındaki ilişkisi.....	30
Tablo 4-4: miR-423-5p ve miR-664b-5p ekspresyon durumlarının klinik ve patolojik özellikler ile karşılaştırılması.....	35
Tablo 4-5: miR-423-5p ve miR-664b-5p ekspresyon durumlarının aile hikayesi ile ilişkisi.....	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kadın Üreme Sistemi (uterus, endometriyum, fallop tüpleri, overler, serviks, miyometriyum, vajina) [11]	3
Şekil 2-2: MikroRNA'ların kanserin klinik yönetimindeki etkisi [30].	11
Şekil 2-3: miRNA biyogenezinin ve miR-RISC aktivitesinin şematik gösterimi [34]... ..	13
Şekil 2-4: miRNA 664b-5p'nin genomik lokasyonu [53]	15
Şekil 3-1: Mic qPCR cihazı ve kendine özgü tüplerinin görünümü	22
Şekil 3-2: miR-423-5p ekspresyonunun incelendiği örneklerin gerçek zamanlı PCR eğrileri görünümü	23
Şekil 3-3: miR-423-5p'nin ekspresyonunun incelendiği örneklerin erime eğrileri görüntüsü	23
Şekil 4-1: miR-423-5p ekspresyon düzeyinin over kanseri ve over kanserli hastaların alt gruplarındaki dağılımları.	28
Şekil 4-2: miR-664b-5p ekspresyon düzeyinin over kanseri ve over kanserli hastaların alt gruplarındaki dağılımları	29

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Kısaltmalar

Ark: Arkadaşları

ARID1A: AT-Rich Interaction Domain 1A

BRCA1: Breast Cancer 1

BRCA2: Breast Cancer 2

BCL2: B-cell lymphoma 2

BRAF: V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

CA125: Kanser Antijen-125

CCNE2: Cyclin E2

cDNA: Complementary DNA

CGC: Cumulus Granulosa Cells

CT: Threshold Cycle

CTNNB1: Cadherin-associated protein beta 1

DNA: Deoksiribonükleik asit

ERBB2: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2

EMT: Epitelyal Mezenkimal Transformasyon

g: gram

kDa: Kilo Dalton

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi

KML: Kronik Miyeloid Lösemi

KRAS: Kirsten-rous avian sarcoma

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

μ L: Mikrolitre

mL: Mililitre

mRNA: Mesajcı RNA

miRNA: MikroRNA

ng: nanogram

NGS: Next Generation Sequencing

Notch3: Neurogenic locus notch homolog protein 3

Ort.: Ortalama

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCOS: Polycystic Ovary Syndrome

PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

Pri-miRNA: Primer mikroRNA

Pre-miRNA: Prekürsör mikroRNA

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PPP2R1A: Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Aalpha

RISC: RNA-induced silencing Complex

RNA: Ribonükleikasit

TFF1: Targeting Trefoil Factor 1

TP53: Tumor Protein 53

HGSC: High-grad serous carcinoma

CCC: Clear Cell Carcinoma

ncRNA: small non-coding RNA

PRKRA: Protein kinase,interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A

SRRP1: S1 RNA-binding Ribosomal Protein 1

SMAD4: SMAD family member 4, Mothers against decapentaplegic homolog 4

XPO5: Exportin 5

ÖZET

KURT, B. (2019). Ailesel ve Sporadik Over Kanserli Hastalarda miR-423-5p ve miR-664b-5p'nin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

MikroRNA'lar(miRNA'lar),yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda,endojen, kodlamayan,tek sarmallı RNA molekülleridir.Over kanseri,linik ve moleküler düzeyde farklı biyolojik davranışları içeren heterojen bir hastalıktır.miRNA'lar overde ekspresyona uğrayarak üremenin düzenlenmesinde,over kanserinin erken teşhisi,prognozu ve kemoterapi duyarlılığında rol oynamaktadır.Çalışmada,önceki çalışmalarımızda over kanseri etiyojoloji açısından önemli olduğu saptanan miRNA'lar arasından seçilen,miR-423-5p ile miR-664b-5p adlı 2 miRNA'nın ekspresyon düzeyi ailesel ve sporadik over kanserli hastalar ve sağlıklı kişilerin periferik kanında araştırıldı.RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan ekspresyon analizleri SPSS v21.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.Sonuçlara göre;sağlıklı kontroller ile over kanserli hasta grupları arasında her 2 miRNA için de istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu saptandı(p=0,000).Over kanserli hastalarda kontrol grubuna göre miR-423-5p ekspresyonunun 2,35 kat,miR-664b-5p'nin ise 2,47 kat arttığı görüldü.Literatürde,over kanseri hariç birçok kanser türünde ve farklı hastalık aşamalarında aşırı eksprese edildiği bildirilmiş miR-423-5p'nin tez çalışmamız ile ilk kez over kanser vakalarına ait periferik dolaşımdaki lenfositlerde artmış olduğu gösterilmiştir.Genelde,over kanserli hasta grubunda miR-664b-5p'nin ifade düzeyinin yükseldiği ancak over kanserli vakalar arasında BRCA mutasyon taşıyıcılarının %60'ında azalmış olduğu saptanmıştır.Her 2 miRNA molekülünün ekspresyonunun over kanser alt grupları arasında over kanseri ile beraber endometriyum kanserini 2.primer olarak taşıyan hastalarda azalması,buna karşılık over kanserine ek olarak meme ve endometriyum hariç,farklı bir ikincil kanser tanısı almış hastalarda da en yüksek düzeyde görülmesi bu 2 molekülün üzerinde ileri araştırmalar yapılması gerektiğini düşündürmektedir.Her 2 miRNA molekülün ekspresyon artışının over kanseri ile ilişkili olduğu,azalışının da endometriyum kanseri için bir özellik olabileceği düşünülmektedir.Özetle,bu çalışmadaki miRNA moleküllerinin over kanseri için non-invaziv biyolojik belirteç olma potansiyeli olduğu anlaşılmış olup,bu moleküllerin gelecekteki çalışmalarda tümör dokusu üzerinde ve tedavi süresince değişimlerinin gösterilmesi yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Over Kanseri, *BRCA1/2* genleri, miRNA, biyolojik belirteç, periferik kan

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 31200

ABSTRACT

KURT, B. (2019). Investigation of miR-423-5p and miR-664b-5p in Patients with Familial and Sporadic Ovarian Cancer. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology. Master Thesis. Istanbul.

MicroRNAs(miRNAs) are endogenous,non-coding,single-stranded RNA molecules about 22 nucleotides in length.Ovarian cancer is a heterogeneous disease with different biological behaviors at clinical and molecular levels.miRNAs are overexpressed and play roles in the regulation of mammalian growth,early diagnosis of ovarian cancer,prognosis and chemotherapy sensitivity.In our study,the expression levels of miR-423-5p and miR-664b-5p,which are selected from the earlier studies and found to be important for the etiology of ovarian cancer,were investigated in the peripheral blood of familial and sporadic ovarian cancer patients and healthy individuals.Expression analyzes by using Real Time PCR technique,were evaluated statistically with SPSS v21.0 program.According to these results;there was a statistically significant difference between healthy controls and ovarian cancer groups for both miRNAs($p=0,000$).In patients with ovarian cancer,the expression of miR-423-5p increased by 2.35 times and the expression of miR-664b-5p increased by 2.47 times compared to the control group.In the literature,it has been reported that miR-423-5p has been shown to be overexpressed in many cancer types and different disease stages except ovarian cancer.In our thesis,it has been shown for the 1st time in the peripheral circulating lymphocytes of ovarian cancer cases.Generally,in the group of ovarian cancer miR-664b-5p expression level was increased but it was found to be decreased in 60% of BRCA mutation carriers among cases with ovarian cancer. In addition,it is understood that these miRNA molecules have the potential to be a non-invasive biomarker for ovarian cancer and it is useful to show the changes of these molecules in future studies,on tumor tissue and during treatment.

Key Words: Ovarian Cancer, *BRCA1/2* genes, miRNA, biomarkers

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 31200

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikro RNA'lar (miRNA'lar), yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, endojen, küçük, kodlamayan, tek sarmallı RNA molekülleridir. miRNA'lar, hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptosis, hormon biyosentezi ve sekresyonu dahil olmak üzere çeşitli önemli hücrel fizyolojik ve patolojik süreçlerin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol oynamaktadır [1]. miRNA'ların hücrel gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede düzenlediği düşünülmektedir [2]. Çeşitli kanserlerde bazı miRNA'ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör ilerlemesi, metastazı ve invazyonunda miRNA'ların düzenleyici olduğunu göstermektedir [3, 4].

Protein kodlayan onkogen ve/veya tümör baskılayıcı genlerdeki değişimlerin kansere neden olduğu bilinmektedir. Son yıllarda tümör oluşumunda miRNA'ların da etkili olduğunun gösterilmesi ile kanserin genetik nedenlerinin daha karmaşık olduğu bildirilmiştir [5]. Kanserle ilişkilendirilmiş genomik alanlar ya da fragil bölgelerin %50'sinden fazlasının miRNA'yı kodlayan genlerden oluşması miRNA'ların kanser patojenezinde önemli olduğunu ortaya koymuştur [6].

miRNA genleri ve kanser arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışma Calin ve ark.[7] tarafından yapılmıştır. KLL hastaları ile yapılan çalışmada, hastaların yarısından fazlasında görülen 13q14 delesyonundan daha önce düşünüldüğü gibi bir tümör baskılayıcı geni hedeflemek yerine miR-15 ve miR-16 genlerinin sorumlu olabileceğini göstermişlerdir.

Over kanseri dünyada en yaygın yedinci malignitedir [8]. miRNA'lar overde ekspresyona uğrar ve memeli üremesinin düzenlenmesinde rol oynar. miRNA'lar, over kanserinin erken teşhisi, prognozu ve kemoterapi duyarlılığında önemli rol oynamaktadır [1]. Song ve ark. yaptıkları çalışmada miR-664b-5p'nin bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğünü ve aşırı ekspresyonunun hücre büyümesini, göçünü ve invazyonu baskıladığını keşfetmiştir [9].

İnsan kümülüs granüloza hücrelerinde (CGC'ler) bulunan miRNA profilini tanımlarken, Xu ve arkadaşları, let-7 familyasının hem polikistik over sendromu (PCOS) hastalarında hem de normal kadınlarda en fazla bulunan miRNA olduğunu gösterdi [10]. Sağlıklı kadınlar ile karşılaştırıldığında, miR-10a-5p, miR-1307-3p, **miR-423-5p**, miR-1273 g-3p, miR-199a-3p, miR-185-5p ve miR-483-5p polikistik over

sendromlu hastaların CGC'lerinde upregüle edilmekte ve miR-483-5p, Notch3 ve MAPK3 mRNA'sının 3'-UTR'lerini doğrudan bağlayarak Notch3'ü ve insan CGC'lerindeki mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz 3'ü (MAPK3) baskılamaktadır.

Planlanan tez çalışmasında grubumuz tarafından daha önce yüksek riskli over kanserli bir ailede yapılan doktora tez çalışmasında saptanan ve over kanseri etiyojji açısından önemli olduğu gösterilen ancak literatürde over kanseri ile henüz ilişkilendirilmemiş ve hakkında çok az bilgi bulunan miR-664b-5p ve miR-423-5p isimli iki miRNA molekülünün 150 ailesel ve sporadik over kanserli vaka ile 100 sağlıklı kişiden oluşan yaş, cinsiyet ve etnik olarak eşleştirilmiş popülasyon kontrollerde ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu inceleme ile söz konusu miRNA'ların bir yandan over kanseri etiyojji, tanısı ve diyagnozundaki yeri araştırılırken bir yandan da validasyonlarının yapılması ve over kanserindeki dağılımlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

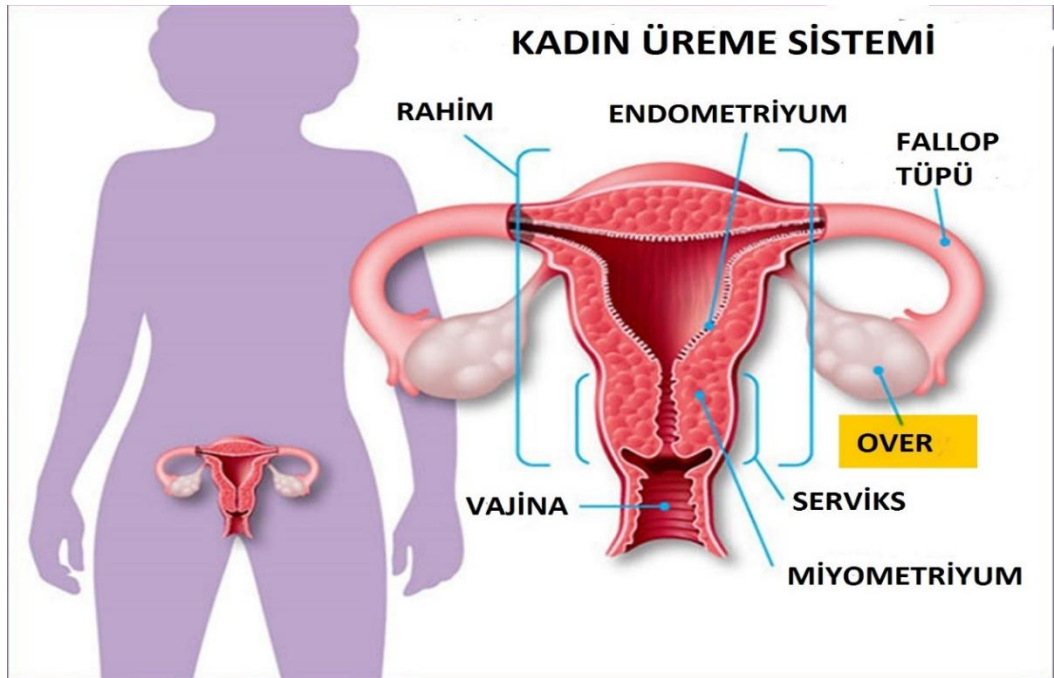
2.1. KADIN ÜREME ORGANLARI

Kadın üreme sistemi, çeşitli işlevleri yerine getirmek için tasarlanmıştır. Ova veya oosit denilen üreme için gerekli dişi yumurta hücrelerini üretir. Sistem, ovayı dölleme alanına taşımak için tasarlanmıştır. Bir sperm tarafından yumurtanın döllenişi, normal olarak fallop tüplerinde görülür. Dölleniş yumurta için bir sonraki adım, hamileliğin ilk aşamalarına başlayarak rahmin duvarlarına yapışmaktır. Fertilizasyon gerçekleşmezse, sistem menstruasyona (uterus astarının aylık dökülmesi) göre tasarlanmıştır. Ayrıca, dişi üreme sistemi, üreme döngüsünü sürdüren kadın seks hormonları üretir.

2.1.1. Kadın Anatomisini Hangi Parçalar Oluşturur?

Kadın üreme anatomisi, vücut içindeki ve dışındaki kısımları içerir. Dış kadın üreme yapılarının (cinsel organlar) işlevi iki yönlüdür: Spermin vücuda girmesini ve iç genital organların enfeksiyöz organizmalardan korunmasını sağlar.

Kadın iç üreme organları şunları içerir: vajina, uterus, overler ve fallop tüpleri. Overler, uterusun her iki tarafında bulunan küçük, oval şekilli bezlerdir.



Şekil 2-1: Kadın Üreme Sistemi (uterus, endometriyum, fallop tüpleri, overler, serviks, miyometriyum, vajina) [11]

2.1.2. Overler

Overler, her bir adet döngüsünün orta noktasında dişi üreme sistemine yumurta (oosit) üretir ve salgılar. Ayrıca dişi hormonları östrojen ve progesteron üretirler. Overler kadın üreme sisteminin bir parçasını oluşturur. Her kadının iki overi vardır. Ovarian fossa olarak bilinen bölgede pelvisin duvarına karşı dört santimetre uzunluğunda ve rahmin iki yanında (uterus) yer alan oval şekillidirler. Bunlar, rahime bağlanmış olan ligamentler ile yerinde tutulur, ancak doğrudan dişi üreme yolunun geri kalanına bağlanmaz, örn. fallop tüpleri.

Overlerin işlevi, hipotalamustaki sinir hücrelerinden salınan gonadotropin salgılatıcı hormon tarafından kontrol edilir ve bu da luteinize edici hormon ve folikül uyarıcı hormon üretmek için hipofiz bezine sinyaller gönderir. Bunlar adet döngüsünü kontrol etmek için kan dolaşımında taşınır. Overlerin, her adet döngüsünün orta noktasında bir yumurta (oosit) salgılar. Genellikle, her yumurtlama döneminde bir overden tek bir oosit çıkarılır. Dişi bir bebek, sahip olabileceği tüm yumurtalarla doğar. Bunun iki milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir, ancak bir kız ergenliğe ulaştığında, bu sayı overlerinde depolanan yaklaşık 400.000 yumurtaya düşmüştür. Ergenlikten menopoza kadar, sadece 400-500 yumurta olgunluğa ulaşacak, yumurtalıktan (yumurtlama adı verilen bir süreçte) serbest bırakılacak ve dişi üreme sisteminin fallop tüpleri / uterus tüpü / overlerinde dölleyebilecektir.

Overlerin salgıladığı başlıca hormonlar, menstrüel siklustaki önemli hormonlar olan östrojen ve progesterondur. Östrojen üretimi, yumurtlama öncesi adet döngüsünün ilk yarısında baskındır ve progesteron üretimi corpus luteumun olduğu zaman adet döngüsünün ikinci yarısında baskındır. Her iki hormon da hamilelik için rahim astarının hazırlanması ve döllenen yumurtanın veya embriyonun implantasyonunda önemlidir.

Overlerin düzgün şekilde çalışmasını engelleyen herhangi bir tıbbi durum, bir kadının doğurganlığını azaltabilir. Overler, menopoz döneminde doğal olarak çalışmayı bırakır. Bu, 50 yaş civarında kadınların çoğunda görülür. Eğer daha erken yaşta olursa, 40 yaşından önce, erken yumurtalık yetmezliği ya da erken yumurtalık kaybı olarak adlandırılır.

Overlerin en sık görülen rahatsızlığı, üreme çağındaki kadınların %5-10'unu etkileyen polikistik over sendromudur. Polikistik bir overde, foliküller belli bir aşamaya kadar olgunlaşır, ancak büyümeyi durdurur ve bir yumurtayı serbest bırakmazlar.

Bu foliküller, bir ultrason taramasında overlerde kist olarak görünür. Turner sendromu gibi overlerin normal gelişiminde bir kayba neden olan herhangi bir anormallik, overlerin düzgün çalışmamasına ve kadının doğurganlığının kaybına neden olabilir. Over, özellikle kanser tedavisinde kemoterapi veya radyoterapi gibi diğer durumlarda zarar görebilir [1].

2.2. OVER KANSERİ GELİŞİMİ ve METASTAZI

Over kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık görülen 7. kanser olup, meme ve serviks kanseri sonrası en yaygın üçüncü kadın kanseridir ve insidansı 100.000'de 10-15'dir. Ayrıca dünya çapında kadınlarda en ölümcül olan 5. kanserdir [12].

Batı ülkelerinde ölüm oranları düşmektedir, ancak bu durum, örneğin kontraseptif kullanımı ve postmenopozal hormon replasman tedavilerinin daha iyi tedavi seçeneklerinden daha az kullanılması gibi yaşam tarzı değişikliklerinden kaynaklanan insidans oranlarının düşmesi nedeniyle daha olasıdır [13].

Tam tersine, Batı Avrupa ülkelerindeki over kanseri için 5 yıllık standart sağkalım oranları standardize edilmiş %30.3'ten %44.1'e çıkmıştır ve bunlar son 20 yılda önemli ölçüde artmamıştır [14, 15].

Kötü sağkalım oranı, hastalığın genellikle geç bir aşamada teşhis edilmesi ile ilgilidir, çünkü periton boşluğunda kanser hücrelerinin gelişimi uzun bir süre boyunca belirti ve semptom göstermez. Diğer bir neden ise, birçok hastanın primer tedaviden sonra klinik olarak tam bir remisyona ulaşmasına rağmen, hastalığın çoğu hastada yinelemesidir. Daha fazla tedavi yöntemi ile, tüm hastalarda, daha kısa süreli remisyon veya stabil hastalık dönemlerine yol açan çoklu ilaç direnci gelişir ve sonuçta ölümle sonuçlanır. Bu tedavi direncine yönelik pek çok açıklama mevcuttur: sitotoksik ilaçların çıkarılmasına veya inaktivasyonuna yol açan genetik ve epigenetik mutasyonlar, bozulmuş apoptoz onarım mekanizmaları ve bağışıklık sisteminin inhibisyonuna yol açan mikro ortamın hepsi bu hastalığın kötü prognozuna katkıda bulunur.

2.2.1. OVER KANSERİNİN KLİNİK, HİSTOPATOLOJİK VE MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ

Over kanseri, klinik ve moleküler düzeyde farklı biyolojik davranışları içeren heterojen bir hastalıktır. Over kanserlerinin %90'ından fazlası epiteldir, yaklaşık %10'u ise germ hücreleri veya granüloza-teka hücrelerinden gelişir. Epitelyal tümörler over yüzey epitelinden ortaya çıkabilir, ancak aynı zamanda fallop tüpünden, endometriozis odaklarından veya peritondan da ortaya çıkabilir [16]. Dört ana histotip, epitelyal over kanserini karakterize eder: seröz, endometrioid, müsin ve berrak hücre. İlginç bir şekilde, her histotip, normal dokulardaki morfolojik benzerleriyle ilişkili gen ekspresyon modellerini gösterir. Özellikle seröz tümörlerde meydana gelen değişiklikler normal fallop tüpündekilerle ilişkilidir. Müsin kanserleri normal kolon mukozasındakilerle koreledir. Hem endometrioid hem de berrak hücreli histotiplerin ise normal endometriyumdaki değişikliklerle korele olduğu gözlemlenmektedir [17].

Moleküler seviyede sporadik over kanseri, birkaç genin modülasyonuna bağlı geniş genetik kararsızlık ile karakterize edilir. Klinik ve moleküler genetik anomalilere göre, over kanseri iki farklı tipte sınıflandırılabilir (**Tablo 2-1**). Tip I tümörleri düşük dereceli seröz karsinomları, düşük malign potansiyelli (borderline) seröz tümörleri, düşük dereceli endometrioid, müsin ve saydam hücreli karsinomları içerir. Bu tür tümörler genellikle genetik olarak stabildir ve en sık görülen mutasyonlar *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *PTEN*, *PIK3CA*, *b-katenin geni (CTNNB1)*, *ARID1A* ve *PPP2R1A*'yı içerir. Öte yandan, tip II over kanserleri, yüksek dereceli seröz karsinomları, karsinosarkomları ve farklılaşmamış kanserleri içerir. Tüm epitelyal tümörlerin neredeyse %70'ini oluşturan Tip II tümörler agresif olup ileri evrelerde mevcuttur. Yüksek genomik instabilite sergilerler ve hastaların %95'inde mutasyona uğrayan gen *TP53*'tür. Ayrıca, bu tip bir tümör *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyon taşıyıcıları ile karakterizedir ve çoğunlukla seröz tubal intraepitelyal karsinomdan kaynaklanır [18].

	TİP 1	TİP 2
Prevalans	Yaklaşık %30	Yaklaşık %70
Histotip	Seröz, endometrioid, müsinöz, berrak hücreli karsinoma	yüksek dereceli seröz karsinomlar, karsinosarkomlar, farklılaşmamış tümörler
Grad	Düşük, düşük malign potansiyelli (borderline)	Yüksek
Mutasyon	<i>KRAS, BRAF, ERBB2, PTEN, PIK3CA, b-katenin geni (CTNNB1), ARID1A, PPP2RIA</i> ve mikrosatellit instabilitesi	<i>TP53, BRCA1/2</i>
Klinik	Tipik olarak overle sınırlı büyük, kistik kitle, göreceli olarak hafif seyirli	İleri evrelerde teşhis ve agresif davranış

Tablo 2-1: Over Kanseri Alt tiplerinin Klinik, Histopatolojik ve Genetik Özellikleri ile Davranışları

2.2.2. ETİYOLOJİ

Over kanserinin etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Epidemiyoloji çalışmaları, oral kontraseptiflerin koruyucu bir rol oynadığını gösterirken, BRCA 1 ve 2 tümör süpresör genlerindeki mutasyonlar, nulliparite ve ovulasyon indükleyici ajanlar gibi kanıtlanmış genetik yatkınlıkların yanı sıra over kanseri gelişme olasılığını arttırmaktadır. Hormonal etkilerle ilişkili ovulasyon çok önemli bir rol oynayabilir, bununla birlikte infertil bir durumdan mı yoksa yumurtlama uyarıcı ajanların kullanımından mı kaynaklandığı tartışmaları hala devam etmektedir [19, 20].

İki teori hipotez edilmiştir: Birincisi over yüzey epiteli ile ilgilidir. Bu epitel yapısı, küboidal hücrelerden oluşan ve overleri örten pelvik mezoteldir.

Yumurtlama sırasında bu epitel yüzeyin tekrarlanan rüptürü, iltihaplı sitokinlere eşlik eden maruziyet ve epitelyal mezenkimal transformasyona (EMT) yol açan müteakip tamir, kansere yol açan genetik değişikliklere neden olabilir. İkinci teori ise, over kanserinin fallop tüplerinden geliştiği ile ilgilidir.

Her iki teori birlikte düşünüldüğünde, borderline grade tümörler, düşük dereceli seröz ve endometrioid karsinom gibi düşük dereceli over kanserleri kortikal inklüzyon kist lezyonlarından kaynaklanırken, yüksek dereceli seröz karsinomun fallop tüpünün salgı hücrelerinden ve özellikle fimbriyalardan muhtemelen yumurtlamanın neden olduğu iltihaplı uyarılarla indüklenebileceği ileri sürülmektedir. Fallop tüpünden sekretuar hücrelerin kültürlenmesi artık mümkün olduğundan daha fazla teori gelişmiştir.

Genel olarak, tekrarlanan hücre bölünmelerinin kanser hücrelerinin gelişmesine neden olan mutasyonlara yol açtığı yaygın olarak kabul edilmektedir. Bu değişikliklerin somatik kök hücrelerde veya normal fakat daha farklılaşmış epitel hücrelerinde gerçekleşmesi gerekip gerekmediği açık değildir [21].

Over tümörü etiyolojisinin ve kemoterapisinin temel biyolojisini daha iyi anlamak, moleküler hedefli tedavilerin gelişmesine yol açmıştır. Çoklu kritik kanser özelliklerini hedef alan birçok küçük molekülü inhibitör ve monoklonal antikorlar klinik uygulamalara girmiştir. Bununla birlikte, over kanserinin teşhis ve tedavi sürecine yardımcı olmak için yeni ve daha iyi biyolojik belirteçler ile terapötiklerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır [22]. Son dekatta tanımlanan miRNA'ların over kanserinin etiyolojisinde, tedavisinde ve tedavinin izlenmesi süreçlerinde önemli rolleri olduğu ve her aşamada farklı amaçla bu moleküllerin kullanılabileceği düşünülmektedir.

2.2.3. EPİDEMİYOLOJİ

Küresel olarak, her yıl 240.000 kadına over kanseri teşhisi konulmakta ve beş yıllık sağkalımın %45'in altında olduğu görülmektedir. Over kanseri yıllık 150.000 ölümden sorumludur ve bu durum kadınlar arasında over kanserini en yaygın 7. kanser yaparken en yaygın 8. ölüm nedeni olarak göstermektedir.

Over kanserinin yaşa göre standardize edilmiş insidans oranları Kuzey ve Orta / Doğu Avrupa'da en yüksek, Kuzey Amerika, Avustralya ve Batı Avrupa'da orta, Asya ve Afrika'da en düşüktür [23].

Over kanseri görülme oranları, ülkelerdeki etnik kökene göre de değişmektedir. ABD'de, Latin kökenli beyaz olmayan kadınlarda over kanseri görülme oranı, Afrika kökenli Amerikalı ve Asyalı kadınlardan yaklaşık %30 ve İspanyol kadınlardan %12 daha yüksektir [24].

Over kanseri 40 yaşın altındaki kadınlarda nadirdir ve bu yaş grubundaki kanserlerin çoğu germ hücreli tümörlerdir. 40 yaşın üstünde, %90'dan fazlası epitelyal tümörlerdir ve risk yaşla birlikte artar, 70'lerin sonunda zirveye çıkar. Over olarak sınıflandırılmasına rağmen, artık yüksek dereceli seröz kanserlerin yüksek bir oranının fallop tüpünden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Epidemiyolojik araştırmalar, over kanserinin patogeneğinde hormonal ve üreme faktörlerinin etkisinin olduğunu göstermiştir.

2.2.4. RİSK FAKTÖRLERİ

Risk faktörleri ikiye ayrılır; genetik olmayan risk faktörleri ve genetik risk faktörleri.

2.2.4.1. Genetik Olmayan Risk Faktörleri

Epitelyal over kanserleri için bilinen genetik olmayan risk faktörleri yaş, menopoz sonrası hormon tedavisi (özellikle beş yıldan fazla kullanım), obezite veya kilo alımıdır.

Diyet, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, perineal talk pudrası maruziyeti ve sigara kullanımı gibi faktörlerin etkisi tartışmalı iken infertilite ilaç tedavisinin etkisi ise belirsizdir.

Menarşta erken yaş, over kanseri için belirlenmiş bir risk faktörüdür, ancak over kanseri insidansı üzerindeki etkisi daha azdır, premenopozda rolü ise daha güçlüdür. Çeşitli çalışmalar menopozda ileri yaş ile over kanseri riski arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermiştir. Ömür boyu süren adet döngüsü sayısı da over kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir, bu da yumurtlamanın over karsinogenez sürecinde yer aldığını,

ancak parite ve oral kontraseptiflerin katkısının diğer faktörlerden daha fazla olduğunu göstermektedir.

Uzun süreli oral kontraseptif kullanımı (dört yıl veya daha fazla), BRCA mutasyon taşıyıcılarında over kanseri riskini yaklaşık %50 azaltır.

Nulliparite ve düşük parite, over kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir. Çoğu çalışma hamilelik sayısı ve süresinin over kanser riskini azalttığını ortaya koymuştur. Çok çocuklu kadınlarda (multiparous women) over kanser riski %50 oranında düşüktür.

Emzirme her 5 aylık artış için tahmin edilen% 8'lik bir düşüşle ve yine yumurtlama hipotezi ile uyumlu olarak, yumurtalık kanseriyle ters orantılı olmuştur.

2.2.4.2. Genetik Risk Faktörleri

Ailesel genetik sendromlar, over kanserlerinin yaklaşık %10 ila %12'sini oluşturur ve bilinen en güçlü risk faktörlerindedir. BRCA gen mutasyonları, over kanseri vakalarının yaklaşık %10'unda, kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser (Lynch sendromu) ise vakaların %2 ila %3'ünde yer almaktadır.

BRCA1 / *BRCA2* tümör baskılayıcı gen mutasyonları, 300 ila 800 kadından birini etkileyen kalıtsal over ve meme kanseri sendromunun nedenidir, ancak prevalans Aşkenazi Yahudileri arasında 50'den fazla olabilir.

Over veya meme kanseri geçmişi olan ailelerde, BRCA mutasyonları over kanseri vakalarının yaklaşık %90'ından sorumludur. Tahmini yaşam boyu over kanseri riski, *BRCA1* mutasyon taşıyıcılarında %40 ve *BRCA2* mutasyon taşıyıcılarında %18'dir.

Eksik penetrasyon nedeniyle, BRCA taşıyıcılarının %35 ila %85'i over kanseri, %20 ila %30'u ise meme kanseri geliştirmez [25, 26].

2.3. MikroRNA ve KANSER

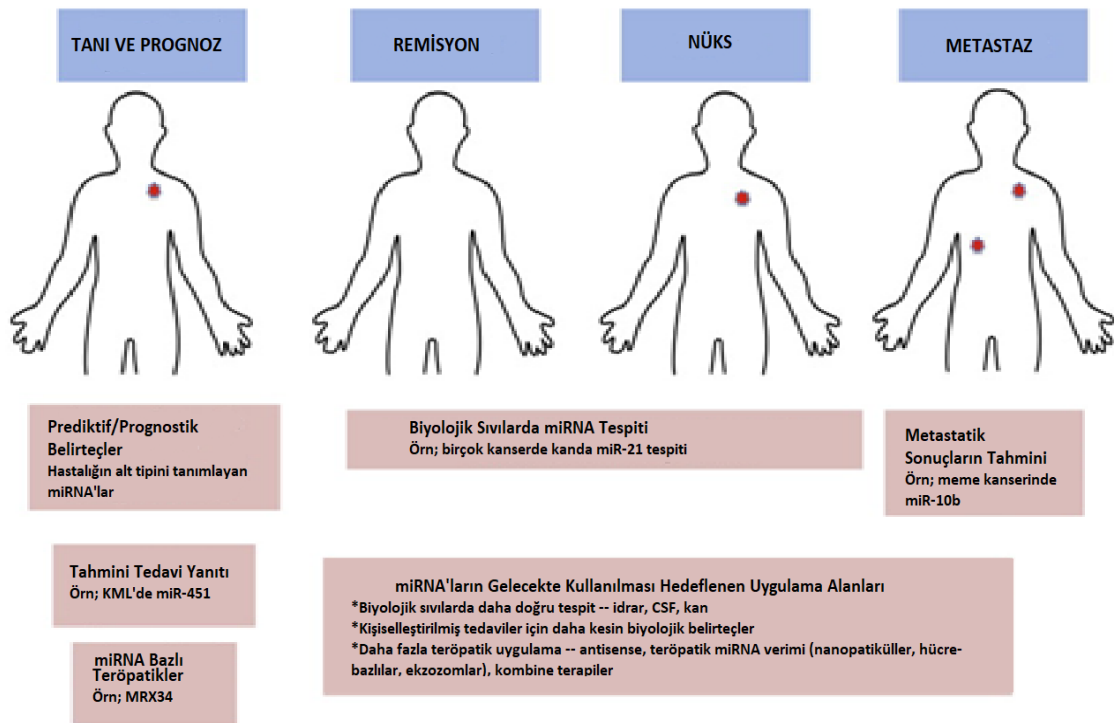
MikroRNA'lar (miRNA'lar), yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, tek iplikçikli, kodlamayan RNA'lardır, çok çeşitli türler arasında yüksek ölçüde korunurlar ve genellikle transkripsiyonal gen regülasyonuna dahil edilirler [27].

miRNA'ların, kanserde düzensiz olarak eksprese oldukları keşfedilmiş ve bunların hem onkogenler hem de tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği ortaya çıkmıştır. Ekspresyonları artan miRNA'lar onkogen olarak düşünülürken, azalan

ekspresyon miktarı tümör baskılayıcı gen olarak işlev görmektedir. Çok sayıda çalışmada, farklı miRNA'ların çeşitli insan malignitelerinde düzensiz şekilde eksprese olduğunu bildirilmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, keşfedilmiş insan miRNA'larının yaklaşık %50'sinin kanser ile ilişkili olduğu ve kanser ile ilişkili olan genomik bölgelerin fragil alanlarında bulunduğu belirtilmiştir [28].

Kanserde mikroRNA düzensizliği ilk olarak 2002 yılında, iki mikroRNA, miR-15 ve miR-16 kümesinin, kronik lenfositik lösemide (KLL) sıkça silinmiş bir bölge olan 13q14.3'te yer aldığı bildirilmiştir [7].

Bu mikroRNA delesyonunun, miR-15/16 B-hücreli lenfoma 2 (BCL2) anti-apoptotik geninin aşırı ekspresyonuna izin vererek kısmen KLL gelişimine etki ettiği gösterilmiştir. Daha sonra, Hanahan ve Weinberg [29] tarafından tanımlanan mikroRNA'ların tüm kanser özelliklerinde rol aldığı ve her aşamada kanserlerin klinik yönetiminde rol oynayabileceği belgelenmiştir (**Şekil 2-2**).



Şekil 2-2: MikroRNA'ların kanserin klinik yönetimindeki etkisi [30].

miRNA ekspresyon paternlerinin normal dokuya kıyasla kanserde ve alt tipler arasında değiştiği gerçeğinden dolayı, mikroRNA'ların muhtemelen kanser hastaları için prognozun belirlenmesi açısından gelecekteki biyolojik belirteçler ve belki de teröpatik ajan ya da hedef olacakları kuşkusuzdur. Gelecekteki kanser tedavilerinde, bir hasta için

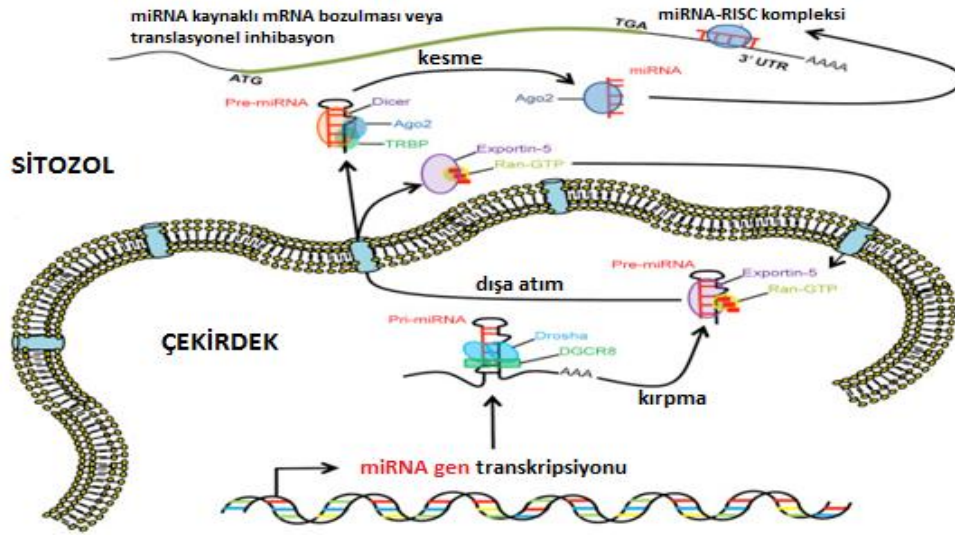
hangi ilaç ya da ilaçların seçileceğine ve hastanın ilaca yanıt verip vermediğinin belirlenmesinde mikroRNAlar önemli olabilir. MikroRNA ekspresyon seviyelerinin belli aralıklarla izlenmesi, nüksün yakın olup olmadığının anlaşılmasında ya da metastazın gelişip gelişmeyeceğinin tahmin edilmesinde kullanılabilir.

2.3.1. MikroRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi, çekirdekte RNA polimeraz II / III transkriptlerinin post-veya ko-transkripsiyonel olarak işlenmesiyle başlar [31] ve hairpin yapısında olgun miRNA dizisini içeren uzun miRNA'yı (pri-miRNA) oluşturur.

Konumları protein kodlayan genlerin intronları veya ekzonları içinde (yaklaşık %70) veya intergenik bölgelerdedir (%30). İntergenik microRNA'ların ifadesi, konakçı gen ekspresyonu ile ilişkilirken, tüm intragenik mikroRNA'lar bağımsız transkripsiyon ünitelerine sahiptir. Pri-miRNA transkripti, birkaç kilobaz uzunluğundadır ve çekirdekte Drosha / DGCR8 heterodimer tarafından işlenir. Bu enzim kompleksi prekürsör (pre-miRNA) olarak adlandırılan bir mikroRNA öncüsü olan yaklaşık 70 kb'lik bir transkript üreten pri-miRNA'ları keser [32].

Bu noktada, Exportin 5 (XPO5) ve onun katalitik ortağı Ran-GTP, pre-miRNA'yı bağlar, böylece bu molekülün çekirdekten sitozole geçişini indükler [33]. Pre-miRNA, sitozolde, yaklaşık 22 nükleotidli olgun bir miRNA dupleksini üreten ve pre-miRNA'yı işleyen RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından tanınır. Olgun diziyeye kesilecek olan iplik, miRNA indüklenmiş susturma kompleksini oluşturan (RISC) Argonaute'a yüklenir ve eksik baz eşleşmesiyle, miRNA RISC'I indükler böylece mRNA destabilizasyonu ya da translasyonel baskılanmaya neden olur. Sonuç olarak, olgun miRNA biyogenezi işleminin üç temel adımla karakterize edildiği özetlenebilir: pri-miRNA'nın kırılması, çekirdekten sitoplazmaya gönderilmesi ve sitoplazmada kesilerek olgunlaştırılması işlemi.



Şekil 2-3: miRNA biyogenezinin ve miR-RISC aktivitesinin şematik gösterimi [34].

2.3.2. Prognozun belirleyicisi olarak MikroRNA'lar

Kanserin altında yatan moleküler mekanizmalara ilişkin bilgilerimizin artışı, geçmişe göre daha doğru ve anlamlı tanı ve prognoza yönelik fırsatların gelişmesini sağlamıştır. Kişiselleştirilmiş tıp çağına girildiği şu zaman diliminde, hasta yönetimine ilişkin kararların çoğu giderek daha fazla moleküler analizlere dayanmaktadır. Spesifik genetik değişikliklere ek olarak, DNA metilasyonu, gen ekspresyonu ve microRNA ekspresyonu dahil ek moleküler özellikler önemli klinik bilgiler sağlayabilir. MikroRNA'lar, klinik örnekler içindeki stabiliteyi ve güçlü ekspresyon kalıpları nedeniyle, prognostik indikatörler olarak mRNA'lardan daha fazla yarar sağlayabilir [35]. Oldukça yakın zamana kadar, qRT-PCR ve mikro-dizi tabanlı yaklaşımlar kullanılarak mikroRNA analizi yapılırdı. Son zamanlarda ise yeni nesil sekanslama (NGS) uygun maliyetli bir seçenek olarak ortaya çıkmış ve biyoinformatik analizinin önündeki engeller artık daha da azalmıştır. Tüm mikroRNA'lar arasında, miR-21 (kanserde artmış) ve let-7 (kanserde azalmış) hasta sonuçlarıyla ilişkili en yaygın mikroRNA'lardır. Onkojenik miR-21, meme kanseri, glioblastoma, hepatoselüler karsinom, akciğer kanseri, mide kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanseri gibi birçok kanserde aşırı eksprese edilir. Apoptoz, istila ve proliferasyonda rol oynayan çok sayıda tümör baskılayıcı genleri hedef alarak pro-tümörijenik bir ortam yaratır ve böylece kanser tedavisi için yeni bir moleküler hedef olarak ortaya çıkmıştır [36].

2.3.3. Non-invaziv biyolojik belirteçler olarak MikroRNA'lar

Dolaşımdaki mikroRNA'ların farklı kanser türlerinde belirteçler olarak kullanılması, hızla gelişen bir alandır.

MikroRNA'lar idrar ve tükürük gibi diğer vücut sıvılarında stabilite göstermektedir ve çoğu çalışmada, serum mikroRNA'larının biyolojik belirteçler olarak kullanılıp kullanılmayacağına odaklanılmıştır.

Gelecekteki non-invaziv biyolojik belirteç gelişimi için, ve kandaki mikroRNA'ların varlığının tespiti için daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği bilinmekte ve alanın bu hedefe doğru hızla hareket ettiği görülmektedir.

2.4. miRNA 423-5p

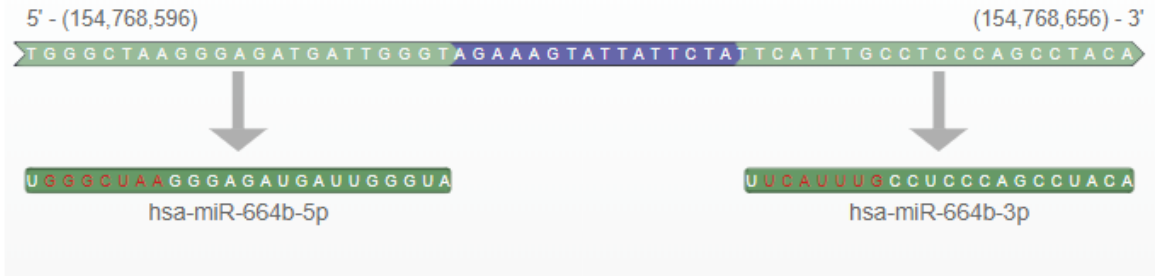
miR-423, 17q11.2 kromozomunun uzun kolunda bulunur ve iki olgun miRNA'yı kodlar [37, 38]. Çeşitli çalışmalarda miR-423 ve SNP rs6505162 A>C polimorfizmi arasında bir ilişki olduğu çeşitli popülasyonlarda ve bir dizi kanserde incelenmiştir. Kontorovich ve Hu'nun yaptıkları çalışmalarda, rs6505162 polimorfizminin, over kanseri ve mesane kanseri riskini arttırdığı bildirilmiştir [39, 40]. Bununla beraber, diğer dört çalışmada ise söz konusu polimorfizmin, meme kanseri ve özofagus kanseri riskini azalttığını ancak renal hücreli karsinom ile prostat kanserinin nüks veya hayatta kalma durumunun belirlendiğini bildirmişlerdir [41-44]. Bu araştırmacıların yaptıkları çalışmalara ek olarak, yakın tarihli bir meta-analizde, herhangi bir genetik modelde rs6505162 SNP ile meme kanseri riski arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir [45].

miR-423'ün ekspresyon seviyesinin, meme kanseri, hepatoselüler karsinom, endometrial karsinom ve baş boyun skuamöz hücreli karsinomlar dahil olmak üzere birçok kanser tipinde arttığı bildirilmiştir [37, 38, 46-48].

Özetle, birçok çalışmada miR-423'ün tümör genizde önemli rol oynadığı gösterilmiştir [37, 49, 50].

2.5. miRNA 664b-5p

miR-664, hepatoselüler karsinom, prolaktinoma ve papiller tiroid karsinomu dahil olmak üzere birçok kanserde yer almıştır [51, 52]. Literatürlerde bu mikroRNA ile ilgili çok fazla bilgi bulunmamakla birlikte, çeşitli kanserlerde tanı ve tedavi için biyolojik belirteç olabileceği düşünülmekte, bununla ilgili çalışmalar devam etmektedir.



Şekil 2-4: miRNA 664b-5p'nin genomik lokasyonu [53]

Ancak over kanseri ile miR-423-5p ve miR-664b-5p arasındaki ilişki değerlendirilmemiş ve over kanserinde söz konusu miR-423-5p, miR-664b-5p araştırılmamıştır. Öncü çalışmamızda over kanseri ile ilişkili bulunan miR-423-5p ve miR-664b-5p moleküllerinin daha geniş over kanser grubunda incelenmesi, validasyonlarının yapılması, over kanserinin etiolojisindeki yeri ve biyolojik belirteç olup olmama durumunun belirlenmesi amacıyla bu tez çalışmasına inceleme konusu olmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Deney grubu İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Kanser Genetiği Polikliniğine *BRCA1/2* incelemesi için gelen hastalar arasından seçilen, 150 over kanserli hasta ve hasta popülasyonu ile yaş, cinsiyet ve etnik köken olarak eşleştirilmiş 100 sağlıklı kişiden oluşturulmuştur. Çalışmada kalite kontrolü geçen, hasta ve sağlıklı kontrol grubu için uygun olan RNA'lar kullanılmıştır. Çalışmaya alınan hastalar OH harfleri ile, kontrol grubu ise OK harfleri ile kodlandırılmıştır. Buna göre hasta grubu OH1-OH127, kontrol grubu ise OK1-OK98'e kadar numaralandırılmıştır.

Çalışmadaki ortalama yaşlar over hasta grubu için 50 ± 10 (23-84), kontrol grubu için 48 ± 11 (23-84)'dir.

miR-423-5p ve miR-664b-5p adlı iki miRNA'nın ekspresyon düzeyleri, hasta ve sağlıklı kişilerin periferik kan lenfositlerinde incelenmiştir. Araştırılan miRNA'ların ekspresyon düzeyi 5SRNA referans gen varlığında analiz edilmiştir. Çalışmada, toplam 250 örnekte, referans gen dahil, 3 miRNA incelenmiştir.

Deney grubuna ilişkin RNA'lar, periferik kandan ayrıştırılmış lenfosit peletinden ticari kit ile (Quick-RNATM MiniPrep kit) ekstrakte edilmiştir. Daha sonra özel bir kit yardımıyla (EPIKTM miRNA Hi/Lo-Rox Select Kit) miRNA molekülleri, total RNA moleküllerinden floresan işaretlenerek ayrıştırılmış ve miRNA ekspresyon düzeyi kantitatif RT-PCR (Gerçek Zamanlı-PZR) yöntemi ile incelenmiştir.

3.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Kullanılan kimyasal maddeler ve solüsyonlar aşağıdaki Tablo 3-1'de verilmiştir (Tablo 3-1).

Agaroz (Wisent MultiCell, Kanada)

Borik asit (Wisent MultiCell, Kanada)

Ethanol (Riedel De Haen, Almanya)

Etidyum Bromür (Sigma, Almanya)

Biocoll Separating Solution (Ficoll)
[BIOCHROM]

Bromfenol Mavisi (BFB) [SIGMA]

Etilen-diamin-tetraasetikasit (EDTA)

Collection Tubes

PBS (Phosphate Buffer Solution)

Tablo 3-1: Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar ile Bilgisayar programları

Deneysel aşamalarda kullanılan tampon ve çözeltiler; PBS Tampon Çözeltisi, TEB Tampon çözeltisi, BFB Yükleme Tamponu, %1,5'lik Agaroz, Lysis Buffer, Buffer R; ile bilgisayar programları Tablo 3-2'de belirtilmiştir (Tablo 3-2).

✓ 10X BFB Yükleme Tamponu (2mL)

%1 SDS

5mg Bromfenol Mavisi

2mL Gliserol

✓ 10X PBS Tampon Çözeltisi (1L)

80 g NaCl

2 g KCl

11,5 g Na₂HPO₄

2 g KH₂PO₄

✓ 10X TEB (Tris-EDTA-Borik Asit) Tampon Çözeltisi (1L)

0.88 M Borik Asit

5 M Tris

0.02 M EDTA (pH: 8.00)

✓ %1,5'lik Agaroz Hazırlanması

1,5 g Agaroz

100mL 0.5X TEB

5µL Etidyum Bromür (10mg/mL)

✓ 1X Lysis Buffer (100mL)

10 mL 10X Lysis Buffer (ABM)

90 mL distile su

✓ Buffer R.(100mL)

49 mL PBS

2 mL FBS

50 µL EDTA

✓ Bilgisayar Programları

IBM Support SPSS 21.0

Tablo 3-2: Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar ile Bilgisayar Programları

3.4. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yer alan cihazlar kullanılmıştır (**Tablo 3-3**).

Jel Dokümantasyon Sistemi-UV Transliminator	RNA kalite kontrolünde kullanılmıştır.
Spektrofotometre (NanoDrop 2000)	RNA konsantrasyonunun ölçülmesinde kullanılmıştır.
Santrifüjler [HERAUS, HETTICH, JOUAN]	RNA izolasyonunda, Saflaştırma çöktürme işlemlerinde kullanılmıştır.
Sıvı Azot Tankı	Hastalara ait hücrelerin saklanması için kullanılmıştır.

Derin Dondurucu (-80°C)	Kit, prob, hasta RNA'ların saklanması için kullanılmıştır.
Buzdolapları	Kit ve çeşitli kimyasal maddelerin saklanması için kullanılmıştır.
Teraziler	Çeşitli solüsyonların hazırlanması için kimyasal maddelerin ölçülmesinde kullanılmıştır.
Karıştırıcılar	Solüsyonların hazırlanması esnasında kullanılmıştır.
pH Metreler	Solüsyonların pH'larının ölçülmesinde kullanılmıştır.
1 Mikropipetler [GILSON]	Deneylemlerin yapılması esnasında reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.
Real-Time PCR cihazı	PCR işlemleri için kullanılmıştır.
Mic qPCR cihazı	Cihaz kuruma ait değildir. Proje süresince firma tarafından deneysel işlemlerin yapılması için kurulmuş ve kullanılmıştır.

Tablo 3-3: Kullanılan Cihazlar ve İşlevleri

3.5. Tam Kandan Lenfosit İzolasyonu

EDTA'lı tüpe alınan yaklaşık 10 mL kan 1/1 oranında %0,9'luk NaCl ile dilüe edilir. 2 mL Ficoll üzerine yavaş bir şekilde eklenir. 1970 RPM'de 30 dk. santrifüj yapılır. Santrifüj sonunda alt fazda orta pelette eritrosit üst fazda serum ayrılmaktadır. Eritrosit fazının hemen üzerinde ve serum fazının içinde halka şeklinde toplanmış beyaz renkli olan lenfosit hücreleri ayrışır. Bu halka şeklindeki lenfosit hücre fazı pastör pipet ile yardımı ile toplanarak temiz tüpe alınır ve 1970 RPM'de 10 dk. santrifüj edilir. Süpernatant dökülür ve kalan pelet üzerine 4 mL PBS eklenerek pipetlenir ve Kriyo tüplere 1'er mL olacak şekilde dağıtılır ardından 1970 RPM'de 5 dk. santrifüj yapılır. Süpernatant dökülür. Çöktürülen hücreler daha sonraki deneysel işlemler için kademeli olarak dondurularak önce -80°C'de daha sonrada sıvı azot tankına alınarak uzun süreli saklanır.

3.6. Lenfositten RNA İzolasyonu

Lenfositten RNA izolasyonu işlemi ticari kit (Quick-RNATM MiniPrep) ile gerçekleştirilmiş olup, kit protokolüne göre uygulanan işlemler aşağıda verilmiştir.

3.6.1. RNA İzolasyon Protokolü

RNA izolasyonu için Quick-RNATM MiniPrep protokolü uygulanmıştır. Kit içerisindeki DNA-RNA Lysis Buffer -80°C 'de ya da azot tankında saklanan hücre peleti üzerine ilave edilir. DNA-RNA Lysis Buffer ile hücre zarları patlatılır ve hücre içinde yer alan DNA ve RNA molekülleri açığa çıkarılır. Bu karışım RNA izolasyon kiti içinde yer alan filtre üzerine yüklenir ve 12.000g 'de santrifüj işlemi yapılır. Santrifüj sonrası DNA molekülü filtrede tutunur ve RNA molekülleri alt faza geçer. Alt faz, RNA izolasyonu işlemine devam etmek üzere temiz bir tüpe alınarak işlemlere devam edilir. Biriktirme tüpü içerisine alınan RNA fazına Ethanol eklenir ve oluşan yeni karışım özel bir tüp içerisine aktarılarak 12.000g 'de santrifüj edilir.

Daha sonra kit içerisinde bulunan RNA Prep Buffer ($400\ \mu\text{L}$) karışım üzerine eklenir, 12.000g 'de tekrar santrifüj edilir, biriktirme tüpü içerisinde toplanan atık atılır. Ardından Filtreye tutunan RNA molekülü filtrenin üzerine RNA Wash Buffer ($700\ \mu\text{L}$) eklenerek tekrar 12.000g 'de santrifüj edilir, biriktirme tüpü içerisinde toplanan atık atılır. Tekrar RNA Wash Buffer ($400\ \mu\text{L}$) eklenerek iki dakika 12.000g 'de santrifüj edilir.

Son olarak RNase-Free Water eklenerek, 30 saniye/1 dakika boyunca 12.000g 'de santrifüj edilerek RNA izole edilmiş olur. İzole edilmiş RNA -80°C 'de porsiyonlara ayrıştırılarak saklanabilir.

3.7. RNA'ların saflık ve konsantrasyon ölçümleri

cDNA sentezinin başarısı için yüksek kalitede RNA kullanılması gerekmektedir. Yüksek kalitedeki RNA'nın degrade olmamış ve genomik DNA kontaminasyonu içermemiş olması gerekmektedir.

Elde edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyon ölçümleri NanoDrop 2000 Spektrofotometre [THERMO SCIENTIFIC] cihazında yapılmıştır. Uygun olmayan RNA örneklerinin belirlenerek tekrar izolasyonları yapılmıştır.

3.8. Kalite Kontrol Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda kullanılan RNA'ların kalite kontrol işlemleri "Nanodrop 2000" cihazında yapıldı. Bazı örneklere ait ölçüm değerleri Tablo 3-4'de verildi (**Tablo 3-4**).

Örnekler	Nükleik Asit Kons.	Birim	A260/A280	A260/A230	Numune
OH36	118,3	ng/ μ L	2,15	1,75	RNA
OH71	105,9	ng/ μ L	2,14	1,48	RNA
OH72	130,4	ng/ μ L	2,14	1,60	RNA
OH74	123,4	ng/ μ L	2,06	1,04	RNA

Tablo 3-4: Bazı Örneklerle Ait Nanodrop Ölçüm Değerleri

3.9. ID3EAL miRNA qPCR Starter Kit protokolü

Kit protokolü cDNA sentezi ve RT qPCR reaksiyonu olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Bu bu şmlardan ilkinde ilgilendiğimiz miRNA'lar için cDNA sentezi gerçekleştirilmektedir. İkinci şamada ise iki farklı miRNA RT-qPCR assay için hazır hale getirilmektedir.

3.9.1. cDNA Sentezi

Tüm reaksiyon işlemleri buz üstünde yapıldı. cDNA sentez işlemi, ID3EAL miRNA qPCR Starter kiti kullanılarak, kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi. cDNA sentez reaksiyonu öncesi hastalara ait RNA örnekleri çözüldü ve ardından vortekslendi. cDNA reaksiyonunun gerçekleştirileceği tüp içerisine sırasıyla kalıp RNA (1 μ g'a kadar), ID3AL RT Buffer (5 μ L), ID3AL RT Primer (1 μ L), ID3AL RT (revers transkriptaz) (1 μ L) eklendi. Elde edilen karışımın hacmi distile su ile 20 μ L'ye tamamlandı. Mikropipet yardımıyla pipetaj yapıldı ve ardından vortekslendi. BioRad PCR cihazı kullanılarak 42°C'de 30 dakika, 95°C'da 5 dakika olacak şekilde inkübe edilerek cDNA oluşturma reaksiyonu tamamlandı.

3.9.2. RT qPCR Reaksiyonu

Elde edilen cDNA'lar 1:10 oranında distile su kullanılarak sulandırıldı. Sulandırılmış cDNA'lar -20°C'de saklandı. 4 hafta içinde tüm cDNA'lar kullanıldı.

Real Time PCR Reaksiyonu: Mic qPCR için üretilmiş özel tüpler içerisine total hacim 20 μ L olacak şekilde, 10 μ L ID3AL qPCR Master Mix , 2 μ L ID3AL qPCR assays, 5 μ L sulandırılmış cDNA ve 3 μ L distile su eklendi. Mikropipet yardımıyla pipetaj yapıldı ve ardından vortekslendi.

3.10. Kantitatif Real Time PCR Reaksiyonu

Kantitatif Real Time PCR işlemi Mic qPCR cihazı ile gerçekleştirildi. Kantitatif PCR işlemi Tablo 3-5’de verilen döngüye göre gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen reaksiyonların ölçümü ve hesaplanma işlemi cihaz üzerinde yer alan Mic qPCR yazılımı ile yapıldı. Bu yazılım ile incelenen miRNA ekspresyon düzeyleri kantitatif olarak hesaplandı.



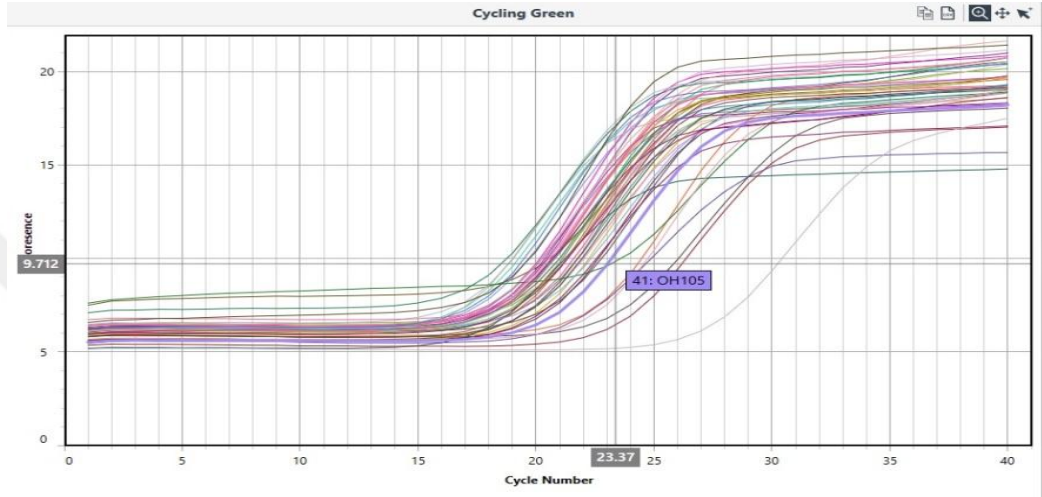
Şekil 3-1: Mic qPCR cihazı ve kendine özgü tüplerinin görünümü

Döngü	Sıcaklık	Süre
1x	95°C	10 dakika
	40°C	5 dakika
40x	95°C	10 saniye
	60°C	30 saniye

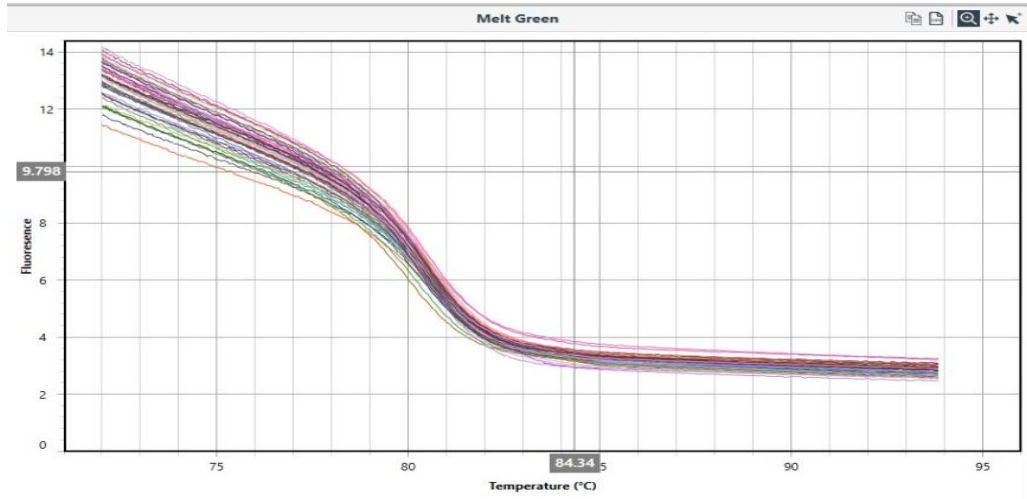
Tablo 3-5: Mic qPCR çalışma döngüsü

3.11. qPCR ile Çoğaltılan miRNA Moleküllerinin Analizi

Gerek miR-423-5p gerekse miR-664b-5p için, Mic qPCR'a yüklenen hasta ve kontrol örneklerinin oluşturduğu Real Time PCR eğrileri (Şekil 3-2), (Şekil 3-3) verildi. Her bir örneğin ekspresyon seviyeleri CT (Threshold Cycle = Eşik döngüsü) değerindeki farklılıklara göre değerlendirildi.



Şekil 3-2: miR-423-5p ekspresyonunun incelendiği örneklerin gerçek zamanlı PCR eğrileri görüntüsü



Şekil 3-3: miR-423-5p'nin ekspresyonunun incelendiği örneklerin erime eğrileri görüntüsü

3.12. Δ CT ve $\Delta\Delta$ CT Değerlerinin Hesaplanması

Ekspresyon seviyeleri CT değerleri üzerinden, Δ CT ve $\Delta\Delta$ CT hesaplamaları yapılarak belirlendi.

$$\Delta CT = CT(\text{hedef gen}) - CT(\text{referans gen}).$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{hedef gen}) - \sum \Delta CT(\text{referans gen}).$$

Bu değerlerin hesaplanmasından sonra $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri bulundu. $\Delta\Delta CT$ değeri 0'a eşit olduğundan ve $2^0=1$ ifadesinden dolayı referans değeri 1 olarak kabul edildi. Referans değerine gre ekspresyon dzeyelerindeki artış ve ya azalış saptandı.

3.13. İstatistiksel Analiz

Hasta ve kontrol grubu arasındaki miRNA ekspresyon dzeyelerinin karşılaştırılma işlemleri IBM Support SPSS 21.0 bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirildi. rneklemin ekspresyon seviyelerindeki değişimin kat oranını belirten ‘‘Fold&Change’’(FC) oranları ve istatistiksel ‘‘Independent-Samples T-Test’’ kullanılarak, belirlenen gruplar arasında ortalamalar açısından fark olup olmadığı araştırıldı. Fold&Change oranları $|FC| \geq 2$ ve p değeri < 0.05 'den küçük olan değerler işleme alındı.

4. BULGULAR

Tez çalışmasında İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Kanser Genetiği Polikliniğine *BRCA1/2* incelemesi için başvurmuş hastalar arasından seçilen, 150 over kanserli hasta ve hasta popülasyonu ile yaş, cinsiyet ve etnik olarak eşleştirilmiş 100 sağlıklı kontrol dahil edildi. Biyolojik materyalin kalite kontrolünün ardından tez çalışmasında deney grubu için toplamda 127 over kanserli hasta ve 98 sağlıklı kontrole ilişkin RNA kullanılarak sonuçlar elde edildi.

İstatistiksel analizlere göre; çalışma kapsamında incelenen gruplar arasında dağılımın normallik varsayımı Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Verilerin normallik dağılımları miR-423-5p için (Kolmogorov-Smirnov $Z=4,731$; $p<0,05$); miR-664b-5p için (Kolmogorov-Smirnov $Z=5,619$; $p<0,05$) hesaplandı. Bu değerlendirmelere göre gruplar normal dağılım gösterdikleri ve alt gruplar içinde hesaplama yapılması istendiğinden ve toplam beş alt grup olmalarından dolayı, verilerin çözümlenmesinde post-hoc ANOVA testi kullanıldı.

ANOVA testi ile yapılan değerlendirmeye göre hasta ve kontrol grupları arasındaki $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri baz alınarak yapılan hesaplamalarda miR-423-5p ve miR-664b-5p ifade düzeylerinin, hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan yüksek düzeyde anlamlı olduğu görüldü ($p=0,000$). Yapılan ANOVA testi sonrası, hangi gruplar arasında anlamlılık olduğunu daha detaylı görebilmek için Post-Hoc Tukey HSD testi uygulandı. Bu testin sonuçlarına göre, sağlıklı kontroller ile over kanserli, over ve meme kanserli, over ve endometriyum, over ve diğer tümörü bulunan hasta grupları arasında her iki miRNA için de istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p=0,000$). Bu gruplar arasındaki ilişki (**Tablo 4-1**)'de detaylı olarak gösterildi.

Bağımlı Değişken	Grup1	Grup2	Ortalama Farkı	Standart Hata	P Değeri	%95 Güven Aralığı	
						Altsınır	Üst sınır
miR-423-5p	Kontrol Grubu	Over ve meme Kanserleri	-1,3125*	,0989	,000*	-1,585	-1,040
		Sadece Over Kanseri	-1,4757*	,0518	,000*	-1,618	-1,333
		Over ve endometriyum kanserleri	-1,5000*	,2621	,000*	-2,221	-,779
		Over ve Diğer Kanserler	-1,0000*	,1543	,000*	-1,424	-,576
miR-664b-5p	Kontrol Grubu	Over ve meme kanserleri	-1,56250*	,09508	,000*	-1,8240	-1,3010
		Sadece Over Kanseri	-1,65049*	,04976	,000*	-1,7873	-1,5136
		Over ve endometriyum kanserleri	-2,00000*	,25187	,000*	-2,6928	-1,3072
		Over ve Diğer Kanserler	-1,00000*	,14830	,000*	-1,4079	-,5921

Tablo 4-1: ANOVA Sonuçları. *,istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05)

Çalışmada hasta ve kontrol grubunda yapılan deneysel işlemlere ait verilerin analiz sonuçları sırasıyla aşağıda verildi. Sağlıklı kontroller ile over kanserli, over ve meme kanserli, over ve endometriyum, over ve diğer tümörü bulunan hasta grupları arasında her iki miRNA için de istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu görüldü (p=0,000). Bu gruplar arasındaki ilişki (Tablo 4-1)'de detaylı olarak gösterildi.

4.1. Hastaların BRCA Mutasyon Varlığı ile Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırması

Hastalarımızın sonuçlarını BRCA mutasyon varlığına göre değerlendirdiğimizde (Tablo 4-2), miR-423-5p ekspresyonunun, BRCA mutasyonu açısından pozitif olan

hastaların %52(13/25)'sinde artarken, %48(12/25)'inde azaldığı saptandı. BRCA mutasyonu açısından negatif olan hastalarda ise miR-423-5p ekspresyonunun, %57,8(59/102)'inde arttığı, %42,2(43/102)'sinde azaldığı görüldü. Genel olarak miR-423-5p'nin BRCA mutasyonu açısından pozitif ve negatif grupta aynı dağılımı gösterdiği tespit edildi.

BRCA mutasyon varlığı ile miR-664b-5p ekspresyonu arasında bir karşılaştırma yapıldığından miR-423-5p'den farklı olarak, miR-664b-5p'nin BRCA mutasyon açısından gerek negatif gerekse pozitif vakaların çoğunda azaldığı saptandı. Buna göre miR-664b-5p BRCA mutasyonu açısından pozitif olan hastaların %36(9/25)'sında artarken, %64(16/25)'ünde azalmış; BRCA mutasyonu açısından negatif olan hastaların ise %39,2(40/102)'sinde ekspresyon düzeyinde artış gözlenirken, %60,8(62/102)'inde azalış gözlemlendi.

BRCA	miR-423-5p		miR-664b-5p		Toplam n(%)
	Artmış n(%)	Azalmış n(%)	Artmış n(%)	Azalmış n(%)	
POZİTİF	13(%52)	12(%48)	9(%36)	16(%64)	25(%19,6)
NEGATİF	59(%57,8)	43(%42,2)	40(%39,2)	62(%60,8)	102(%80,3)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127

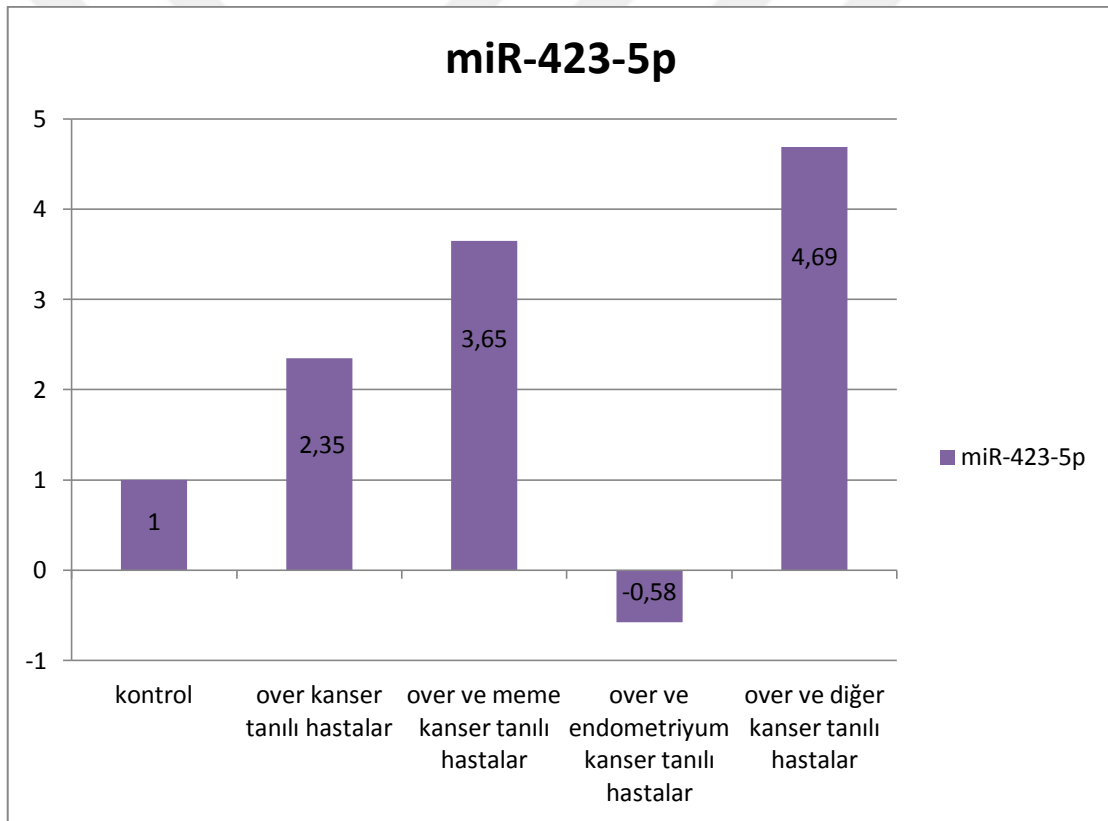
Tablo 4-2: BRCA durumları ile Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişki

4.2. Hasta ve Kontrol Grubundaki Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

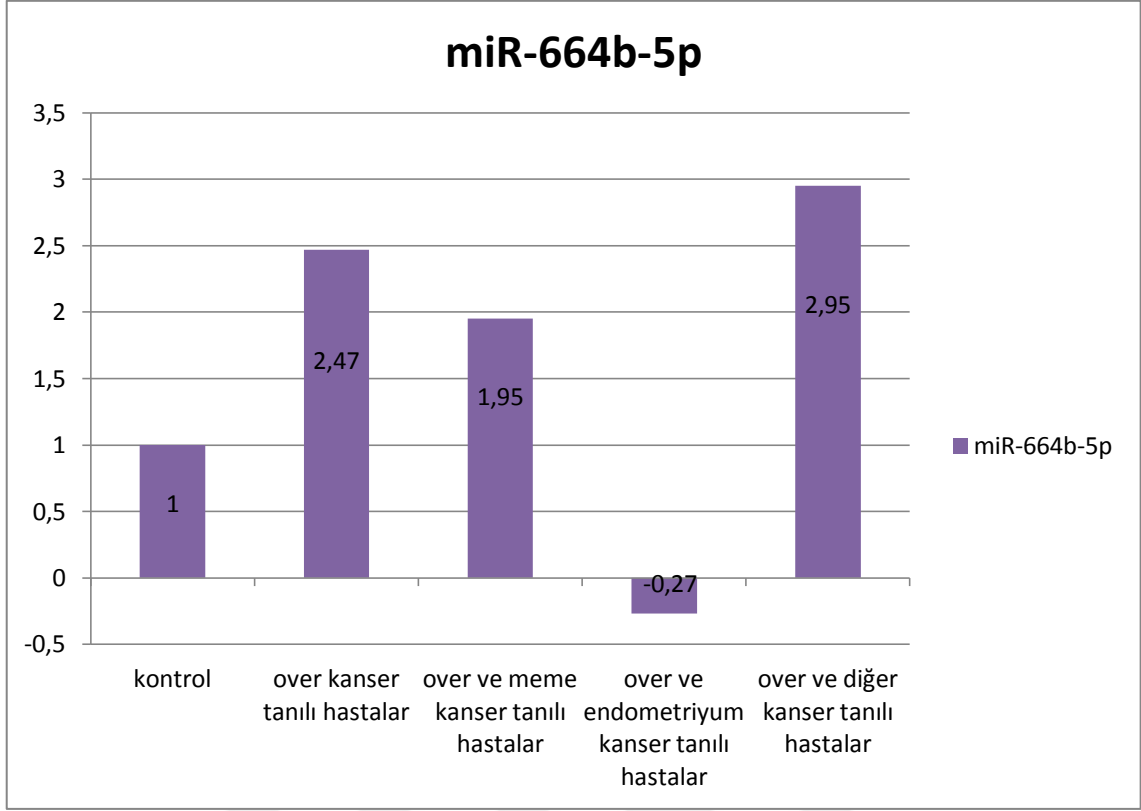
Sağlıklı kontroller ile over kanserli hasta grupları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada her iki miRNA'ya ait ekspresyon düzeylerinde istatistiksel anlamlılık saptandı (p=0,000). miR-423-5p ekspresyonunun over kanserli hastalarda kontrol grubuna göre 2,35 kat arttığı saptandı. Over kanser grubu içindeki bazı hastalar ikincil kanserlere sahipti. Buna göre bazı hastalar aynı anda over ve meme kanserine, bazı hastalar over ve endometriyum kanserine, bir grubu ise over kanserine ilave olarak bir başka ikincil kanser tanısına daha sahiptilerdi. Over kanserli hasta alt gruplarının kontrol grubu ile yapılan karşılaştırılmasında hem over hem de meme kanserine birlikte sahip olan hastalarda miR-423-5p ekspresyon düzeyinin 3,65 kat, hem over ve hem de diğer kanserli hastalarda miR-423-5p ekspresyonu 4,69 kat arttığı saptanırken, hem over hem

de endometriyum kanserini birlikte taşıyan hastalarda miR-423-5p ekspresyon düzeyinin 0,58 kat azalmış olduğu saptandı (**Şekil 4-1**).

Tüm over kanserli hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında miR-664b-5p ekspresyonunun 2,47 kat artığı görüldü.. Bu miRNA için over kanserli hasta alt gruplarının kontrol grubu ile yapılan karşılaştırılmasında hem over hem de meme kanserini birlikte sahip olan hastalarda miR-664b-5p 1,95, hem over ve hem de diğer kanserli hastalarda miR-664b-5p ekspresyonu 2,95 kat arttığı saptanırken, hem over hem de endometriyum kanserini birlikte taşıyan hastalarda miR-664b-5p ekspresyonunun 0,27 kat azalış gösterdiği belirlendi (**Şekil 4-2**).



Şekil 4-1: miR-423-5p ekspresyon düzeyinin over kanseri ve over kanserli hastaların alt gruplarındaki dağılımları.



Şekil 4-2: miR-664b-5p ekspresyon düzeyinin over kanseri ve over kanserli hastaların alt gruplarındaki dağılımları

miR-423-5p ve miR-664b-5p'nin ekspresyon durumları, çalışmaya dahil edilen tüm over kanserli hasta grupları açısından değerlendirildiğinde; hastaların %43,3(55/127)'ünde miR-423-5p'nin ekspresyonu azalırken, %56,7(72/127)'inde arttığı gözlemlendi. miR-664b-5p'nin ekspresyonu toplam 127 hastanın %61,5(78/127)'inde azalmışken, %38,5(49/127)'inde artmıştır (**Tablo 4-3**).

miR-423-5p ve miR-664b-5p'nin ekspresyon durumlarının over kanseri ve over kanser alt gruplarındaki dağılımı değerlendirildiğinde; toplam 127 over kanser tanılı hastadan sadece over kanser tanısı almış ve başka bir primer tümörü bulunmayan hasta sayısı 103'tü. Bu hastaların %52,4(54/103)'ünde miR-423-5p ekspresyonu artışı gözlenirken, %47,6(49/103)'ünde azalma saptanmıştır. Hem over hem de meme kanser tanısı almış grupta miR-423-5p ekspresyon düzeyinin hastaların %68,8(11/16)'inde arttığı görülürken, %31,2(5/16)'inde azaldığı görülmüştür. Hem over hem de endometriyum kanseri olmak üzere iki farklı primer kanser tanısı olan hastalarda miR-423-5p ekspresyonu hastaların %50 (1/2)'inde artarken, diğer %50 (1/2)'inde azaldığı görülmüştür. Over kanseri ile birlikte meme ve endometriyum hariç ikinci bir primer

taşıyan hastaların hepsinde yani %100 (6/6)'de miR-423-5p ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (**Tablo 4-3**).

miR-664b-5p ekspresyonu açısından ise toplam 127 over kanser tanıli hastadan sadece over kanser tanısı almış ve başka bir primer tümörü bulunmayan 103 hastanın %35(36/103)'inde miR-664b-5p ekspresyonu artmışken, %65(67/103)'inde azalmıştır. Hem over hem de meme kanser tanıli hasta grubunda hastaların %43,8(7/16)'inde miR-664b-5p ekspresyon düzeyinin arttığı gözlenirken %56,2(9/16)'sinde azaldığı saptanmıştır. Hem over hem de endometriyum kanser tanıli hastalarda ise miR-664b-5p ekspresyonunun hastaların yarısında artarken diğer yarısında azaldığı görülmüştür. Over kanseri ile birlikte meme ve endometriyum hariç ikinci bir primer taşıyan hastaların hepsinde miR-664b-5p ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (**Tablo 4-3**).

Tanı	miR-423-5p		miR-664b-5p		Toplam n(%)
	Artmış n(%)	Azalmış n(%)	Artmış n(%)	Azalmış n(%)	
Sadece Over Kanseri	54(%52,4)	49(%47,6)	36(%35)	67(%65)	103(81,1)
Over Kanseri + Meme Kanseri	11(%68,8)	5(%31,2)	7(%43,8)	9(%56,2)	16(%12,6)
Over Kanseri+ Endometriyum Kanseri	1(%50)	1(%50)	0(%0)	2(%100)	2(%1,6)
Over Kanseri + Diğer kanserler	6(%100)	0(%0)	6(%100)	0(%0)	6(%4,7)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127

Tablo 4-3: miR-423-5p ve miR-664b-5p ekspresyon durumlarının over kanseri ve over kanserli hastaların alt grupları arasındaki ilişkisi

4.3. miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Hastaların Klinik Özellikleri İle Karşılaştırılması

miR-423-5p ekspresyon durumunu hastaların klinik evre özelliklerine göre değerlendirdiğimizde (**Tablo 4-4**); toplamda hastaların %43,3(55/127)'ünde ekspresyon seviyesi azalmışken, %56,7(72/120)'sinde ekspresyon seviyesi artmıştır. Detaylı olarak baktığımızda; ileri evre (Evre 3-4) over kanserli hastalarda %42,9(39/91) hastada ekspresyon seviyesi azalmışken, %57,1(52/91) hastada ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Erken evre (Evre 1-2) over kanserli hastalarda ise %44,4(16/36) hastada ekspresyon seviyesi azalmış, %55,6(20/36) hastada ekspresyon seviyesi artmıştır.

miR-664b-5p ekspresyon durumunu hastaların klinik evre özelliklerine göre değerlendirdiğimizde; toplamda hastaların %61,5(78/127)'ünde ekspresyon seviyesi azalmışken, %38,5(49/120)'sinde ekspresyon seviyesi artmıştır. Detaylı olarak baktığımızda ise; ileri evre (Evre 3-4) over kanserli hastalarda %63,7(58/91) hastada ekspresyon seviyesi azalmışken, %36,3(33/91) hastada ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Erken evre (Evre 1-2) over kanserli hastalarda ise %55,6(20/36) hastada ekspresyon seviyesi azalmış, %44,4(16/36) hastada ekspresyon seviyesi artmıştır.

miR-423-5p ekspresyon durumunu hastaların patolojik evre özelliklerine göre değerlendirdiğimizde; toplamda hastaların %43,3(55/127)'ünde ekspresyon seviyesi azalmışken, %56,7(72/120)'sinde ekspresyon seviyesi artmıştır. Detaylı olarak baktığımızda; ileri evre (Evre 3) over kanserli hastaların %41,9(36/86)'inde hastada ekspresyon seviyesi azalmışken, %58,1(50/86) hastada ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Erken evre (Evre 1-2) over kanserli hastalarda ise %46,3(19/41) hastada ekspresyon seviyesi azalmış, %53,7(22/41) hastada ekspresyon seviyesi artmıştır.

miR-664b-5p ekspresyon durumunu hastaların patolojik evre özelliklerine göre değerlendirdiğimizde; toplamda hastaların %61,5(78/127)'ünde ekspresyon seviyesi azalmışken, %38,5(49/120)'sinde ekspresyon seviyesi artmıştır. Detaylı olarak baktığımızda; ileri evre (Evre 3) over kanserli hastaların %61,6(53/86)'inde hastada ekspresyon seviyesi azalmışken, %38,4(33/86) hastada ekspresyon seviyesinin artmış

olduğu gözlemlendi. Erken evre (Evre 1-2) over kanserli hastalarda ise %61(25/41) hastada ekspresyon seviyesi azalmış, %39(16/41) hastada ekspresyon seviyesi artmıştır.

miR-423-5p ekspresyon durumunu hastaların histolojik grad özelliklerine göre değerlendirdiğimizde; Grad1 over kanserli hastaların %56(14/25)'inde ekspresyon seviyesi azalmışken, %44(11/25)'ünde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Grad2 over kanserli hastaların %41,7(10/24)'inde ekspresyon seviyesi azalmış, %58,3(14/24)'ünde ekspresyon seviyesi artmıştır. Grad3 over kanserli hastaların %39,8(31/78)'ünde ekspresyon seviyesi azalmış, %60,2(47/78)'ünde ekspresyon seviyesi artmıştır.

miR-664b-5p ekspresyon durumunu hastaların histolojik grad özelliklerine göre değerlendirdiğimizde; Grad1 over kanserli hastaların %72(18/25)'ünde ekspresyon seviyesi azalmışken, %28(7/25)'ünde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Grad2 over kanserli hastaların %58,4(14/24)'ünde ekspresyon seviyesi azalmış, %41,6(10/24)'sinde ekspresyon seviyesi artmıştır. Grad3 over kanserli hastaların %59(46/78)'unda ekspresyon seviyesi azalmış, %41(32/78)'ünde ekspresyon seviyesi artmıştır.

miR-423-5p ekspresyon durumunu hastaların tümör boyutuna göre değerlendirdiğimizde; tümör boyutu 2 cm'den küçük olan over kanserli hastaların %46,4(13/28)'sında ekspresyon seviyesi azalmışken, %53,6(15/28)'inde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Tümör boyutu 2 cm'den büyük veya 2 cm olan over kanserli hastalarda ise %42,5(42/99)'ünde ekspresyon seviyesi azalmış, %57,5(57/99)'unda ekspresyon seviyesi artmıştır.

miR-664b-5p ekspresyon durumunu hastaların tümör boyutuna göre değerlendirdiğimizde; tümör boyutu 2 cm'den küçük olan over kanserli hastaların %57,2(16/28)'inde ekspresyon seviyesi azalmışken, %42,8(12/28)'ünde hastada ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Tümör boyutu 2 cm'den büyük veya 2 cm olan over kanserli hastalarda ise %62,7(62/99)'inde ekspresyon seviyesi azalmış, %37,3(37/99)'sında ekspresyon seviyesi artmıştır.

miR-423-5p ekspresyon durumunu hastaların tedavi yöntemlerine göre değerlendirdiğimizde; cerrahi uygulanmış hastaların %44,3(54/122)'sinde ekspresyon seviyesi azalmışken, %55,7(68/122) hastada ekspresyon seviyesinin artmış olduğu, cerrahi uygulanmamış hastaların yalnızca %20(1/5)'inde ekspresyon seviyesi

azalmışken, %80(4/5)'sında ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Kemoterapi uygulanmış hastaların %43,6(51/117)'sinde ekspresyon seviyesi azalmışken, %56,4(66/117)'sinde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu, kemoterapi uygulanmamış hastaların %40(4/10)'ünde ekspresyon seviyesi azalmışken, %60(6/10)'ünde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Radyoterapi uygulanmış hastaların %33,4(5/15)'unda ekspresyon seviyesi azalmışken, %66,6(10/15)'unda ekspresyon seviyesinin artmış olduğu, radyoterapi uygulanmamış hastaların %44,6(50/112)'inde ekspresyon seviyesi azalmışken, %55,4(62/112)'inde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi.

miR-664b-5p ekspresyon durumunu hastaların tedavi yöntemlerine göre değerlendirdiğimizde; cerrahi uygulanmış hastaların %62,3(76/122)'ünde ekspresyon seviyesi azalmışken, %37,7(46/122)'unda ekspresyon seviyesinin artmış olduğu, cerrahi uygulanmamış hastaların %40(2/5)'sında ekspresyon seviyesi azalmışken, %60(3/5)'inde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Kemoterapi uygulanmış hastaların %58,1(68/117)'inde ekspresyon seviyesi azalmışken, %41,9(49/117)'ünde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu, kemoterapi uygulanmamış hastaların %100(10/10)'unda ekspresyon seviyesi azalmışken, %0(0/10)'ında ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Radyoterapi uygulanmış hastaların %60(9/15)'inde ekspresyon seviyesi azalmışken, %40(6/15)'sinde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu, radyoterapi uygulanmamış hastaların %61,6(69/112)'inde ekspresyon seviyesi azalmışken, %38,4(43/112)'inde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi.

Klinik Özellikler	miR-423-5p		miR-664b-5p		Toplam
	artmış	azalmış	artmış	azalmış	
Ekspresyon Durumu					
YAŞ [Ortalama 50±10 aralık (25-84)]	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
<40 yaş	10(% 13,9)	6(% 11)	6(% 12,2)	10(% 12,8)	16(% 12,5)

>=40 yaş	62(%86,1)	49(%89)	43(%87,8)	68(%87,1)	111(%87,5)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127
Klinik Evre					
Evre 1	12(%17)	10(%18)	6(%12,2)	16(%20,5)	22(%17,3)
Evre 2	8(%11,1)	6(%11)	10(%20,4)	4(%5,2)	14(%11)
Evre 3	48(%66,7)	28(%51)	28(%57,2)	48(%61,5)	76(%59,9)
Evre 4	4(%5,5)	11(%20)	5(%10,2)	10(%12,8)	15(%11,8)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127
Patolojik Evre					
Evre 1	11(%15,3)	11(%20)	7(%14,2)	15(%19,2)	22(%17,3)
Evre 2	11(%15,3)	8(%14,5)	9(%12,5)	10(%12,8)	19(%15)
Evre 3	50(%69,4)	36(%65,5)	33(%67,3)	53(%68)	86(%67,7)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127
Histolojik Grad					
Grad 1	11(%15,3)	14(%25,5)	7(%14,3)	18(%23)	25(%19,7)
Grad 2	14(%19,4)	10(%18,2)	10(%20,4)	14(%18)	24(%18,9)
Grad 3	47(%65,3)	31(%56,3)	32(%65,3)	46(%59)	78(%61,4)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127
Tümör Boyutu					
<2 cm	15(%21)	13(%23,6)	12(%24,4)	16(%20,5)	28(%22)

>=2 cm	57(%79)	42(%76,4)	37(%75,6)	62(%79,5)	99(%78)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127
Tedavi					
Cerrahi					
Var	68(%94,4)	54(%98,2)	46(%93,9)	76(%97,4)	122(%96)
Yok	4(%5,6)	1(%1,8)	3(%6,1)	2(%2,6)	5(%4)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127
Kemoterapi					
Var	66(%91,7)	51(%92,7)	49(%100)	68(%87,1)	117(%92)
Yok	6(%8,3)	4(%7,3)	0(%0)	10(%12,9)	10(%8)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127
Radyoterapi					
Var	10(%13,9)	5(%9)	6(%12,2)	9(%11,5)	15(%12)
Yok	62(%86,1)	50(%91)	43(%87,8)	69(%88,5)	112(%88)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127

Tablo 4-4: miR-423-5p ve miR-664b-5p ekspresyon durumlarının klinik ve patolojik özellikler ile karşılaştırılması

4.4. miRNA Ekspresyon Durumlarının Hastaların Aile Hikayelerine Göre Değerlendirilmesi

miR-423-5p ekspresyon durumunu hastaların aile hikayelerine göre değerlendirdiğimizde (**Tablo 4-5**); ailesinde 2 veya 2'den fazla over&meme kanseri bulunan over kanserli hastaların %38,6(17/44)'inde ekspresyon seviyesi azalmışken, %61,4(27/44)'inde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Ailesinde 2'den az over&meme kanseri bulunan over kanserli hastalarda ise %45,8(38/83)'unda

ekspresyon seviyesi azalmış, %54,2(45/83)'inde ekspresyon seviyesi artmıştır. Ailesinde 2 veya 2'den fazla herhangi türde bir kanser bulunan over kanserli hastaların %45,7(37/81)'ünde ekspresyon seviyesi azalmışken, %54,3(44/81)'inde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Ailesinde 2'den az kanser bulunan over kanserli hastalarda ise %39(18/46)'sinde ekspresyon seviyesi azalmış, %61(28/46)'unda ekspresyon seviyesi artmıştır.

miR-664b-5p ekspresyon durumunu hastaların aile hikayelerine göre değerlendirdiğimizde; ailesinde 2 veya 2'den fazla over&meme kanseri bulunan over kanserli hastaların %56,8(25/44)'sinde ekspresyon seviyesi azalmışken, %43,2(19/44)'inde ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Ailesinde 2'den az over&meme kanseri bulunan over kanserli hastalarda ise %64(53/83)'inde ekspresyon seviyesi azalmış, %36(30/83)'sinde ekspresyon seviyesi artmıştır. Ailesinde 2 veya 2'den fazla herhangi türde bir kanser bulunan over kanserli hastaların %53(43/81)'sinde ekspresyon seviyesi azalmışken, %47(38/81)'sında ekspresyon seviyesinin artmış olduğu gözlemlendi. Ailesinde 2'den az kanser bulunan over kanserli hastalarda ise %76(35/46)'inde ekspresyon seviyesi azalmış, %24(11/46)'ünde ekspresyon seviyesi artmıştır.

Aile Hikayesi	miR-423-5p		miR-664b-5p		Toplam
	artmış	azalmış	artmış	azalmış	
Ekspresyon Durumu					
Ailede Over ve Meme Kanser Hikayesi	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
<2 kişi	45(%62,5)	38(%69)	30(%61,2)	53(%68)	83(%65,3)
>=2 kişi	27(%37,5)	17(%31)	19(%38,8)	25(%32)	44(%34,7)
Toplam	72(%56,7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127
Ailede Diğer Kanser Hikayesi					

<2 kişi	28(%38,9)	18(%32,7)	11(%22,4)	35(%44,8)	46(%36,2)
>=2 kişi	44(%61,1)	37(%67,3)	38(%77,6)	43(%55,2)	81(%63,8)
Toplam	72(%56.7)	55(%43,3)	49(%38,5)	78(%61,5)	127

Tablo 4-5: miR-423-5p ve miR-664b-5p ekspresyon durumlarının aile hikayesi ile ilişkisi



5. TARTIŞMA

Over kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık görülen 7. kanser olup, meme ve serviks kanseri sonrası en yaygın üçüncü kadın kanseridir ve insidansı 100.000'de 10-15'dir. Ayrıca dünya çapında kadınlarda en ölümcül olan 5. kanserdir [12]. Over tümörü etiyolojisi hakkındaki bilgiler arttıkça, hastalığın tedavisine ilişkin moleküler hedefli tedaviler ve sürecin izlenmesine ilişkin moleküler-biyolojik belirteçlerin önemi giderek artmaktadır. Geçtiğimiz dekattan bu yana birden fazla kanseri hedef alan, birçok küçük molekülü inhibitörler ve monoklonal antikorlar klinikte kullanılmaktadır. Bununla birlikte, over kanserinin erken teşhisinde, tedavi sürecinde ve terapötiklerin etkilerinin izlenmesinde daha etkin ve özgün biyolojik belirteçlere gereksinim duyulmaktadır [22]. Son yıllarda tanımlanan miRNA'lar, over kanserinin etiyolojisinde yeni ve ümit vaat eden moleküller olarak bildirilmektedir [1]. Over kanserinde miRNA moleküllerinin biyolojik belirteç potansiyelleri over kanseri için klinikte kullanımı yaygın olan CA125 tümör markeri ile karşılaştırılarak ölçülmüştür ve over kanserinin erken teşhisinde miRNA'ların daha güçlü bir belirteç olarak bildirilmiştir [54]. miRNA moleküllerinin ekspresyonlarının artışı ya da azalışı gerek kanser tedavisinde bir ajan olarak gerekse bir biyolojik marker olarak kullanılma potansiyeli taşımaktadır [55][56][57]. Özetle, doku ve kandaki miRNA ekspresyon profilleri olarak over kanserinin tanısı ve tedavisi için kullanılabilir moleküllerdir.

Sunulan tez çalışmasında, daha önce grubumuz tarafından yüksek riskli over kanserli ailelerde yapılan miRNA çalışmasından elde edilen bulgular sonucunda, ailesel ve sporadik over kanserli hastalarda over kanseri etiyoloji açısından önemli olduğu saptanan miRNA'lar arasından seçilmiş, miR-423-5p ve miR-664b-5p adlı iki miRNA'nın ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Bu tez çalışmasında, söz konusu miRNA'ların bir yandan over kanseri etiyolojisi, tanısı ve diyagnozundaki yeri araştırılırken bir yandan da validasyonlarının yapılması ve over kanserindeki dağılımlarının belirlenmesi hedeflendi. Çalışmada toplamda 127 over kanserli hasta ve 98 sağlıklı kontrole ait periferik kan lenfositleri kullanıldı. Çalışmamızda, miR-423-5p ve miR-664b-5p miRNA'larının over kanserli vaka ve sağlıklı kontrollerin periferik kan lenfositlerinde, hastalarda kontrollere göre her iki miRNA ekspresyonlarının anlamlı derecede artmış olduğu saptanmıştır ($p=0,000$). Over kanser hasta alt gruplarında ise her

iki miRNA için sadece over kanserli, over ve meme kanserli, over ve diğer ikincil tümörü bulunan hastalarda ekspresyon durumu kontrol grubuna göre yüksek derecede artış gösterirken, over ve endometriyum kanserli hastalarda ekspresyon durumu kontrol grubuna göre azalış göstermiştir.

miR-423-5p sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. miR423-5p ekspresyonunun periferik kandaki lenfositlerde değerlendirilmesi ve miR-664b-5p'nin over kanserindeki varlığına ilişkin bildirimler ise bu tez çalışması ile ilk kez tarafımızdan yapılmıştır.

Literatürde kısıtlı sayıda over kanserli hasta tümör dokusu ve hastalara ait plazmada miR-423-5p'nin tanısal bir belirteç olduğu, over kanser metastazı ve progresyonu ile ilişkilendirilmiştir [58]. Yine miR-423-5p'nin kolon ve mide kanserlerinde apoptozu stimule ederek kolon kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlediği [59], tümör baskılayıcı bir molekül olan TFF1'i inhibe ederek mide kanser hücre proliferasyon ve invazyonunda etkili olduğu bildirmiştir [50]. Bundan başka Wan ve ark. miR-423-5p'nin aşırı ekspresyonunun glioma kök hücrelerinin apigenin duyarlılığını azalttığını [60], glioma hücre proliferasyonunu, anjiyogenezini ve in vitro'da invazyonu kolaylaştırdığı gösterilmiştir [64]. Bu iki çalışma birlikte ele alındığında, miRNA'nın aşırı eksprese olduğu onkojenik kanserlerde, apigenin ile indüklenen apoptoz mekanizmasının ciddi şekilde bozulduğu görülmüştür. miR-423-5p'nin glioma kök hücrelerinde sıklıkla aşırı eksprese edildiği ve miR-423-5p inhibitörlerinin kullanımında belirgin şekilde artmış apigenin kaynaklı apoptozun geliştiği de bildirilmiştir [63]. Bir başka çalışmada yine miR-423-5p'nin aşırı ekspresyonunun, LAD (İnsan mast hücre soyu LAD1 ve LAD2) hücrelerinin koloni oluşumunu, hareketliliğini, migrasyonu ve invazyon kapasitesini arttırdığı [61], farelerle yapılan çalışmalarda ise tümörjenez ve beyin metastazını indüklediği bildirilmiştir [62]. Bu sonuçlar, miR-423-5p'nin metastazda vazgeçilmez olduğunu, miRNA-423-5p'nin over kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü ve potansiyel olarak negatif bir biyolojik belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar da miR-423-5p'nin biyolojik bir belirteç olarak kullanılabileceği ve metastatik potansiyeli gösterebileceği yönündedir. Kanser ölümlerinin yaklaşık %90'ının metastaza bağlı ölümler olduğu düşünülürse miR-423-5p'nin metastazın önceden tahmin edilmesinde

bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği, anti-terapötik ajan olarak kullanıldığında ise metastazı durdurabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda incelemiş olduğumuz bir diğer miRNA olan miR-664b-5p ile ilgili literatürde yayınlanmış bir çalışmada bulunmaktadır. Bu çalışmada da söz konusu miR-664b-5p'nin bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü ve *BRCA1* mutasyonlu triple negatif meme kanserli hastalarda, CCNE2'yi hedef alarak kemoterapi duyarlılığında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir [9]. Literatürdeki tek çalışma olan, BRCA1 mutasyonlu triple negatif meme kanserlerinde yapılan bu çalışmada miR-664b-5p'nin ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Over kanserli vakaların periferik kan lenfositlerinde yapılan çalışmamızda genel olarak over kanser hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre miR-664-5p ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Ancak miR-664b-5p ekspresyon düzeyi BRCA gen mutasyonu varlığına göre değerlendirildiğinde; BRCA mutasyonu pozitif olan grubun %64'ünde azalmış olduğu görülmüştür. Tezin giriş ve amaç kısmında da belirtildiği gibi grubumuz tarafından daha önce yapılan preliminer çalışmada, miR-664b-5p'nin ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilen over kanser vakasının *BRCA1* gen mutasyonu taşıyıcısı olması, meme kanserli vakalarda yapılan literatürdeki tek çalışma ile ve tez çalışmasında BRCA mutasyonlu hasta alt grubu ile örtüşmekte ve bu grupta hastaların %64'ünde miR-664-5p ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Ancak sunulan tez çalışmasında diğer çalışmalardan farklı olarak BRCA mutasyonu açısından negatif olan over kanserli vakaların %60,8'inde de miR-644-5p ekspresyonunda azalma görülmektedir. Bu bulgular miR-664-5p ekspresyonundaki azalışın BRCA mutasyon varlığından bağımsız olduğu düşündürmektedir.

Çalışmamızda her iki miRNA için hem over hem de endometriyum kanseri tanısı almış hastalarda, gerek miR-423-5p gerekse miR-664b-5p ekspresyon

seviyelerinin azaldığı saptanmıştır. Bu şekilde tanı alan vaka sayısı az olmakla beraber her iki miRNA'nın gelecekteki çalışmalarda endometriyum kanserli vakalarda araştırılması uygun olacaktır. Özetle, bu çalışmada her iki miRNA molekülünün over kanseri için non-invaziv biyolojik belirteç olma potansiyeli olduğu anlaşılmış olmakla birlikte söz konusu moleküllerin tümör dokusu üzerinde gösterilmesi ile diyagnostik, tedavi sırasında belli aralıklarla ölçülmesi ile prognostik yararının belirlenmesi gelecekteki çalışmalarla mümkün olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Li, Y., et al., *MicroRNAs in ovarian function and disorders*. J Ovarian Res, 2015. **8**: p. 51.
2. Jackson RJ, S.N., *How do microRNAs regulate gene expression?* . 2007: p. 1:367.
3. Bennasser, Y., et al., *HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets*. Retrovirology, 2004. **1**: p. 43.
4. Nicoloso, M.S., et al., *MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 293-302.
5. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
6. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
7. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
8. Reid, B.M., J.B. Permuth, and T.A. Sellers, *Epidemiology of ovarian cancer: a review*. Cancer Biol Med, 2017. **14**(1): p. 9-32.
9. Song, W., et al., *PARP inhibitor increases chemosensitivity by upregulating miR-664b-5p in BRCA1-mutated triple-negative breast cancer*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 42319.
10. Xu, B., et al., *Characterization of microRNA profile in human cumulus granulosa cells: Identification of microRNAs that regulate Notch signaling and are associated with PCOS*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **404**: p. 26-36.
11. https://womentowomenhealthcare.com/ovarian-cysts/female-reproductive-system_0/.
12. Statistics, I.W.O.C., 2017.
13. Malvezzi, M., et al., *Global trends and predictions in ovarian cancer mortality*. Ann Oncol, 2016. **27**(11): p. 2017-2025.
14. Karim-Kos, H.E., et al., *Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s*. Eur J Cancer, 2008. **44**(10): p. 1345-89.
15. De Angelis, R., et al., *Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCORE--5-a population-based study*. Lancet Oncol, 2014. **15**(1): p. 23-34.
16. Bast, R.C., Jr., B. Hennessy, and G.B. Mills, *The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(6): p. 415-28.
17. Marquez, R.T., et al., *Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium, and colon*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(17): p. 6116-26.
18. Kurman, R.J., *Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma*. Ann Oncol, 2013. **24 Suppl 10**: p. x16-21.
19. Rossing, M.A., et al., *Ovarian tumors in a cohort of infertile women*. N Engl J Med, 1994. **331**(12): p. 771-6.

20. Reigstad, M.M., et al., *Cancer Risk in Women Treated with Fertility Drugs According to Parity Status-A Registry-based Cohort Study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017. **26**(6): p. 953-962.
21. Coetzee, S.G., et al., *Cell-type-specific enrichment of risk-associated regulatory elements at ovarian cancer susceptibility loci*. *Hum Mol Genet*, 2015. **24**(13): p. 3595-607.
22. Di Leva, G. and C.M. Croce, *miRNA profiling of cancer*. *Curr Opin Genet Dev*, 2013. **23**(1): p. 3-11.
23. Bray, F., et al., *Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration*. *Int J Cancer*, 2015. **137**(9): p. 2060-71.
24. *Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov). Seer*Stat Database: Incidence-SEER 18 Regs Research Data+Hurricane Katrina impacted Louisiana Cases*. 2015.
25. Daly, M.B., et al., *Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, version 1.2014*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2014. **12**(9): p. 1326-38.
26. Clarke-Pearson, D.L., *Clinical practice. Screening for ovarian cancer*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(2): p. 170-7.
27. Kinoshita, Y., et al., *The role of microRNAs in ovarian cancer*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 249393.
28. Pal, M.K., et al., *MicroRNA: a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer*. *Cancer Biol Med*, 2015. **12**(4): p. 328-41.
29. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
30. Pencheva, N. and S.F. Tavazoie, *Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks*. *Nature Cell Biology*, 2013. **15**(6): p. 546-554.
31. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(8): p. 509-24.
32. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. *Genes Dev*, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
33. Kim, V.N., *MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export*. *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(4): p. 156-9.
34. Ghanbar Mahmoodi Chalbatani, H.D., Elahe Gharagozlou, Habibollah Mahmoodzadeh, Elham Zeinalinia, Omaid Rezaeian, Parisa Pilvar, Milad Ardaneh, Saeed Meghdadi, Fereidoon Memari and Nargesyousefi Rad, *Microrna a New Gate in Cancer and Human Disease: A Review*
35. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature*, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
36. Pan, X., Z.X. Wang, and R. Wang, *MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer*. *Cancer Biol Ther*, 2010. **10**(12): p. 1224-32.
37. Lin, J., et al., *MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G(1)/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(11): p. 1641-7.
38. Arriola, E., et al., *Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines*. *Lab Invest*, 2008. **88**(5): p. 491-503.
39. Kontorovich, T., et al., *Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(3): p. 589-97.

40. Hu, Y., et al., *MicroRNA sequence polymorphisms and the risk of different types of cancer*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 3648.
41. Smith, R.A., et al., *A genetic variant located in miR-423 is associated with reduced breast cancer risk*. Cancer Genomics Proteomics, 2012. **9**(3): p. 115-8.
42. Ye, Y., et al., *Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk*. Cancer Prev Res (Phila), 2008. **1**(6): p. 460-9.
43. Lin, J., et al., *Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with renal cell carcinoma*. Carcinogenesis, 2010. **31**(10): p. 1805-12.
44. Bao, B.Y., et al., *Polymorphisms inside microRNAs and microRNA target sites predict clinical outcomes in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(4): p. 928-36.
45. Chen, Q.H., Q.B. Wang, and B. Zhang, *Ethnicity modifies the association between functional microRNA polymorphisms and breast cancer risk: a HuGE meta-analysis*. Tumour Biol, 2014. **35**(1): p. 529-43.
46. Farazi, T.A., et al., *MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing*. Cancer Res, 2011. **71**(13): p. 4443-53.
47. Boren, T., et al., *MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis*. Gynecol Oncol, 2008. **110**(2): p. 206-15.
48. Hui, A.B., et al., *Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(4): p. 1129-39.
49. Guan, G., et al., *microRNA-423-3p promotes tumor progression via modulation of AdipoR2 in laryngeal carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(9): p. 5683-91.
50. Liu, J., et al., *miRNA423-5p regulates cell proliferation and invasion by targeting trefoil factor 1 in gastric cancer cells*. Cancer Lett, 2014. **347**(1): p. 98-104.
51. Wang, Z., et al., *Upregulation of miR-2861 and miR-451 expression in papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis*. Med Oncol, 2013. **30**(2): p. 577.
52. Chen, Y.X., et al., *[Differential expression analysis of prolactinoma-related microRNAs]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2012. **92**(5): p. 320-3.
53. <http://bmi.ana.med.uni-muenchen.de/mirad/miRNA/human/hsa-mir-664b/>.
54. Resnick, K.E., et al., *The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform*. Gynecol Oncol, 2009. **112**(1): p. 55-9.
55. Krutzfeldt, J., et al., *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 685-9.
56. Elmen, J., et al., *Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(4): p. 1153-62.
57. Kota, J., et al., *Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1005-17.
58. Tang, X., et al., *miR-423-5p serves as a diagnostic indicator and inhibits the proliferation and invasion of ovarian cancer*. Exp Ther Med, 2018. **15**(6): p. 4723-4730.
59. Jia, W., et al., *MicroRNA-423-5p inhibits colon cancer growth by promoting caspase-dependent apoptosis*. Exp Ther Med, 2018. **16**(2): p. 1225-1231.

60. Wan, Y., et al., *miR-423-5p knockdown enhances the sensitivity of glioma stem cells to apigenin through the mitochondrial pathway*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(4): p. 1010428317695526.
61. Sun, G., et al., *MiR-423-5p in brain metastasis: potential role in diagnostics and molecular biology*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(10): p. 936.
62. Mehlen P, P.A., *Metastasis: a question of life or death*. 2006.
63. Farooq, U.O.R.A.M.A.R.S.S.A.B.A.U.Y.S.L.H.W.B.O.A.A., *Apigenin as an effective anticancer natural product: Spotlight on TRAIL, WNT/ β -catenin, JAK-STAT pathways, and microRNAs*.
64. Li, S., et al., *miR-423-5p contributes to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastomas*. *Neuro Oncol*, 2017. **19**(1): p. 55-65.



HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 30/03/2018-121108



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Onkoloji Enstitüsü Müdürlüğü



Sayı :70973125-604.01.01-
Konu :Büşra KURT'un Çalışması hk

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA
(Etik Kurulu)

Enstitümüz Temel Onkoloji Anabilim Dalına bağlı Kanser Genetiği Bilim Dalında Prof.Dr.Hülya YAZICI'nın, danışmanlığında Yüksek Lisans eğitimine devam eden Büşra KURT'un, Ailesel ve sporadik over kanserli hastalarda miR423-5p ve miR664b-5p'nin araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tez çalışmasını Enstitümüzde yapması Akademik Koordinasyon Kurulumuzca uygun görülmüş olup, Etik Kurulumuzca değerlendirilmesi için bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Ahmet KIZIR
Enstitü Müdürü

Doğrulamak için: <http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BEA9C3YCS>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Gülşay ALAGÖZ Dahili : 0212 414 24 34-34150

İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Çapa – 34093 İstanbul

Tel : 0212 414 24 34 Faks : 0212 534 80 78

e-posta : iuonkoloji@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.onkoloji.istanbul.edu.tr




Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununu Gereğince E-İmzalıdır.

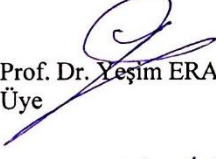
Doğrulamak için : <http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BEA9C3YCS>

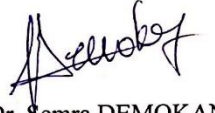
30.03.2018 Tarihli Akademik Koordinasyon Kurulu (AKK) Toplantı Kararı:

2) Enstitümüz öğrencilerinden Büşra KURT'un, "Ailesel ve sporadik over kanserli hastalarda miR423-5p ve miR664b-5p'nin araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tez çalışmasını Prof.Dr. Hülya YAZICI'nın, gözetiminde Enstitümüzde yapması Akademik Koordinasyon Kurulumuzca uygun görülmüştür.



Prof. Dr. Ahmet KIZIR
Başkan

Prof. Dr. Sezai VATANSEVER
Üye


Prof. Dr. Yeşim ERALP
Üye


Prof. Dr. Semra DEMOKAN
Üye


Doç. Dr. Merva SOLUK TEKKEŞİN
Üye


Yard. Doç. Dr. Murat OKUTAN
Üye

Yard. Doç. Dr. Süleyman BADEMLER
Üye



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AİLESEL ve SPORADİK OVER KANSERLİ HASTALARDA miR-423-5p ve miR-664b-5p'NİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%7 BENZERLİK ENDEKSİ	%4 İNTERNET KAYNAKLARI	%3 YAYINLAR	%6 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%2
2	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	HİTİT, Mustafa, KURAR, Ercan and GÜZELOĞLU, Aydın. "MikroRNA Biyogenezi", Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2015. Yayın	%1
4	Submitted to Sakarya University Öğrenci Ödevi	<%1
5	ovarianresearch.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	<%1
6	BAŞGÖL, Şükran and ASLAN, Ergül. "Over Kanserli Kadınlarda Fertilitiyi Koruyucu Yaklaşımlar ve Hemşirenin Rolü", Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma, 2012. Yayın	<%1

edergi.sdu.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	BÜŞRA	Soyadı	KURT
Doğ.Yeri	BAHÇELİEVLER/İST.	Doğ.Tar.	10.10.1992
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	22838207888
Email	bbusrakurt92@gmail.com	Tel	05330281484

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2019
Lisans	Fatih Üniversitesi	2015
Lise	Nakipoğlu Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	İngilizce Öğretmeni	Adem Çelik	Şubat 2016- Haziran2016
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/YDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi		
Rusça	Zayıf	Zayıf	Zayıf		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):