

BURHANETTİN YALÇINKAYA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

HEPATOSELÜLER KARSİNOMA HASTALIĞININ
TANISINDA VE İZLENMESİNDE KULLANILABİLECEK
BİYO-BELİRTEÇ TARANMASI

BURHANETTİN YALÇINKAYA

DANIŞMAN
PROF. DR. SADRETTİN PENÇE

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI

İSTANBUL-2018

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

(DOKTORA TEZİ)

**HEPATOSELÜLER KARSİNOMA HASTALIĞININ
TANISINDA VE İZLENMESİNDE KULLANILABİLECEK
BİYO-BELİRTEÇ TARANMASI**

BURHANETTİN YALÇINKAYA

**DANIŞMAN
PROF. DR. SADRETTİN PENÇE**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi Burhanettin YALÇINKAYA tarafından Prof. Dr. Sadrettin PENÇE'nin danışmanlığında hazırlanan **"Hepatoselüler Karsinoma Hastalığının Tanısında ve İzlenmesinde Kullanılabilecek Biyo-Belirteç Taranması "** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 03 / 12 /2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri (Danışman)

Prof. Dr. Sadrettin PENÇE
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Ahmet ARMAN
Marmara Ü. Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik A.D.

Jüri

Prof. Dr. Arzu ERGEN
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Doç. Dr. Mustafa DUMAN
SBÜ Kartal Koşuyolu Hast.
Gastroenteroloji Cerrahisi Kliniği

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.

Burhanettin YALÇINKAYA

İTHAF

Başta bu tez projesine gönüllü olarak katılan Hepatoselüler karsinoma hastaları olmak üzere, tüm kanser hastalarına...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım günden beri, tüm bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Sadrettin PENÇE'ye,

Hem laboratuvar çalışmalarında hem de akademik çalışmalarda bilgi ve deneyimlerini hiç bir zaman esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Müslüm AKGÖZ'e

Doktora eğitimim sürecinde verdikleri değerli bilgiler için Prof. Dr. İlhan Yaylım, Prof. Dr. H. Arzu Ergen, Prof. Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan, Prof. Dr. Oğuz Öztürk, Prof. Dr. Ş. Ümit Zeybek ve Prof. Dr. Bedia Ağaçhan'a

Hasta ve kontrol grubu örneklerin toplanmasında büyük emekleri olan Doç. Dr. Fatih GÜZELBULUT, Doç. Dr. Didem TAŞTEKİN, Doç. Dr. Mustafa DUMAN ve Dr. Hani ALSAADONİ'ye,

Değerli mesai arkadaşlarım, TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü Biyoanaliz laboratuvarı çalışanlarına, miRNA deneylerinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Dr. Esra GÜZEL'e, Dr. Engin AYDIN'a, NMR çalışmalarında verdiği destek için Dr. İlker ÜN'e, her zaman yanımda olan değerli dostum Ferudun KOÇER'e

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde büyük katkıları olan tüm hasta ve kontrol gönüllülere,

Dünya'ya gözlerimi açtığım ilk günden bu yana bıkmadan ve usanmadan hep yanımda olan sevgili Annem ve Babama, Ablama ve Kardeşime,

Kıymetli eşim ve çok değerli oyun zamanlarından izin vererek bu tezi yazmama fırsat veren sevgili Kızıma,

Çalışmalarımın büyük çoğunluğu yapmama fırsat veren değerli TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü yöneticilerine, teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer.....	3
2.2. Hepatoselüler karsinoma.....	4
2.2.1. Risk Faktörleri.....	5
2.2.1.1. Hepatit C	6
2.2.2. Epigenetik Faktörler.....	7
2.3. Mitokondri	7
2.3.1. Mitokondriyal Genom.....	10
2.3.2. Mitokondriyal hastalıklar	11
2.4. MikroRNA	11
2.4.1. miRNA biyogenezi	13
2.4.2. miRNA analiz yöntemleri	14
2.4.3. miRNA'nın mitokondri fonksiyonları üzerine etkisi	15
2.4.4. Hepatoselüler karsinoma'da miRNA	16
2.5. Cell-Free DNA (Serbest DNA).....	19
2.6. PD-1	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Gereç	22
3.2. Yöntem.....	24

3.2.1. Cell-Free DNA izolasyonu.....	24
3.2.1.1. Silica Jel Metodu-1	24
3.2.1.2. Fenol Kloroform Metodu-1.....	25
3.2.1.3. Fenol Kloroform Metodu-2.....	26
3.2.1.4. Amonyum Asetat Metodu	26
3.2.1.5. Sodium N-laurilsarkosin Metodu	27
3.2.1.6. Sodyum Asetat Metodu.....	27
3.2.1.7. Silica Jel Metodu-2	27
3.2.1.8. Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit.....	28
3.2.1.9. Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit	29
3.2.1.10. İzole edilen DNA'ların derişimlerinin belirlenmesi	30
3.2.1.11. İzole edilen DNA'ların miktarının belirlenmesi	30
3.2.1.12. İzole Edilen DNA'lardaki Safsızlıkların Nükleer Manyetik..... Rezonans(NMR) ile Belirlenmesi	31
3.2.2. RNA İzolasyonu.....	32
3.2.2.1. İzole edilen RNA'ların derişimlerinin belirlenmesi.....	33
3.2.3. cDNA sentezi	35
3.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR.....	37
3.2.5. PD-L1 Gen Kopya Sayısının Belirlenmesi	39
3.2.6. mtDNA kopya sayısının belirlenmesi	41
3.2.6.1. mtDNA ve Beta aktin primer ve prob optimizasyonu	42
3.2.7. İstatistiksel analiz.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Serbest DNA İzolasyon Yöntem Karşılaştırmasına Ait Bulgular.....	51
4.2. Hasta ve kontrol örneklere ait bilgiler	55
4.3. PD-L1/Beta aktin gen kopya sayısı değişim analiz bulguları	59
4.4. Serbest mtDNA kopya sayısı analiz bulguları	62
4.5. miRNA ekspresyon analizi bulguları.....	73
4.5.1. hsa-mir-33a ekspresyon seviyesi bulguları	73
4.5.2. hsa-mir-203b ekspresyon seviyesi bulguları.....	75
4.5.3. hsa-mir-361 Ekspresyon Seviyesi Bulguları.....	76
4.5.4. hsa-mir-424 ekspresyon seviyesi bulguları.....	78
5. TARTIŞMA	80

KAYNAKLAR	88
HAM VERİLER	99
5.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Primer ve Prob Bilgileri.....	99
5.2. PD-L1 Primer ve Prob Sekans Bilgileri.....	102
5.3. mtDNA Primer ve Prob Sekans Bilgileri.....	103
FORMLAR	107
ETİK KURUL KARARI	108
PATENT HAKKI İZNİ	110
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	111
ÖZGEÇMİŞ	112



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Kullanılan cihazlar	22
Tablo 3-2: Kullanılan kimyasallar	23
Tablo 3-3: PD-L1 cDNA sentezi ve gen ekspresyonu karışım protokolü	35
Tablo 3-4: PD-L1 cDNA sentezi ve gen ekspresyonu PCR protokolü.....	36
Tablo 3-5: PD-L1 primer-prob sekansı.....	36
Tablo 3-6: miRNA cDNA sentezi karışım protokolü	37
Tablo 3-7: Hedef ve kontrol miRNA listesi.....	38
Tablo 3-8: PD-L1 gen kopya sayısı primer prob optimizasyonu.....	39
Tablo 3-9: PD-L1 gen kopya sayısı multipleks primer prob optimizasyonu.....	40
Tablo 3-10: PD-L1 gen kopya sayısı multipleks qPCR koşulları.....	41
Tablo 3-11: mtDNA ve Beta aktin primer ve prob sekansları	42
Tablo 3-12: İleri ve geri primer karışım kombinasyonları	43
Tablo 3-13: 250 nmol prob ve master karışımı.....	44
Tablo 3-14: 150 nmol prob ve master karışımı.....	44
Tablo 3-15: Sekiz farklı PCR kombinasyon protokolü	45
Tablo 3-16: qPCR koşulları	45
Tablo 3-17: dPCR mtDNA reaksiyon karışımı.....	47
Tablo 3-18: dPCR Beta aktin reaksiyon karışımı	47
Tablo 3-19: dPCR koşulları	48
Tablo 4-1: Farklı izolasyon yöntemlere ait serbest DNA konsantrasyonları.....	51
Tablo 4-2: Farklı izolasyon yöntemlerinde NMR safsızlık değerleri	52
Tablo 4-3: Tüm izolasyon yöntemlerinin nükleer DNA qPCR Ct değerleri	53
Tablo 4-4: Tüm izolasyon yöntemlerinin qPCR mtDNA Ct değerleri	54
Tablo 4-5: Hastalardan izole edilen RNA'ların optik dansite sonuçları.....	57
Tablo 4-6: Kontrollerden izole edilen RNA'ların optik dansite sonuçları	58
Tablo 4-7: Kontrol grubu PD-L1/Beta aktin Ct değerleri.....	60
Tablo 4-8: Hasta grubu PD-L1/Beta aktin Ct değerleri	61
Tablo 4-9: Hastalardan izole edilen DNA'ların optik dansite sonuçları	62
Tablo 4-10: Kontrollerden izole edilen DNA'ların optik dansite sonuçları	63
Tablo 4-11: Hasta grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni qPCR Ct değerleri	65

Tablo 4-12: Kontrol grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni qPCR Ct değerleri ..	66
Tablo 4-13: Hasta grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni kopya sayısı değerleri	68
Tablo 4-14: Kontrol grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni kopya sayısı.....	
değerleri	69
Tablo 4-15: mtDNA-Beta aktin kopya sayısı dağılım değerleri.....	70
Tablo 4-16: Hasta ve kontrol grubu mtDNA kopya sayısının Beta aktin gen kopyasayısına oranı Mann-Whitney test değerleri	71
Tablo 4-17: hsa-mir-33a ekspresyon seviyesi dağılım değerleri	73
Tablo 4-18: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-33a t-test değerleri	74
Tablo 4-19: hsa-mir-203b ekspresyon seviyesi dağılım değerleri.....	75
Tablo 4-20: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-203b ekspresyon dağılım grafiği	75
Tablo 4-21: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-203b Mann-Whitney test değerleri	76
Tablo 4-22: hsa-mir-361 ekspresyon seviyesi dağılım değerleri.....	76
Tablo 4-23: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-361 ekspresyon dağılım grafiği	77
Tablo 4-24: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-361-3p t-test değerleri.....	77
Tablo 4-25: hsa-mir-424 ekspresyon seviyesi dağılım değerleri.....	78
Tablo 4-26: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-424 ekspresyon dağılım grafiği	78
Tablo 4-27: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-424 t-test değerleri	79

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Karaciğerin genel görüntüsü	3
Şekil 2-2: HCV genel görünümü	6
Şekil 2-3: Mitokondri genel görünümü	8
Şekil 2-4: Apoptozom oluşumu	9
Şekil 2-5: Mitokondriyel genom.....	10
Şekil 2-6: miRNA biyogenezi.....	14
Şekil 2-7: HCC miRNA.....	18
Şekil 2-8: Serbest DNA oluşumu.....	20
Şekil 2-9: PD-L1 ile T hücresi etkileşimi	21
Şekil 3-1: Çalışma planı.....	34
Şekil 3-2: dPCR çiplere DNA yükleme görüntüsü	48
Şekil 3-3: dPCR çip okutma görüntüsü	49
Şekil 3-4: QuantStudio 3D analiz yazılımı	49
Şekil 4-1: Hasta grubu Hepatit B ve Hepatit C dağılımı	56
Şekil 4-2: Hasta grubu Sigara ve Alkol kullanım dağılımı.....	56
Şekil 4-3: PD-L1 ve Beta aktin genleri agaroz jel elektroforezi.....	59
Şekil 4-4: Hasta ve kontrol grubu mtDNA kopya sayısının Beta aktin gen kopyasayısına oran dağılım grafiği	70
Şekil 4-5: Çiplerden okunan FAM ve HEX (VIC) absorbans örnek değerleri ve..... görüntüleri.....	72
Şekil 4-6: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-33a ekspresyon dağılım grafiği.....	74

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
Ct	: Eşik değeri (Cycle threshold)
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
GZ-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate buffered saline)
k/μl	: Kopya/mikrolitre
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
qRT-PZR	: Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Real-Time PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TE	: Tris EDTA
μl	: Mikrolitre

ÖZET

Yalçinkaya, B. (2018). Hepatoselüler karsinoma hastalığının tanısında ve izlenmesinde kullanılabilecek biyo-belirteç taranması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Hücrelerin kontrolsüz ve düzensiz çoğalması sonucu doku veya organlarda meydana getirdiği anormallikler kanser olarak tanımlanır. Primer karaciğer tümörlerinin %80-90'ını oluşturan Hepatoselüler karsinoma, özellikle kronik Hepatit B (%80) ve kronik Hepatit C enfeksiyonundan kaynaklanır. Günümüzde, araştırmacılar tarafından hastalıkların erken teşhisi için biyo-belirteç analizleri gerçekleştirilmektedir. Bunlardan birisi de serbest DNA analizleridir. Serbest DNA'lar hücre nekrozu veya apoptoz sonucu vücut sıvılarına salınırlar. Hücre nekrozu sonrası vücut sıvılarına salınan DNA, tümör dokuyu temsil etmektedir. Serbest DNA'lar genomik DNA parçaları olduğu gibi mtDNA da olabilmektedir. Tamir mekanizması zayıf olan mtDNA çevresel etmenlere karşı aşırı duyarlı olduğundan kanserin moleküler mekanizmasında önemli rol aldığı bilinmektedir. mtDNA kopya sayısının bazı hastalıklarda artarken bazı hastalıklarda azaldığı bildirilmiştir.

Prognostik ve prediktif biyobelirteçler olabileceği düşünülen MikroRNA'lar, kodlayıcı özelliği olmayan küçük RNA parçacıklarıdır. Hücrede meydana gelen birçok olayda rol alırlar.

İmmünolojik aktivasyonda önemli role sahip olan PD-1 proteinin ligana sahip tümörler, T hücrelerindeki PD-L1 ile etkileşime girerek kendilerine karşı gelişen immünolojik savunmayı inhibe eder. Bu özelliğinden dolayı PD-L1 çeşitli kanser türlerinde etkin rol aldığı bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında, Hepatoselüler karsinomada mtDNA kopya sayısının değişimini belirlemek için 34 hasta ve 34 sağlıklı gönüllüden izole edilen DNA örneklerinde, ilk defa dijital PCR ile ve qPCR ile kesin miktar tayini yapılmıştır. Dijital PCR sonucuna göre hasta ve kontrol grubu arasındaki oranın 2,8 kat olduğu, qPCR analizi sonucu ise 1,7 kat olduğu belirlenmiştir.

Aynı hasta ve kontrol grubunda (hsa-mir-33a'nın 7,3 kat, hsa-mir-203b'nin 4,6 kat, hsa-mir361-3p'nin 5,1 kat daha az eksprese olduğu ve hsa-mir-424'ün ekspresyon seviyesinin ise hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir değişim göstermediği belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca PD-L1 geni ile Beta Aktin geni arasında kopya sayısı değişimi analizi gerçekleştirilmiştir., Hasta ve kontrol grubunda iki gen arasındaki kopya sayısı oran farkı anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca, serum/plazma örneklerinden serbest DNA izolasyonu için yöntem geliştirilmesi yapılmıştır. Bu amaçla ikisi ticari kit olmak üzere 9 farklı izolasyon yönteminin hem nükleer DNA hem de mtDNA referans alınarak qPCR ile karşılaştırılması yapılmıştır.

Bu çalışma sonucunda HCC hastalarında, mtDNA kopya sayısının, hsa-mir-33a'nın, hsa-mir-203b'nin ve hsa-mir361-3p'nin sağlıklı bireylere göre anlamlı farkı ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler : Hepatoselüler karsinoma, Serbest DNA, mtDNA, PD-L1, miRNA

ABSTRACT

Yalçinkaya, B. (2018). Screening of bio-markers for diagnosis and monitoring of Hepatocellular carcinoma. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine, Doctoral Thesis. İstanbul

Abnormalities of tissues or organs caused by uncontrolled and irregular proliferation of cells are defined as cancer. Hepatocellular carcinoma, which constitutes 80-90% of primary liver tumors, is caused by chronic Hepatitis B (80%) and chronic Hepatitis C infection. Nowadays, biomarker analyzes are conducted by the researchers for early diagnosis of diseases. One of them is cell free DNA analysis. Cell free DNAs are released into body fluids as a result of cell necrosis or apoptosis. DNA that is released into body fluids after cell necrosis represents the tumor tissue. Cell free DNAs can be genomic DNA fragments as well as mtDNA. It is known that mtDNA, which has a weak repair mechanism, is hypersensitive to environmental factors and has an important role in the molecular mechanism of cancer. It has been reported that the number of mtDNA copies increased in some diseases and decreased in some diseases.

MicroRNAs, which are considered to be prognostic and predictive biomarkers, are small RNA fragments without coding. They are involved in many events in the cell.

Tumors with PD-1 ligand can interact with PD-L1 in T cells to inhibit immunological defenses that develop against them. Because of this feature, PD-L1 is known to play an active role in various types of cancer.

In this thesis, to determine the change of mtDNA copy number in hepatocellular carcinoma, DNA samples isolated from 34 patients and 34 healthy volunteers were quantified by digital PCR and qPCR for the first time. According to the results of digital PCR, the ratio between the patient and the control group was 2.8 times, and the result of qPCR analysis was 1.7 times.

In the same patient and control group (hsa-mir-33a 7.3 times, hsa-mir-203b 4.6 times, hsa-mir361-3p 5.1 times less expressed and it was determined that the level of expression of hsa-mir-424 did not show any significant change between the patient and control group. In this study, copy number change analysis was performed between PD-L1 gene and Beta Actin gene. There was no significant difference in the number of copies between the two genes in the patient and control groups. In addition, new method was developed for cell free DNA isolation from serum / plasma samples. For this purpose, 9 different isolation methods, two of which are commercial kit, were compared with qPCR by reference to both nuclear DNA and mtDNA.

As a result of this study, significant difference was found between the number of mtDNA copies, hsa-mir-33a, hsa-mir-203b and hsa-mir361-3p in HCC patients compared to healthy individuals.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, Cell free DNA, mtDNA, PD-L1, miRNA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm dünya ülkelerinde ölümcül hastalıkların başında kanser gelmektedir. Türkiye İstatistik Kurumu 2017 tarihinde yayınlanan ve 2015-2016 tarihlerini kapsayan verilere göre, ülkemizde ölüm nedenleri arasında kanser ikinci sırada yer almaktadır (1). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu da dünya genelinde 2030 yılında 13,2 milyon kanser kaynaklı ölüm olacağını öngörmüşlerdir (2). Dünya genelinde yılda 250.000-1.000.000 arasında insan ölümüne sebep olan Hepatoselüler karsinoma, yetişkin erkeklerde görülen beşinci en sık kanserdir ve kanser ilişkili ölümlerde dördüncü sırada yer alır. Yetişkin kadınlarda ise, dokuzuncu en sık teşhis edilen kanserdir ve dünyada kanser ilişkili ölümlerde altıncı sırada yer alır (3,4).

Hücre organellerinden birisi olan mitokondri, sitrik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon ile ATP üretiminden sorumludur ve hücrenin enerji üretim merkezidir. Mitokondriler, nükleer DNA'dan bağımsız olarak replike olabilen yaklaşık 16,6 kb uzunluğunda, çift sarmal, 37 gen içeren halkasal formda mtDNA içermektedir. mtDNA'nın histonları ve intronları yoktur. Ayrıca, tamir mekanizması zayıftır bu yüzden mutasyon oranı nükleer genomdan yaklaşık 10 kat yüksektir. mtDNA'ların kodlanmayan D-loop bölgesi, mtDNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonundan sorumludur. Bu bölge ileri derecede polimorfizm göstermekte ve bölgedeki mutasyonlar (sıklığı malignansinin derecesiyle bağlantılıdır) mtDNA kopya sayısında değişikliğe ve mitokondriyal gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olmaktadır (4,5). Literatürde çeşitli malignitelerde mtDNA kopya sayısının değişiminin kantitatif PCR ile belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar vardır (6-8). Bu çalışmalarda sağlıklı hücreler ile kanser hücrelerinin mitokondrileri arasında hem fiziksel hem de kantitatif farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Örneğin, hızlı büyüyen tümörlerin mitokondrileri hem küçük ve kristalları daha az hem de kopya sayısı daha azdır. Yavaş büyüyen tümörlerde ise mitokondrileri yapısında ve sayısında ciddi fark yoktur.

mikroRNA (miRNA)'lar, 18-24 baz uzunluğunda, hücre içinde herhangi bir proteini kodlamayan, ancak, mRNAların proteinlere translasyonunu kontrol ederek post-transkripsiyonel susturma işlevi gösteren, gen ifadelerini düzenleyebilen küçük RNA molekülleridir. miRNA'ların proliferasyon, gelişim, farklılaşma ve apoptosis gibi

hücresel süreçlerde önemli rol oynadığından, insan kanserlerinde miRNA'ların önemli rolünün olduğu düşünülmektedir (9–11). Aynı zamanda, tümör oluşumunda epigenetik değişimler önemli roller üstlenmektedir ve biyoinformatik ve deneysel çalışmalar insan genlerinin %30'undan fazlasının miRNA'lar tarafından post-transkripsiyonel olarak düzenlendiğini göstermektedir (12).

PD-1 aktive olmuş T hücrelerinde bulunan ve immünolojik aktivasyonu sınırlandıran ve inhibe eden bir moleküldür. PD-1'e bağlanarak bu inhibisyonun gerçekleşmesini sağlayan iki ligandı (PDL-1 ve PDL-2) ise sadece antijen sunan hücrelerde değil tümör hücrelerinde de bulunabilmektedir. PD-1 ligandı olan tümörler, T hücrelerindeki PD-1'e bağlanarak kendilerine karşı gelişen immünolojik yanıtı inhibe edebilirler. Anti-PD-1 monoklonal antikoru PD-1'e bağlanarak ligandların bağlanmasını engelleyip immünolojik aktivasyonun inhibe edilmeden devam etmesini sağlar (13). Tümör hücrelerinde immüno-histokimyasal olarak PDL-1 olduğu gösterilen tümörlerde bu monoklonal antikor ile elde edilen yanıt oranının daha yüksek olabildiği gösterilmiştir (14).

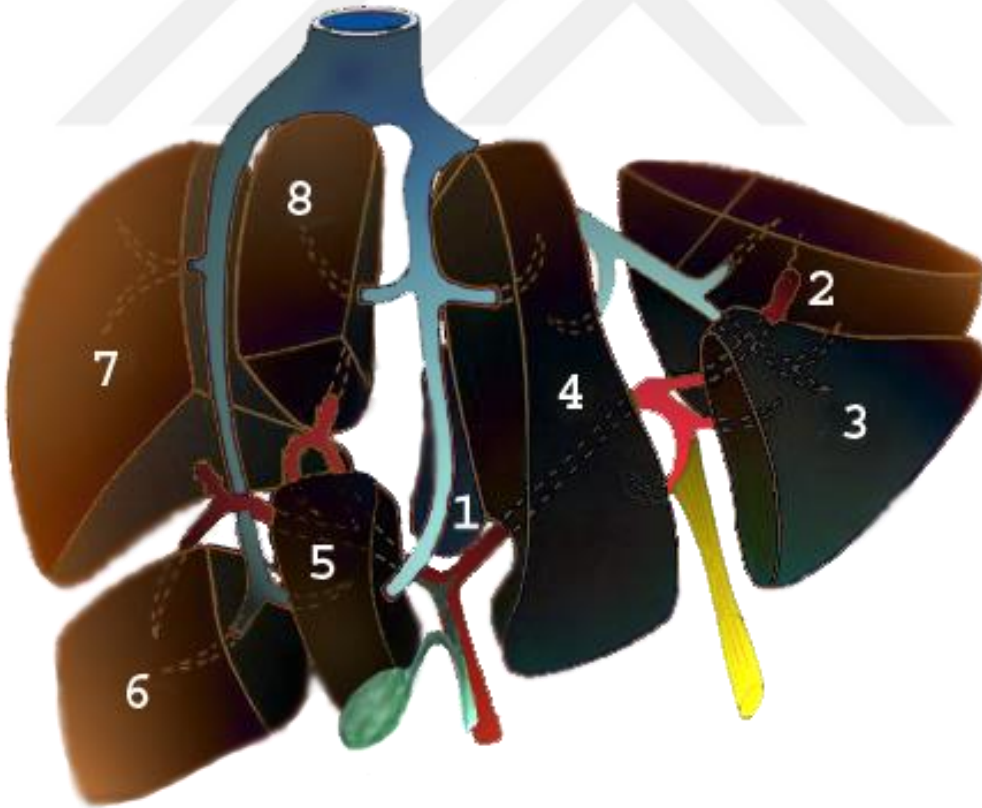
Hastalığın erken teşhisi ve takibinin hızlı ve pratik olarak yapılabilmesi, hayat kurtarıcı olabilmektedir. Hastalığın ortaya çıkması ile birlikte, dokularda, kanda ve diğer vücut sıvılarında, ortaya çıkan moleküller, biyo-belirteç olarak tanımlanmaktadır. Biyo-belirteçlerin keşfi, hastalıkların erken teşhisi, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi, takibinin hızlı ve pratik olarak yapılabilmesinin yanı sıra, gereksiz veya ihtiyaç fazlası ilaç kullanımının önüne geçerek hem hastaya hem de ülke ekonomisine katkı sağlamaktadır (15).

Son yıllarda hızla gelişen modern moleküler teknikler ile hastalıkların genetik faktörlerle ilişkisini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında da İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü ve İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi polikliniklerine başvuran 34 hasta ve hastalıkla ilişkisi olmayan 34 kontrol grubu bireylerden alınan kan örneklerinde, Hepatoselüler karsinoma hastalığının erken teşhisinde ve tedavisinin izlenmesinde kullanılabilecek biyo-belirteç olabileceği düşünülen, mtDNA kopya sayısı değişimi, miRNA (hsa-mir-33a, hsa-mir-203b, hsa-mir-361-3p ve hsa-mir-424) ekspresyon seviyelerinin değişimi ve PDL-1 ekspresyonu seviyesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

İnsan vücudunun yaklaşık %2-2,5'ini oluşturan Karaciğer, yetişkin erkeklerde 1400-1600 gr, yetişkin kadınlarda ise 1200-1400 gr ağırlığında, yaklaşık 25-30cm uzunluğunda, yukarıdan aşağıya 12-12,5 cm büyüklüğündedir. Bu hacim ve ağırlığıyla vücudun en büyük bezi olan karaciğer, hypochondriaca dextranın tümünü, ayrıca regio epigastrica'nın büyük çoğunluğunu doldurarak regio hypochondriaca sinistra'nın üst-iç bölümüne kadar uzanır. Karaciğere kan, Vena porta (%70-80) ve Arteria hepatica (%20-30) olmak üzere iki ayrı damardan gelir (16). Karaciğer, 1957 yılında Fransız cerrah Couinaud tarafından 8 segmente ayrılmış ve bu segmentlerin birbirinden bağımsız, vasküler ve biliyer drenajına sahip fonksiyonel parçacıklar olduğunu tanımlamıştır. Ayrıca karaciğerin orta hepatik ven ile sağ ve sol lob olmak üzere iki loba ayırmıştır(17–19) (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Karaciğerin genel görüntüsü

Hem endokrin hem de ekzokrin bez olan Karaciğer, vücutta gerçekleşen birçok kimyasal reaksiyonda rol almaktadır. Karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında anahtar rollere sahiptir. Yağların sindirimi için gerekli safrayı üretir, yağ asiti oksidasyonu sağlar. Lipoproteinlerin bir çoğunu karaciğer sentezler ve bu sayede kolesterol homeostazisini korur, kolesterol yüksek olması durumunda bunu safra asitine dönüştürür (20).

Vücuda alınan çoğu ilaç ve toksinler, böbreklerde süzülüp atılamadığından, hepatositlerdeki Sitokrom P 450 enziminin katıldığı reaksiyonlarla oksidasyona uğrayarak aktivitelerini yitirir ve metabolize edilirler (21,22). Metabolik artıkların üreye dönüştürülerek böbreklerden atılması, demir metabolizmasında, pıhtılaşma faktörlerinin sentezinde, bazı vitaminlerin depolanmasında, vücuda giren yabancı maddelerin fagositozunda görev alır (23).

Sağlıklı yetişkinlerde en çok enerjiye ihtiyaç duyulan organlardan biri olan karaciğerin her bir hücresinde yaklaşık 800-1000 adet mitokondri olduğu bildirilmiştir (24,25).

2.2. Hepatoselüler karsinoma

Hepatositlerden kaynaklanan Hepatoselüler karsinoma (HCC) ve intrahepatik safra kanallarından gelişen kolanjiyelüler karsinoma (CCC) primer karaciğer kanserinin en sık teşhis edilen türleridir. Primer karaciğer tümörlerinin %80-90'ını HCC oluşturmaktadır (26–28).

Görülme sıklığı giderek artmakta ve dünya genelinde yılda 250.000-1.000.000 arasında insan ölümüne sebep olmaktadır(29). Dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelenlerinden olan HCC, yetişkin erkeklerde görülen beşinci en sık kanserdir ve kanser ilişkili ölümlerde dördüncü sırada yer alır. Yetişkin kadınlarda ise, dokuzuncu en sık teşhis edilen kanserdir ve kanser ilişkili ölümlerde altıncı sırada yer alır (30).

Hepatoselüler karsinoma görülme sıklığı, cinsiyet, çevresel toksik etkiler, coğrafik konum ve etnik gruplar gibi çeşitli epidemiyolojik özelliklere göre değişiklik göstermektedir (31–33). Özellikle kronik Hepatit B (%80) ve kronik Hepatit C enfeksiyonundan kaynaklı olarak Uzakdoğu Asya'da en sık teşhis edilen ikinci ve güney Afrika'da en sık teşhis edilen dördüncü kanser türüdür. Bu durum ayrıca, yüksek miktarda aflatoksin maruziyeti ve aşırı alkol tüketimi ile ilişkilendirilmiştir(34).

Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığının 2003-2009 verilerine göre artan kronik hepatit sıklığına bağlı olarak HCC olgusunun görülme sıklığının giderek arttığı gözlemlenmiştir (31).

Literatürde Amerika ve kuzey Avrupa gibi gelişmiş ülkelerde HCC prevalansının diğer ülkelere oranla nispeten düşük olmasına rağmen, HCC insidansı giderek artan bir grafik sergilediği bildirilmiştir. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde, özellikle erkeklerde belirgin olarak, son yirmi yılda HCC insidansında %80'e yakın artış gözlemlenmiştir. Bu durumun kronik Hepatit C enfeksiyonundan kaynaklı ve Hepatit B taşıyıcıla göçmenlerin etkisinin olduğu bildirilmiştir (35).

HCC nadiren 50 yaşından önce görülür, hastalığın insidansı yaşla birlikte artmakta ve 65 yaşın üzerindeki kişilerde en yüksek prevalansa ulaşmaktadır. Son yirmi yılda hastalığın insidansının daha genç yaşlara kaydığı kaydedilmiştir. Hastalığın erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla iki ila dört kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (35,36). Bu durumun ortaya çıkmasındaki etmenlerin, Hepatit B, Hepatit C ve alkol tüketiminin erkeklerde daha yaygın olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (37).

2.2.1. Risk Faktörleri

Hepatoselüler karsinoma'nın ortaya çıkmasında en büyük etmen kronik viral Hepatit B ve Hepatit C'nin yer almasının yanı sıra, kalıtsal olduğu gibi, sonradan meydana gelen mutasyonlar, aflatoksin B1 maruziyeti gibi çevresel ajanlara maruz kalınması, aşırı alkol tüketimi ve sigara tüketimi sonucunda da ortaya çıkmaktadır (38). Demir birikimi, özellikle herediter hemokromatoz, HCC'nin meydana gelmesine neden olabilecek diğer dış etmenlerdir (39). Özellikle aşırı alkol tüketimi ve çevresel ajanlar sonucunda karaciğerde meydana gelen hasar sonucu siroz ortaya çıkabilmektedir. HCC daha çok kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda ortaya çıkar. Bu hastaların yaklaşık %80-90'ında siroz vardır (37,40). Ülkemizde siroz, en sık %56 oranında Hepatit B enfeksiyonu, %23,2 oran ile Hepatit C enfeksiyonu ve %15,9 oranda aşırı alkol tüketimi kaynaklı olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (41).

Sirozlu karaciğerde metabolik ve oksidatif hasar meydana gelir. Hücreler meydana gelen hasarın onarılması amacıyla, nekroz, tekrarlanan rejenerasyon ve inflamasyon gibi yolları kullanırlar. Bunun sonucunda, hücrelerin protein, lipid ve DNA molekülleri hasara uğrarlar. Kromozom parçasının kopması, nokta mutasyonları,

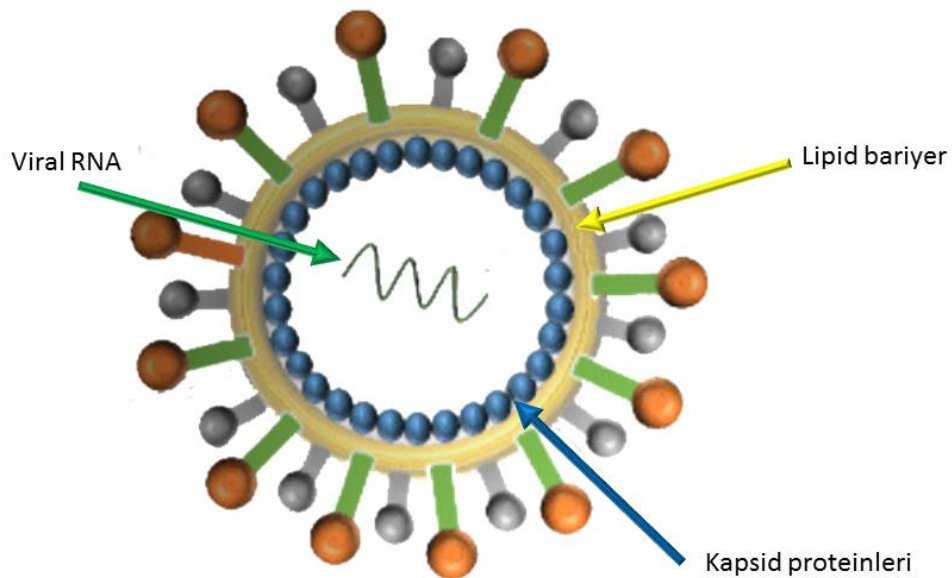
telomer kaybı, telomeraz aktivitesi kaybı gibi genetik hataların ortaya çıkması ile pro-onkojenik ortamın oluşumunda rol alır (42,43).

HCC'nin ortaya çıkmasındaki bir diğer etmen ise sigara kullanımı olarak görülmektedir. Sigara kullanan bireylerin kulanmayanlara oranla yaklaşık bir buçuk kat daha fazla hastalığa yakalanma riski taşımaktadır. Sigrada bulunan aminofenil ve polisiklik aromatik hidrokarbonların DNA zincirine bağlanarak karsinogeneze neden olduğu düşünülmektedir (44).

2.2.1.1. Hepatit C

Kronik karaciğer hastalığının en önemli nedenlerinden biri Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonudur (45). HCV 40-50nm boyutlarında, zarflı, tek zincirli RNA'ya sahip Hepacivirus genusundan olan canlı türüdür (46) (Şekil 2-2).

Dünya genelinde toplam nüfusun yaklaşık %2.5'i, 177.5 milyon yetişkin enfekte kişi olduğu bildirilmiştir (47). Ülkemizde ise HCV enfekte kişi sayısının toplam nüfusa oranının %1. civarında olduğu bildirilmiştir (48). HCV'nin 6 farklı majör genotipi vardır ve bunlardan genotip 1, %49,1 görülme sıklığı ile en sık rastlanan formudur (47). HCV'nin hepatoselüler karsinomaya neden olan etkenler arasında yer almasının yanında kronik hepatit, karaciğer yetmezliğine neden olmaktadır.



Şekil 2-2: HCV genel görünümü (49)

2.2.2. Epigenetik Faktörler

Hepatoselüler karsinoma insidansının giderek artması, çeşitli farklı genetik ve epigenetik değişikliklere dayandırılmaktadır. DNA sekansının herhangi bir değişime uğramadan gen ekspresyon seviyesinin değiştiği kalıtsal durum, epigenetik olarak adlandırılmaktadır. HCC’da meydana gelen epigenetik değişikliklerin başında mikroRNA’ların anormal ekspresyonu, uzun kodlanmayan RNA’lar, DNA’nın hipometilasyonu veya hipermetilasyonu, histon modifikasyonu gelmektedir. Bu değişiklikler hastalığın ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde rol almaktadır (50,51).

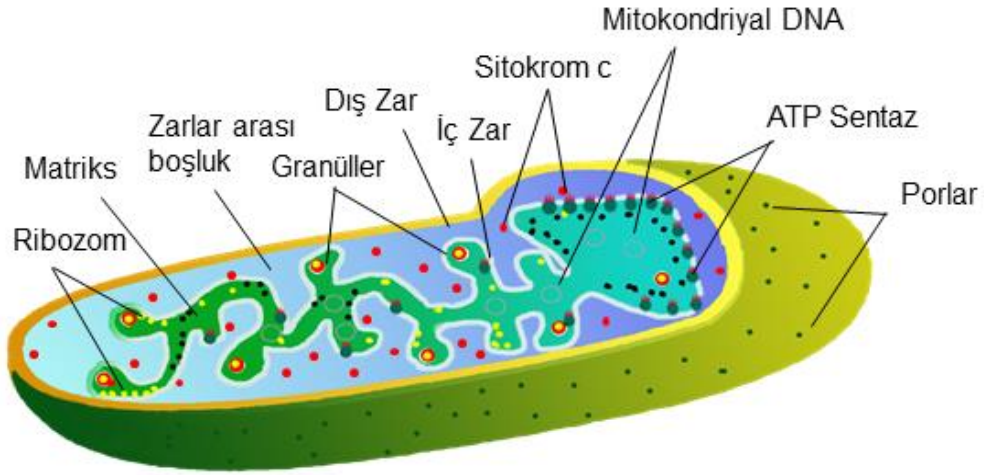
Literatürde %56’sı Hepatit B ve %84’ü Haptit C ilişkili HCC hastalarında, p16 tümör geninin promotor bölgesindeki CpG adalarında metilasyon taraması yapılmış ve hastaların %73’ünde hipermetilasyon olduğu gözlemlenmiştir (52).

İşlevsel protein içermeyen, uzun kodlamayan RNA’lar (lncRNA’lar), gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasında, ve çeşitli hücrel süreçlerde rol aldığından araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Literatürde lncRNA’ların HCC’nin moleküler mekanizmasında rol alarak, hastalığın gelişmesinde ve ilerlemesinde rol aldığını bildirir çalışmalar bulunmaktadır (53,54).

2.3. Mitokondri

Hücre organellerinden birisi olan mitokondri ilk kez 1890 yılında Richard Altmann tarafından tanımlanmıştır. Mitokondri, sitrik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon ile ATP üretiminden sorumludur ve hücrel enerjinin üretim merkezidir (55).

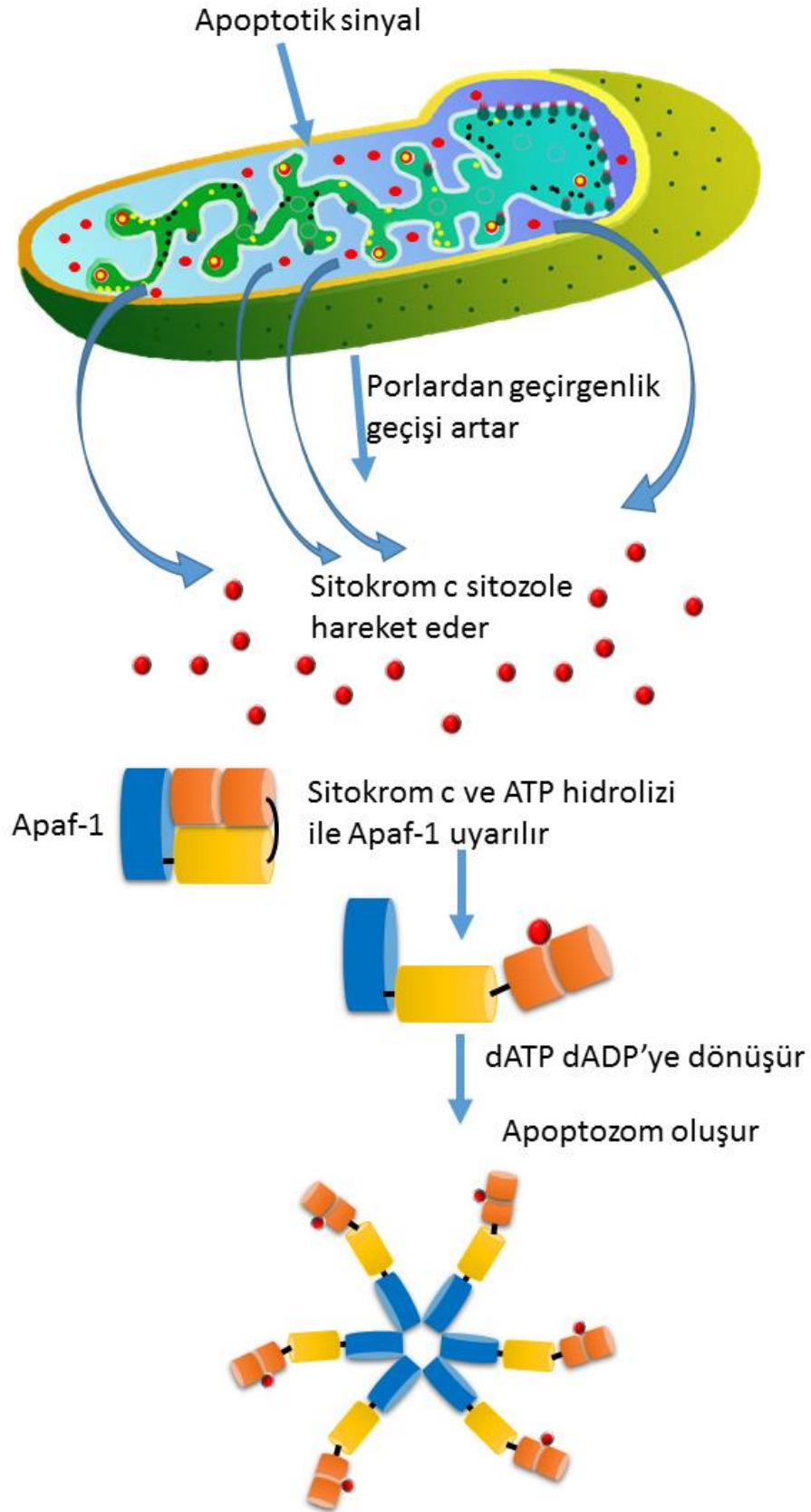
Mitokondri birçok ökaryotik hücrenin canlılığının devamı için gerekli olan bir dizi işlevi yerine getiren, gram negatif bakteriler gibi iç ve dış membran olmak üzere çift katlı zara sahip organeller olarak bilinir (56) (Şekil 2-3). Mitokondrilerin şekli ve sayısı içerisinde bulundukları hücrenin özelliklerine göre değişiklik gösterebilmektedir. Karaciğer hücrelerinde mitokondriler çoğunlukla uzun iplik şeklinde, bazen kısa şerit şeklinde olabilmektedir. Hücrede bulunan mitokondri sayısı hücrenin enerji ihtiyacı ile orantılıdır (57).



Şekil 2-3: Mitokondri genel görünümü

Mitokondri, hücrede bulunan besin ve oksijeni kullanarak oksidatif fosforilasyon ve elektron transport zinciri ile ATP biçiminde enerji üretimini gerçekleştirir. Aerobik organizmalarda, yağlar, karbonhidratlar ve aminoasitlerin yıkımı ile ilgili tüm oksidatif aşamalar, enerji metabolizmasının son basamağı olan oksidatif fosforillenmede birleşir. Oksidatif fosforillenme NADH ve protein bağlı FADH₂ ile ubikinon ve sitokrom c yardımıyla, oksidatif fosforilasyon enzim kompleksleri tarafından gerçekleşir (58).

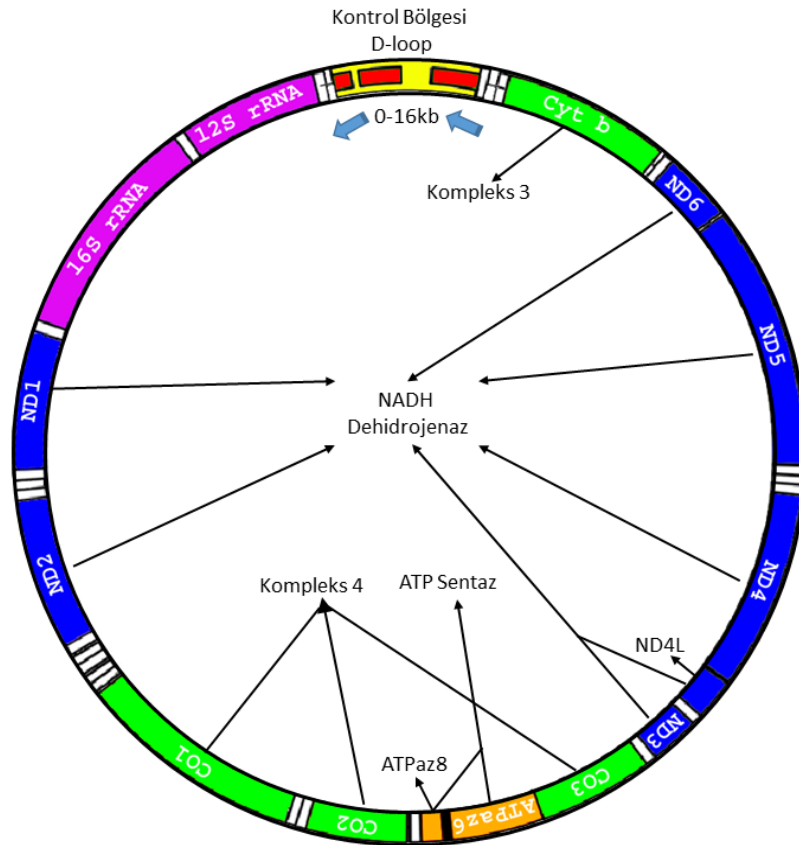
Mitokondriler ATP üretiminin yanında, amino asitler pirimidinler gibi birçok metabolitin biyosentezinde yer alırlar (59). Mitokondriler ayrıca, Ca²⁺ iyonlarını sitozolden çıkararak matrislerinde tutma yeteneğine sahiptir (60). Yağ dokusunda ortam sıcaklığının düştüğü durumlarda yaşamsal organların korunması amacıyla mitokondriler ortam ısınıyı yükseltirler. Hemen hemen tüm dokularda apoptozda rol alırlar. Stres faktörünün hücre ölümü için sinyal vermesi ile birlikte mitokondri dış zarının geçirgenliği artarak mitokondriyel bir protein olan sitokrom c'nin sitozole geçişine neden olur. Sitokrom c, Apoptoz proteaz aktifleştirici faktör-1'i uyarak apoptozomun oluşmasını sağlar. Apoptozom prokaspaz-9'u dimerleştirerek aktif hale dönüştürür. Aktif hale gelen kaspaz-9, hücre ölümüne neden olab kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin proteolitik aktifleşmesini sağlar (61)(Şekil 2-4).



Şekil 2-4: Apoptozom oluşumu

2.3.1. Mitokondriyal Genom

Mitokondriler, nükleer DNA'dan bağımsız olarak replike olabilen yaklaşık 16,6 kb uzunluğunda, çift sarmal, 37 gen içeren halkasal formda nükleer DNA'dan bağımsız mtDNA içermektedir (Şekil 2-5). mtDNA'nın histonları olmadığından ve tamir mekanizması zayıf olduğundan mutasyon oranı nükleer genomdan yaklaşık 10 kat daha yüksektir. İntron bölgeleri yoktur, bu yüzden yoğun şekilde bilgi taşır. mtDNA'ların kodlanmayan D-loop bölgesi, mtDNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonundan sorumludur. Bu bölge ileri derecede polimorfizm göstermekte ve bölgedeki mutasyonlar (sıklığı malignansinin derecesiyle bağlantılıdır) mtDNA kopya sayısında değişikliğe ve mitokondriyal gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olmaktadır (62,63).



Şekil 2-5: Mitokondriyal genom

Solunum zincirinin birçok multiprotein enzim kompleksi, hem nükleer DNA hem de mitokondriyal DNA tarafından kodlanmıştır. Sadece kompleks II enzim kompleksi mtDNA'dan bağımsız olarak nükleer DNA tarafından kodlanır (64).

2.3.2. Mitokondriyal hastalıklar

Mitokondri DNA'sında nokta mutasyon, delesyon, kopya sayısında azalma gibi değişiklikler sonucunda, mitokondri fonksiyonlarının disfonksiyonu ile insan vücudunun birçok organı ve hücre tipi etkilenir. Bunun etkileşim sonucu birçok klinik, histolojik, genetik ve biyokimyasal hastalık mitokondri ile ilişkilendirilmiştir.

Mitokondriyal ensefalopati, Leber kalıtsal optik nöropatisi, laktik asidoz (MELAS), Leigh Sendromu, NARP Sendromu, miyoklonik epilepsi, Kardiyomyopati gibi mitokondriyal hastalıklar temelde nükleer DNA'dan bağımsız olarak, mtDNA hasarından kaynaklandığı bilinmektedir (59). Bu hastalıkların en belirgin özelliği maternal kalıtım ile yani anneden geçiş göstermesidir. Literatürde birçok hastalığı mitokondriyal DNA'da meydana gelen farklılıklardan kaynaklandığını bildirir çalışma mevcuttur (65–67).

mtDNA'nın karmaşık DNA onarım mekanizmaları olmadığından, oksidatif strese ve diğer genotoksik hakaretlere karşı aşırı duyarlıdır. Mitokondride meydana gelen metabolik olaylar sonrasında mtDNA'ların çevresinde yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelir. Bu yüksek oksidatif stres ortamı, mtDNA'nın mutagenezeye karşı yüksek duyarlılığına etki eder. Bu durumda mitokondri, savunma mekanizması olarak, genomlarındaki yüksek mutasyon oranlarından kaynaklanabilecek olumsuz etkileri hafifletmek için DNA kopya sayılarını artırır. Literatürde mtDNA kopya sayısında meydana gelen anormal değişim Hepatoselüler karsinoma dahil olmak üzere birçok malignite için belirtilmiştir (4,68–70).

2.4. MikroRNA

miRNA'lar, 18-24 baz uzunluğunda, hücre içinde herhangi bir proteini kodlamayan, ancak, mRNAların proteinlere translasyonunu kontrol ederek post-transkripsiyonel susturma işlevi gösteren, gen ifadelerini düzenleyebilen küçük RNA molekülleridir. İlk defa Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında nematod türü olan *Caenorhabditis elegans* larvasının gelişiminden sorumlu hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak lin 14 proteini ekspresyonunu baskıladığını gözlemledikleri let-7'yi keşfetmiştir (71). Sonrasında Reinhart ve arkadaşları *Arabidopsis*'te miRNA varlığını keşfetmiş ve devamında birçok araştırmacı tarafından hem yeni miRNA'ların keşfini amaçlayan hem de keşfedilen miRNA'ların etki mekanizmasını araştıran çalışmalar giderek artmıştır (72).

miRNA'lar ilk olarak öncü miRNA olarak eksprese olurlar. Öncü miRNA'lar birkaç yüz ya da bir kaç bin nükleotitten meydana gelen RNA molekülleridir. Öncü mikroRNA'lar RNA polimeraz II enzimi tarafından üretilir ve ilk olarak miRNA duplekslerine daha sonra da tek sarmallı hale gelerek olgun mikroRNA'ları oluştururlar. Olgun miRNA'lar hedef mRNA'ya bağlanır ve gen ekspresyonunu kontrol ederek post-transkripsiyonel inhibisyon işlevi görür. Bu amaçla translasyonu inhibe eder veya RNA degradasyonunu tetikler. miRNA'ların mRNA'lara bağlanarak gerçekleştirdiği gen ifadesinin düzenlenmesinin insanlarda yaklaşık %30 ile %90 aralığında olduğu bildirilmiştir (73). Bir miRNA'nın sadece bir geni değil, yüzlerce geni kontrol ettiği düşünülmektedir.

mikroRNA (miRNA)'ların proliferasyon, gelişim, farklılaşma ve apoptosis gibi hücresel süreçlerde düzenleyici rol oynadığını gösteren birçok çalışma vardır, ancak miRNA'ların düzensiz ekspresyonu birçok hastalığın patogenezinde yer almaktadır (9,74). miRNA'ların bir kısmı hücre döngüsünün kontrolünde rol alan proteinlerin seviyelerini etkilediklerinden tümör-baskılayıcı gen veya onkogen gruplarına dahil edilmişlerdir. Literatürde tümör hücrelerinde miRNA ekspresyonunun deregülasyonu bildirir çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu sebeple insan kanserlerinde miRNA'ların önemli rolünün olduğu düşünülmüş ve genomdaki pozisyonları haritalandırılarak belirlenmiştir (10,11). Buna göre miRNA'ların özellikle heterozigotluğun ortadan kalktığı kırılgan bölgelerde (özellikle amplifikasyonun fazla veya kromozomal kırılma noktasının olduğu kısımlar) yerleşik olduğu belirlenmiştir.

miRNA'lar klinik açıdan tanı ve tedavide büyük öneme sahiptir. Tümör dokularında miRNA ekspresyon düzeyi analizleri, hastalığın prognozu, tümörün tipi ve hastaya uygulanan tedavinin izlenmesi gibi kritik bilgilere olanak sağlamaktadır. Örneğin dokuya özgül miRNA ekspresyon seviyesi analizi ile, hem tümör orijini belirlenebilir hem de karsinogenez sürecinde erken tanı konulabilmektedir (75). miRNA'ların genetik hastalıkların çoğunda rol aldığı düşünüldüğünde, çeşitliliği, yoğunluğu ve kendine has yapıları dolayısıyla, tanı ve tedavinin izlenmesinde, ayrıca potansiyel tedavi amaçlı kullanımında kullanılabileceği düşünülmektedir.

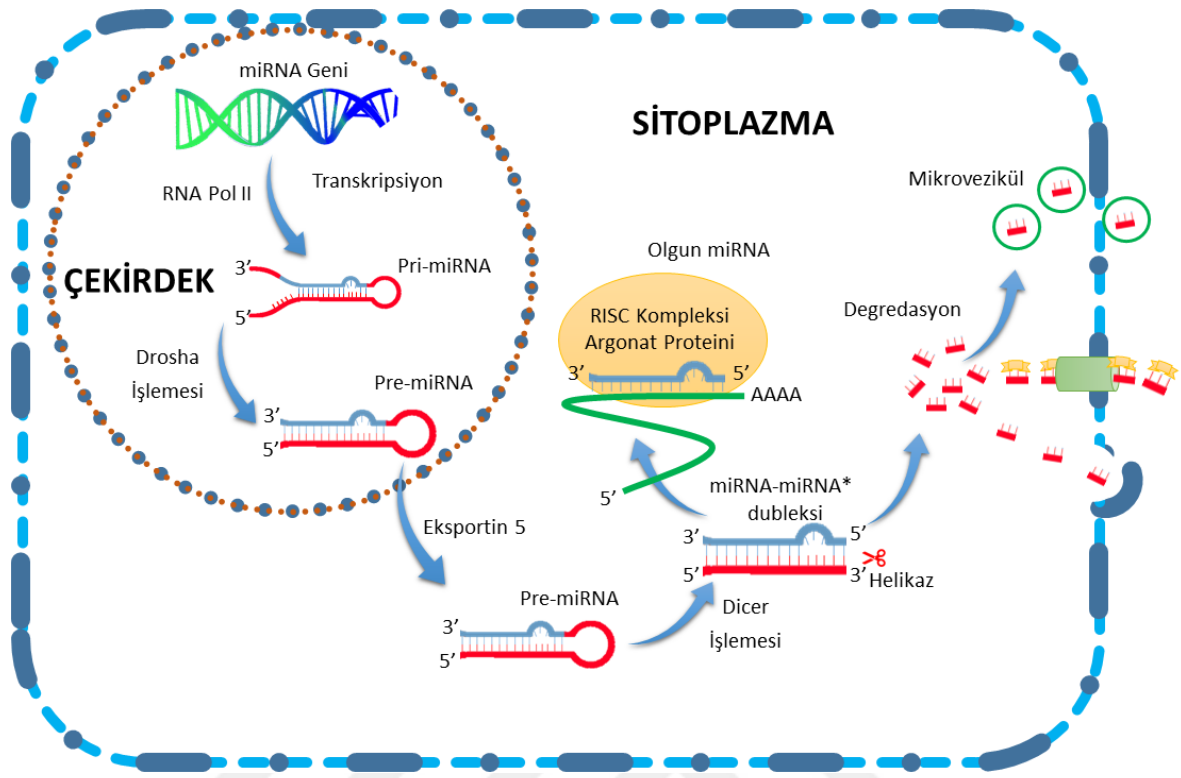
2.4.1. miRNA biyogenezi

miRNA'lar hücre çekirdeğinde, pri-miRNA şeklinde transkripte olurlar. miRNA'lar farklı şekillerde eksprese olabilirler;

- Lokalize oldukları gen ile beraber
- Sahip oldukları promotörler ile tek tek veya çoklu (polisistronik) eksprese olabilirler.

miRNA'ların daha çok polisistronik olarak eksprese edildikleri ve yaklaşık yarısının küme yerleşimi göstermekte ve yerleşimlerine göre ekzonik veya intronik olarak adlandırılmaktadır (76).

miRNA'lar topaç (loop) bir başlıktan ve poli-A kuyruğundan oluşan küçük moleküllerdir. Hücre çekirdeğinde ve sonrasında hücre sitoplazmasında bir dizi işlem sonucunda olgun hale gelerek, fonksiyonlarını kazanırlar. İlk olarak hücre çekirdeğinde RNA polimeraz II tarafından sentezlenen pri-miRNA'lar, RNAaz III ailesi üyesi ve endonükleaz aktivitesi olan Drosha tarafından, ile her iki ucundan kesilerek yaklaşık 70-100 baz uzunluğunda pre-miRNA'ya dönüşür. pre-miRNA'lar, Eksportin 5 proteini yardımıyla çekirdek por kompleksini geçerek sitoplazmaya taşınırlar. Sitoplazmaya geçen pre-miRNA'lar "Dicer" enzimi tarafından olgun miRNA dubleksine dönüştürülür. Aynı zamanda ATP'ye bağlı helikaz aktivitesi olan Dicer, oluşan dubleks yapının çift zinciri açarak tek zincirli hale dönüştürür. Ayrılma sonrası Argonat protein, zincirlerden kararlı olanı, hedef mRNA'ların ekspresyonunu kontrol etmek için, RISC kompleksine dahil eder. Diğer zincir parçalanarak, mikroveziküller yardımıyla, RNA bağlayıcı taşıyıcı proteinler yardımıyla veya hücre zarında oluşan küçük kabarcık yapıları ile olmak üzere 3 farklı yol ile hücre dışına atılır (77,78) (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: miRNA biyogenezi

miRNA kodlayan gen'lerde meydana gelen nokta mutasyonu, delesyon, translokasyon gibi değişimler yanı sıra epigenetik değişimler de miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde değişimlere neden olabilmektedir. Bunun sonucunda miRNA'nın etkileşimde olduğu gen ifadesinde de değişim meydana gelebilmektedir. Ayrıca miRNA'nın işlenmesinde görevli enzimleri kodlayan genlerde de meydana gelen değişimler sonucu, enzimde meydana gelen modifikasyonlar sonucu da olgun miRNA ekspresyon seviyesinde değişim meydana gelebilmektedir (79).

2.4.2. miRNA analiz yöntemleri

miRNA'ların canlılar için organizmada gerçekleşen hemen hemen bütün moleküler olaylarda rol alması keşfedilmesiyle beraber, miRNA'ların tespiti ve etki mekanizmasını anlamaya yönelik cihaz, yazılım ve yöntemler her geçen gün artmaktadır. Günümüzde, hücre, doku kültürü, doku örneği, vücut sıvıları gibi birçok matristen miRNA izolasyonları yapılmakta ve ekspresyon seviyeleri, microarray, norther blot, qRT-PZR ve digital PZR yöntemleri ile belirlenebilmektedir.

Mart 2018 tarihli MiRBase Release 22.0'ye kayıtlı toplam 38,589 miRNA tanımlanmıştır. İnsanlara ait olgun miRNA'ların sayısının ise 2654'tür. Tanımlanan miRNA'ların ilişkili olduğu tahmin edilen genlerin ve yolların tespitine olanak sağlamak üzere geliştirilen çeşitli biyoinformatik very tabanları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, miRBase <http://microrna.sanger.ac.uk>, miRanda <http://www.microrna.org>, MirDB <http://mirdb.org/miRDB/>, TargetScan <http://www.targetscan.org>, TarBase <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/> çevrim içi hizmet vermektedir (80).

2.4.3. miRNA'nın mitokondri fonksiyonları üzerine etkisi

Mitokondrinin fonksiyonlarını, hem nükleer DNA hem de mitokondriyal DNA düzenler. miRNA'ların nükleer DNA'dan eksprese edilmesinin yanında son yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların ayrıca mitokondride eksprese edildiğini, biyogenezi, apoptozu ve mitokondriyal enerji metabolizmasını düzenlediğini bildirmiştir (81–84). Literatürde 400'ün üzerine miRNA'nın mitokondri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (85).

Karsinogenezde miRNA, mitokondri ilişkisini belirlemek için, 96 HCC hastasına ait tümör dokusu ile 96 kontrol doku örneğinde ekspresyon analizi yapılmış ve mir-122'nin ekspresyon seviyesinin düşük olduğu belirlenmiştir. mir-122'nin ekspresyonundan sorumlu genlerin ifadesindeki düşüş ise mitokondriyal metabolik fonksiyon kaybına yol açtığı bilinmektedir (86). Yüksek CO₂ konsantrasyonu mir-183'ü indükler. Indüklenen mir-183, mitokondri matriksinde bulunan ve Krebs döngüsünde NADP + tüketen enzim olarak görev yapan IDH2'nin (isocitrate dehydrogenase 2) ekspresyon seviyesini düşürerek, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve bozuk hücre proliferasyonuna neden olur (81,87). Literatürde ayrıca mir-696'nın aşırı ekspresyonu, yağ asidi oksidasyonuna ve mitokondrilerdeki DNA kopya sayısının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (82,88).

Glutaminaz mitokondri metabolizmasında önemli bir role sahiptir. ATP üretimi için Glutamini glutamata dönüştürür ya da mitokondride glutatyon sentezi için substrat görevi görür. mir-23a ve mir-23b'nin glutaminazın hedeflenmesinde rol aldığı ve direk olarak glutaminaz seviyesini baskıladığı bildirilmiştir (89). Bir başka çalışmada da miyositlerde mir-494'ün engellenmesi sonucu mitokondriyal DNA kopya sayısında artış gözlemlenmiştir (90).

2.4.4. Hepatoselüler karsinoma’da miRNA

Hücresinin meydana gelen proliferasyon, gelişim, farklılaşma ve apoptosis gibi kanser ile doğrudan ilişkili birçok olayda miRNA’lar rol almaktadır. miRNA’ların hem hemen tüm kanser türlerinde sağlıklı bireylere göre ekspresyon seviyelerinde değişim gözlemlenmiştir (11,79,91,92). miRNA’lar, onkogen veya tümör süpresör genler gibi davranarak kanser gelişiminde önemli rol oynarlar.

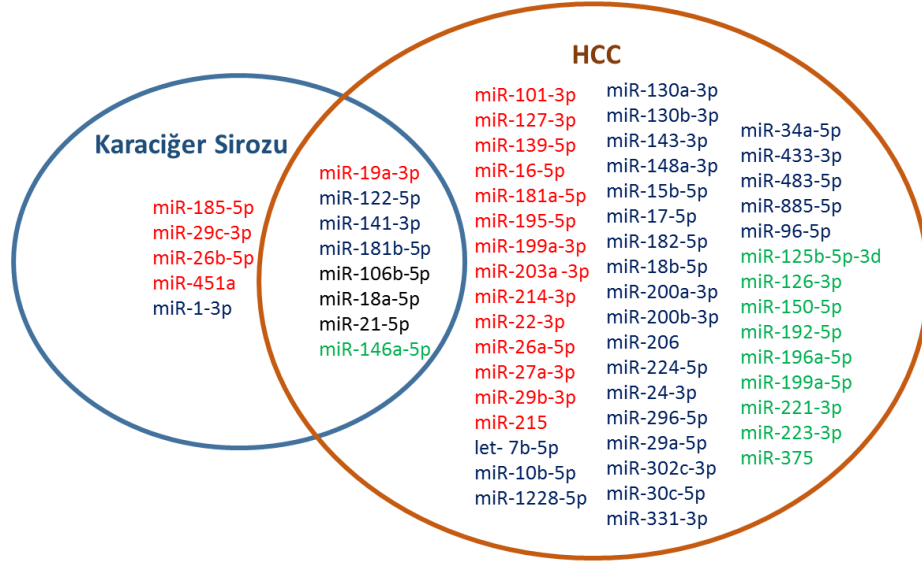
Günümüzde Hepatoselüler karsinoma’nın tanı, tedavi ve takibinde kullanılabilecek biyo-belirteç adayları miRNA’ların keşfine yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Jiang ve arkadaşları miR-10b, miR-106b ve miR-181a panellerinin HCC hastalarında potansiyel biyo-belirteç olabileceğini ve hastalarda ön tarama olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (93). Yine literatürde konu ile alakalı 44 makalenin derlendiği bildiride, kan örneklerinde 50, doku örneklerinde ise 18 miRNA’nın HCC’nin tanısında rol alabileceği, hastalığın prognostik ve terapötik biyo-belirteçlerinin belirlenmesi için ise 54 makale derlenmiş 16 prognostik, 32 terapötik hem prognostik hem terapötik ise 8 miRNA’nın belirteç olabileceği bildirilmiştir (94).

Yine literatürde HCC ve karaciğer sirozunun ortaya çıkmasında etkili olan hem ayrı ayrı hem de her ikisinin kesiştiği miRNA’lar bildirilmiştir. Karaciğer sirozu ile ilgili miRNA’ların; miR-185-5p miR-29c-3p miR-26b-5p miR-451a miR-1-3p, HCC ile doğrudan ilgili miRNA’ların HCC; miR-101-3p miR-127-3p miR-139-5p miR-16-5p miR-181a-5p miR-195-5p miR-199a-3p miR-203a -3p miR-214-3p miR-22-3p miR-26a-5p miR-27a-3p miR-29b-3p miR-215 let- 7b-5p miR-10b-5p miR-1228-5p miR-130a-3p miR-130b-3p miR-143-3p miR-148a-3p miR-15b-5p miR-17-5p miR-182-5p miR-18b-5p miR-200a-3p miR-200b-3p miR-206 miR-224-5p miR-24-3p miR-296-5p miR-29a-5p miR-302c-3p miR-30c-5p miR-331-3p miR-34a-5p miR-433-3p miR-483-5p miR-885-5p miR-96-5p miR-125b-5p-3d miR-126-3p miR-150-5p miR-192-5p miR-196a-5p miR-199a-5p miR-221-3p miR-223-3p miR-375, hem karaciğer sirozu hem de HCC ile ilişkili miRNA’ların; miR-19a-3p miR-122-5p miR-141-3p miR-181b-5p miR-106b-5p miR-18a-5p miR-21-5p miR-146a-5p olduğu bildirilmiştir (95) (Şekil 2-7).

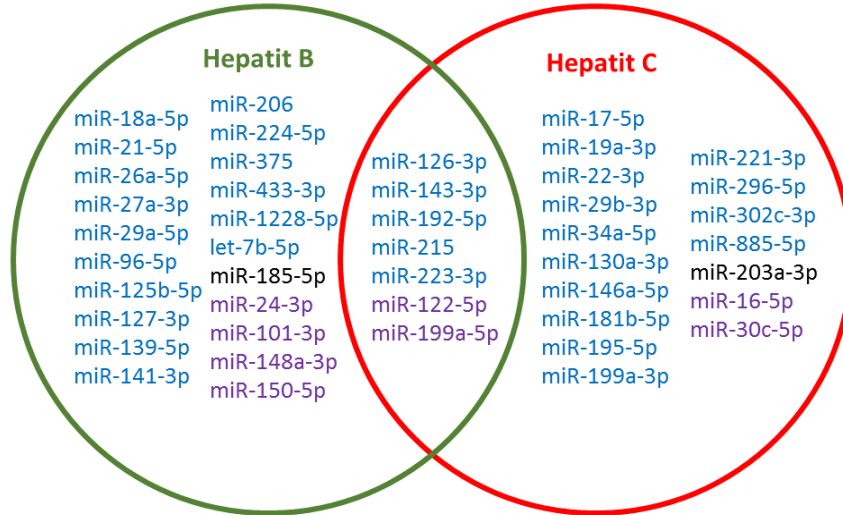
Ayrıca, HCC ortaya çıkmasında büyük role sahip olan Hepatit B ile ilişkili miRNA'ların; miR-18a-5p miR-21-5p miR-26a-5p miR-27a-3p miR-29a-5p miR-96-5p miR-125b-5p miR-127-3p miR-139-5p miR-141-3p miR-206 miR-224-5p miR-375 miR-433-3p miR-1228-5p let-7b-5p miR-185-5p miR-24-3p miR-101-3p miR-148a-3p miR-150-5p olduğu bildirilmiştir..

Hepatit C ilişkili miRNA'ların ise; miR-17-5p miR-19a-3p miR-22-3p miR-29b-3p miR-34a-5p miR-130a-3p miR-146a-5p miR-181b-5p miR-195-5p miR-199a-3p miR-221-3p miR-296-5p miR-302c-3p miR-885-5p miR-203a-3p miR-16-5p miR-30c-5p ve her ikisi ile ilişkili miRNA'ların; miR-126-3p miR-143-3p miR-192-5p miR-215 miR-223-3p miR-122-5p miR-199a-5p olduğu bildirilmiştir(92,94,96-98) (Şekil 2-7).

Song ve arkadaşlarının (2010) “fare karaciğerlerin rejenerasyonu sırasında meydana gelen moleküler değişimleri” incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, mikroprekürsör kompleksin önemli bir bileşeni olan ve hepatosit spesifik DGCR8'in inaktivasyonu olan fareler kullanılmıştır. DGCR8 hücre çekirdeğinde lokalize, miRNA'ların üretiminde rol almaktadır. DGCR8 RNase III ailesinden olan Drosha'ya bağlanarak, mikroprekürsör kompleksi oluşturur. Bu kompleks, pri-miRNA'ları her iki ucundan keserek yaklaşık 70-100 baz uzunluğunda pre-miRNA'lara dönüştür. Bu bilgiler doğrultusunda miR-21 ve miR-378'in organ rejenerasyonunun düzenlenmesinde rol aldıkları bulgusuna ulaşmışlardır (99).



A. HCC ve karaciğer sirozu ile ilgili bildirilmiş miRNA'lar



B. Hepatit B ve Hepatit C ile ilgili bildirilmiş miRNA'lar

Şekil 2-7: HCC miRNA

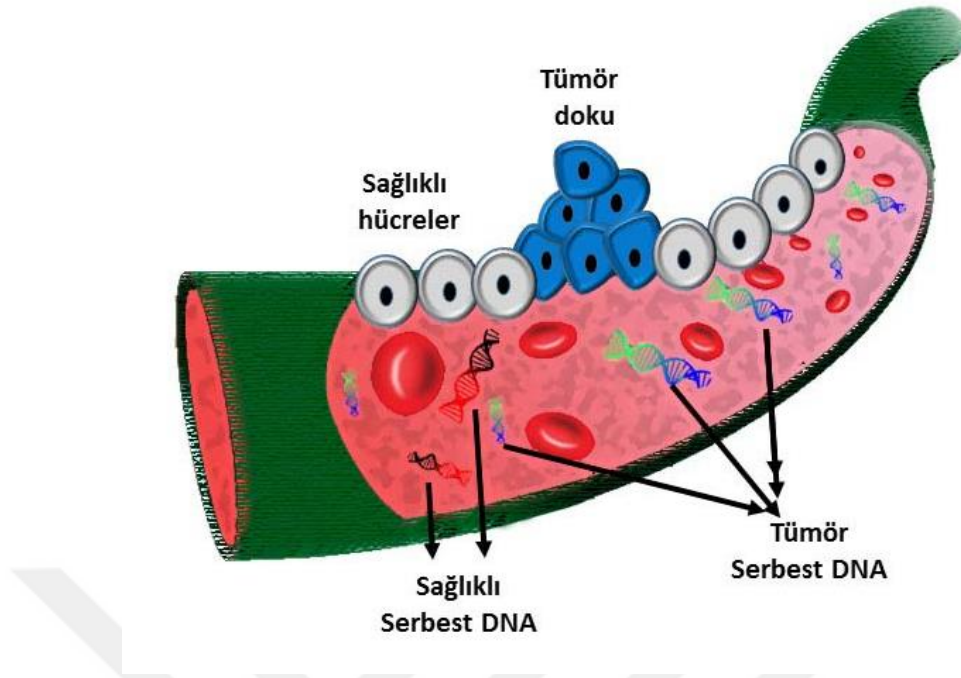
A. HCC ve karaciğer sirozu'nun oluşumunda etkili olan miRNA'lar verilmiştir. Mavi renkli gösterilen miRNA'ların yukarı regüle, kırmızı renkli gösterilen miRNA'ların ise aşağı regüle, siyah ile gösterilenlerin HCC ve sirozda ters patern gösterdiği, mor ile gösterilenler ise bazı literatürlerde yukarı bazılarında ise aşağı regüle olarak bildirildiği anlamını taşımaktadır.

B. Burada sırasıyla mavi ve kırmızı daireler, siroz ve HCC için miRNA'ları temsil eder. Kırmızı ve yeşildeki miRNA'lar sırasıyla yukarı ve aşağı regüle edilmiş ifadeyi temsil eder. Mordaki miRNA'lar, siroz ve HCC örneklerinde ters ekspresyon paternleri gösterdikleri anlamına gelir ve siyah olanların ifadeleri, farklı literatür raporlarına göre tutarsız olarak yukarı veya aşağı regüle edildiği anlamı taşımaktadır.

2.5. Cell-Free DNA (Serbest DNA)

Serbet DNA, apoptoz, hücre nekrozu sonrası, hücreden direk DNA salınması vb nedenlerden dolayı dolaşıma katılan çift sarmal yapıda çıplak halde DNA parçaları olarak tanımlanır. Serbest DNA'ların varlığı ilk kez Mandel ve Metais tarafından 1948 yılında keşfedilmiş ve bu keşif kanda serbest halde bulunan DNA'ların varlığı kanser araştırmacılarına yol gösterici olmuştur (100). Tan ve arkadaşları 1966 yılında sistemik lupus eritematozus hastalarından alınan kan örneklerinde serbest DNA konsantrasyonunun yüksek oranda olduğunu gözlemlemişlerdir (101). Serbest DNA'ların kanserli hastalardan alınan serum örneklerinde biyo-belirteç olarak bulunabileceği, ayrıca tanı ve tedavide etkin rol alabileceği ilk kez 1977 yılında Leon ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (102).

Apoptoz sonrası meydana gelen DNA degradasyonu ile kromozomal DNA, 50-300 kb uzunluğundaki parçalara ayrılır. Bu parçalar daha sonra degradasyona uğramaya devam ederek 180-200 bp uzunluğundaki parçacıklar haline gelerek dolaşıma katılır. Hastaya tedavi sırasında uygulanan, kemoterapi ve radyoterapi gibi uygulamalar apoptozu indüklemesine rağmen, tedavi sonrasında dolaşımda bulunan serbest DNA konsantrasyonunun azalması, serbest DNA'nın daha çok nekroz kaynaklı olduğu hipotezini desteklemektedir (103) (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Serbest DNA oluşumu

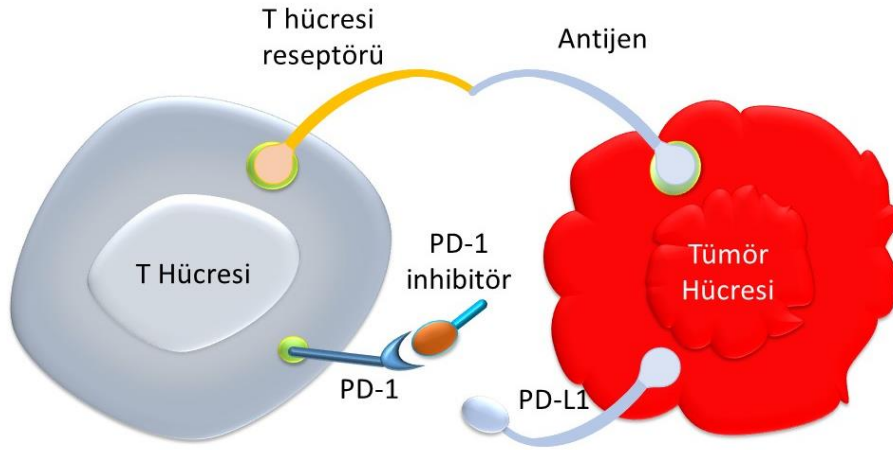
Kanda serbest DNA konsantrasyonunu etkileyen bir diğer etmen ise, dolaşımda bulunan DNaz konsantrasyonudur. Kanser hastalarında bu enzimin konsantrasyonunun az olmasının yanında, enzimi inhibe eden aktin gibi moleküllerin konsantrasyonlarının yüksek olması, enzim aktivitesini düşürmektedir. Literatürde kolon ve mide kanserli hastalardan alınan plazma örneklerinde, sağlıklı bireylere göre DNaz enzim aktivitesinin azaldığı, bunun sonucunda da serbest DNA'ların bütünlüğünün ve konsantrasyonlarının arttığı bildirilmiştir (104).

Serbest DNA'lar, hücrede meydana gelen moleküler değişikliklerin parçaları olduğundan ve ilgili hücreyi temsil ettiğinden hastalığın tanısında ve izlenmesinde önemli biyo-belirteçlerdir. Özellikle kanserin girişimsel olmayan tanısında, potansiyel riskin belirlenmesinde kullanılabilecek duyarlı belirteçlerdir. Literatürde tümör hücrelerinden izole edilen DNA'larda tespit edilen mutasyonlar ile aynı hastanın serum ve plazma örneklerinden izole edilen serbest DNA'larda tespit edilen mutasyonların birbirleriyle örtüşen verilere sahip olduğu ve bu bilgilerle serbest DNA'ların potansiyel biyo-belirteç olduğunu belirten birçok çalışma vardır (105–107).

2.6. PD-1

PD-1 aktive olmuş T hücrelerinin yüzeyinde bulunan ve immünolojik aktivasyonu sınırlandıran ve inhibe eden koreseptör proteindir. PDL-1 ve PDL-2 ligandları PD-1 koreseptör proteinine bağlanarak T hücreleri anejrik hale gelir. PDL-1 ve PDL-2 ligandlarının bir diğer özelliği hem antijen sunan hücrelerde hem de tümör hücrelerinde eksprese olabilmeleridir. 9. kromozom üzerinde lokalize olan Cd274 geni tarafından kodlanan PD-L1 ekspresyonu, birçok non-hematopoetik hücrelerde, dendritik hücrelerde, T ve B hücrelerde, mast hücrelerinde ve mezenkimal kök hücrelerde eksprese edilir (108).

PD-1 ligandına sahip tümörler, T hücrelerindeki PD-L1 ile etkileşime girerek kendilerine karşı gelişen immünolojik savunmayı inhibe edebilirler. Buna karşın anti-PD-1 monoklonal antikoru ise PD-1'e bağlanarak ligandların bağlanmasını engeller ve bu sayede immünolojik aktivasyonun herhangi bir inhibisyona uğramadan devam etmesini sağlar(12). Bu durum özellikle tümör hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre daha fazladır, T hücrelerinde hücrenin aktivasyonu engellenerek, tümörü ortadan kaldıracak immünolojik yanıt engellenmiş olur (109,110) (Şekil 2-9).



Şekil 2-9: PD-L1 ile T hücre etkileşimi

Chun-yu Huang ve arkadaşları 411 HCC hastasının tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyon seviyesinin değişimini immünohistokimyasal yöntemle yaptıkları çalışmada, PD-L1 ekspresyon seviyesi ile CD8⁺T hücrelerinin yoğunluğu arasında gözle görülür yönde pozitif korelasyon gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca Hepatit B hastalarında PD-L1 ekspresyonunun arttığını belirlemişlerdir (111).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma hastanesi polikliniklerine başvuran ve yeni tanısı konulmuş HCC hastalarından alınan serum örnekleri ile hastalıkla ilişkisi olamayan sağlıklı bireylerden alınan serum örnekleri kullanılmıştır. Tez çalışmasında, kan örneklerinden DNA izolasyonu için yeni yöntem geliştirilmesi amacıyla ve Hepatoselüler karsinoma hastalığının tanısında ve izlenmesinde biyo-belirteç taraması adı altında, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan iki farklı etik izin belgesi alınmıştır.

Çalışmada kullanılan cihaz listesi Tablo 3-1'de verilmiştir.

Tablo 3-1: Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
Dijital PCR Cihazı	Applied Biosystems Quantstudio 3D Digital PCR System
Gerçek Zamanlı PCR	Roche LC480 Light Cycler
Minifüj	Heathrow Scientific
Isıtmalı Çalkalayıcı	Hangzhou Thermo Shaker
Vorteks	VWR
Manyetik Karıştırıcı	VWR VMS-C7 Advanced
Elektroforez Güç Kaynağı	Bio-Rad Powerpac
Spektrofotometre	Nanodrop 1000
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter 22R
PCR Hazırlık Kabini	Holten
pH-Ölçer	Mettler Toledo S220
Terazi	Mettler Toledo

Malzeme Adı	Markası
Mikro Santrifüj	Sigma, 1-14
Mikrodalga Fırın	Vestel MD-GDX30
Derin Dondurucu -86°C	New Brunswick Scientific, U570
İnkübatör	Elektromag M420 BP
Derin Dondurucu -20°C	Siemens

Çalışmada kullanılan kimyasal listesi Tablo 3-2’de verilmiştir.

Tablo 3-2: Kullanılan kimyasallar

Kimyasal adı	Cas No	Markası
Guanidine thiocyanate	593-84-0	AppliChem
Isoamylalcohol	123-51-3	MP Biomedicals
N-Lauroylsarcosine sodium salt solution	137-16-6	SIGMA
Sodium chloride	7647-14-5	AppliChem
Sodium dodecylsulfate	155-20-3	SIGMA
TRIS	77-86-1	BioShop
Triplex (III (Sodium EDTA))	6381-92-6	MERCK
Triton X-100	9036-19-5	AppliChem
Ammonium acetate	631-61-8	SIGMA-ALDRICK
Proteinaz K	-	Norgen
Fenol-kloroform-izoamilalkol	AM9720	Ambion
Etanol	64-17-5	MERCK

3.2. Yöntem

Kan örneklerinden DNA izolasyonu için yeni yöntem geliştirilmesi amacıyla, gönüllü sağlıklı 1 kişiden 250 cc venöz kan örneğinin plazması ayrılarak, 500'er uL hacimde porsiyonlara bölünmüş ve daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir. Hepatoselüler karsinoma hastalığının tanısında ve izlenmesinde biyo-belirteç taraması amacıyla hasta ve kontrol bireylerden alınan 5 -10 cc venöz kan örnekleri 3000 rpm'de 5dk santrifüj edilerek serumun ayrılması sağlanmıştır. Ayrımı sağlanan serum örneklerinden totalRNA ve total DNA izolasyonları yapılmış ve qPCR ve dPCR ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Cell-Free DNA izolasyonu

Hasta ve kontrol bireylerden alınan serum örneklerinden serbest DNA analizi yapılması amacıyla literatür taraması yapılmış ve literatürdeki çalışmaların çoğunlukla kit ile yapıldığı belirlenmiştir. Serbest DNA analizleri çoğunlukla polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılmaktadır. Bu reaksiyonun verimi elde edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı ile doğrudan alakalıdır. Serbest DNA izolasyonu için kullanılan deney protokollerinin kısıtlı olması nedeniyle bu alanda araştırma geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla literatürde var olan kan veya dokudan DNA izolasyon yöntemleri derlenmiş ve bu yöntemler üzerinde değişiklikler yapılarak yeni yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca ticari olarak satılan Zymo ve Norgen markalarına ait serbest DNA izolasyon kitleri kullanılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, Silica Jel Metodu-1, Fenol Kloroform Metodu-1, Fenol Kloroform Metodu-2, Amonyum asetat metodu, Sodium n-laurilsarkosin metodu, Sodyum Asetat metodu, Silica Jel Metodu-2, Zymo cell-free isolation kit ve Norgen cell-free isolation kit olmak üzere 9 farklı yöntem denenmiştir. Yöntem karşılaştırması için sağlıklı gönüllüden alınan plazma örneği 500'er uL hacimde bölüştürülerek daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.1. Silica Jel Metodu-1

Bu yöntem Myakishev 1995'ten uyarlanmıştır (112). Daha önce porsiyonlanan 3 adet plazma örneği -80°C'den alınarak çözüldü.

1. Plazma örneği içeren tüplere 1'er mL bağlama tamponu [100 ml Guanidine Solüsyon [6M GuSCN, 20 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7,0), 40 g/L Triton X-100] ile 4 g silica jel çözündürülerek hazırlanır] eklendi.

2. Tüpler 3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi bu süre içerisinde her 1 dakikada vorteksleme yapıldı.
3. İnkübasyon işleminden sonra 1 dakika boyunca 16,000xg'de santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant kısımları atıldı.
4. Pellet üzerine 1 mL Guanidine Solution eklendi.
5. Karışımlar 3 dakika boyunca 16,000xg'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı.
6. Pellet üzerine 500 uL izopropanol eklenerek tüpler vortekslendi.
7. Karışımlar 2 dk -20°C'de bekletildikten sonra 3 dk 16.000xg'de santrifüj edildi ve süpernatant kısımları atıldı.
8. Pellet üzerine 500 uL ethanol eklenerek tüpler vortekslendi.
9. Karışımlar 2 dk -20°C'de bekletildikten sonra 3 dk 16.000xg'de santrifüj edildi ve süpernatant kısımları atıldı.
10. 100 uL TE(1mM Tris ve 0.01 mM EDTA, pH: 8) eklenerek pellet kısımları çözdürüldü.
11. Daha sonra tüpler 65°C'de 3 dakika inkübe edilerek silikanın DNA'yı TE'ye bırakması sağlandı ve resüspanse edildi.
12. 2 dakika 5.000xg'de santrifüj edildi. Ardından silikadan ayrılan süpernatant yeni tüplere alındı.

3.2.1.2. Fenol Kloroform Metodu-1

Bu yöntem Nasrin Mohammadi 2014'ten uyarlanmıştır (113).

1. 500'er uL plazma örneklerine 500 uL (0,1 M NaCl, 10 mM pH: 8 Tris-HCl, 1 mM pH: 8 EDTA, H₂O), 100 uL %10 SDS ve 15 uL Proteinaz K ilave edildi.
2. Karışım bir saat 56°C'de inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra, 1'er ml fenol-kloroform-izoamilalkol solüsyonu (25: 24: 1 pH: 7.8) eklendi.
4. Karışımlar çalkalandı ve 3 dakika -20°C'de ve daha sonra 17 dakika +4°C'de bekletildi. Daha sonra tüpler 15 dakika 16,000xg'de santrifüj edildi.
5. Üst fazlar alındı ve yeni tüplere aktarıldı.
6. Yeni hacmin 1/10 oranında Sodyum Asetat ve 500 uL Etanol ilave edildi.
7. Karışımlar -20°C'de 5 dakika bekletildi, daha sonra 16,000xg'de 10 dakika santrifüjlendi.

8. Santrifüjlemeden sonra süpernatant kısımları atıldı ve tüpler kurutuldu.
9. Kurutulmuş tüplere 100'er uL TE Tamponu ilave edildi ve DNA yeniden süspanse edildi.

3.2.1.3. Fenol Kloroform Metodu-2

Bu yöntem Hufnagl Clemens ve ark. (2013)'den uyarlanmıştır (114).

1. 500 uL plazmaya 80 uL %10 SDS, 90 uL 1M NaCl ve 15 uL Proteinaz K eklendi.
2. Karışım 55°C'de bir saat inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra, 685 uL fenol-kloroform-izoamillalkol çözeltisi ilave edildi ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
4. Karışım 10 dakika 16,000xg'de santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası üst faz alınarak üzerine 500 uL %100 etanol eklendi ve 15 dakika 16,000xg'de santrifüjlendi.
6. Süpernatant atıldı ve üzerine 500 uL %70 Etanol eklendi.
7. Karışım 15 dakika 16,000xg'de santrifüjlendi.
8. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüp kurutuldu.
9. Sonrasında elde edilen DNA 100 uL TE'de süspansiyon haline getirildi.

3.2.1.4. Amonyum Asetat Metodu

Bu metod Barlet ve ark. (2003)'den uyarlanmıştır (115).

1. 500 uL plazmaya 500 uL %10 SDS ve 15 uL Proteinaz K ilave edildi.
2. Karışım 55°C'de bir saat inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra, 800 uL fenol-kloroform-izoamil alkol solüsyonu tüplere ilave edildi.
4. 15 dakika 16,000xg'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
5. Santfirüj sonrası üst tabakalar yeni tüplere alındı ve 8 uL 7.5 M Amonyum Asetat ve 500 uL %100 Etanol eklendi.
6. Karışımlar 15 dakika 16,000xg'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı.
7. Pelletlere 500'er uL %70 Etanol ilave edildi ve 15 dakika 16,000xg'de santrifüjlendi.
8. Son olarak süpernatant atıldı ve tüpler kurutuldu. Daha sonra DNA 100 uL TE ile çözdürüldü.

3.2.1.5. Sodium N-laurilsarkosin Metodu

Bu method Masaki ve ark. (1991)'den modifiye edilmiştir(116).

1. 500 uL plazma örneklerine 500'er uL Solüsyon 1 (6M NaCl, 13 mM EDTA, %0.5 Sodyum N-laurilsarkosin, bir taşıyıcı olarak 10 ug Glikojen, 26 mM Tris-Hcl pH: 8) eklendikten sonra karıştırıldı.
2. 55°C'de bir saat inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra, tüplere 1 ml izopropanol karışımı eklendi ve vortekslendi.
4. 16,000xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz yeni bir tüpe alındı.
5. Tüplere 1'er mL% 40 izopropanol eklendi ve vortekslendi.
6. Vortekslendikten sonra, 5 dakika boyunca 16,000 x g'de santrifüj edildi, daha sonra süpernatant kısımları atıldı ve bir tüpler kurutuldu.
7. Kurutulmuş tüplere 100'er uL TE Tamponu eklenerek DNA'nın çözülmesi sağlandı.

3.2.1.6. Sodyum Asetat Metodu

Bu method Haihua Yuan ve ark. (2012)'den modifiye edilmiştir (117).

1. 500 uL plazma örneklerine %20 SDS'den 31.25 uL ve 15 uL 20 mg / mL Proteinaz K eklendi.
2. 55°C'de bir saat inkübe edildi.
3. İnkübasyon işlemi sonrası tüplere eşit hacimde fenol-kloroform-izoamillalkol çözeltisi eklenerek vortekslendi ve 16,000xg'de 15 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüjlemeden sonra üst faz yeni tüplere alındı ve sıvının 1/10'u oranında 3 mM Sodyum Asetat ve eşit hacimde izopropil alkol ilave edildi.
5. Karışımlar -20°C'de yarım saat boyunca bekletildikten sonra 15 dakika 16,000xg'de santrifüjlendi.
6. Santrifüj işlemi ardından süpernatantlar atıldı ve tüpler kurutuldu.
7. Kurutulmuş tüplere 100'er uL TE Tamponu eklenerek DNA'nın çözülmesi sağlandı.

3.2.1.7. Silica Jel Metodu-2

Yalçınkaya ve ark. (2017)'den modifiye edilmiştir (118).

1. 500 uL plazmaya 500 uL Bağlama Tamponu (6 M NaCl, 1.2 g Triton X-100 40 g / L, 20 mM EDTA, 10 mM Trisand 4 g Silika) ilave edildi.

2. Karışımlar 2 dakika boyunca dakikada bir kez olmak üzere vortekslendi.
3. 15 dakika boyunca 16,000xg'de santrifüj edildi.
4. Süpernatant kısımları atıldı.
5. Pelletlerin üzerine 300'er uL yıkama tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris HCl pH 7,5 (25°C)) ilave edildi ve 15 dakika boyunca 16,000x g'de santrifüj edildi.
6. Süpernatantlar atıldı ve tüpe 300 uL izopropil alkol ilave edildi.
7. 15 dakika 16,000xg'de santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı.
8. Tüpler kurutulduktan sonra kurutulmuş tüplere 100 uL TE ilave edildi.

3.2.1.8. Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit

500 uL plazma porsiyonlarından Zymo Research Katalog No. D4076 olan kit protokolüne uygun olarak 3 tekrarlı izolasyon yapılmıştır.

1. Her bir plazma örneğine 125 µl S&P 5X Sindirme tamponu ve 20 µl Proteinaz K eklendi ve iyice karıştırıldı.
2. Karışım 30 dakika 55°C'de inkübe edildi.
3. Karışım üzerine karışımın hacminin iki katı hacimde S&P DNA Bağlanma Tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı.
4. Zymo-Spin™ III-S kolonu rezervuar tüpüne yerleştirildi ve üzerine karışım eklendi.
5. 2 dakika 1.000 x g'de santrifüj edildi. Bu işlem karışım bitene kadar tekrar edildi.
6. Zymo-Spin™ III-S toplama Tüpüne yerleştirildi ve üzerine 400 µl S&P DNA hazırlama tamponu eklendi ve 10,000xg'de 30 saniye santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı.
7. Zymo-Spin™ III-S kolonuna 700 µl S&P DNA yıkama tamponu ve 10,000xg'de 30 saniye santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı.
8. Tekrar Zymo-Spin™ III-S kolonuna 400 µl S&P DNA yıkama tamponu ve 10,000xg'de 30 saniye santrifüj edildi.
9. Yıkama tamponu tamamen uzaklaşmasını sağlamak için 1 dakika tekrar santrifüj edildi.
10. Kolon 1,5 ml DNaz içermeyen tüpe aktarıldı ve üzerine 50 µl DNA ekle Elüsyon tamponu eklendi.

11. 3 oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
12. 30 saniye maksimum hızda santrifüj edilerek DNA eldesi sağlandı.

3.2.1.9. Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit

500 uL plazma porsiyonlarından Norgen Biotek Corp. Katalog No. 55100 kit protokolüne uygun olarak 3 tekrarlı izolasyon yapılmıştır. İzolasyon basamakları;

1. 2 mL tüpte (kullanıcı tarafından sağlanan) 500 µL plazma / serum numunesi yerleştirildi. 30 µL Proteinaz K eklendi ve 10 saniye vortekslenerek iyice karıştırıldı.
2. 10 dakika boyunca 60 ° C'de ildikübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra, 1 mL Binding Buffer B eklendi ve 10 saniye boyunca vortekslenerek iyice karıştırıldı.
4. İkinci basamakta elde edile 750 µL alınarak Mini Spin kolonuna aktarıldı ve 3,300xg'de 2 dakika santrifüjlendi ve alt kısım atıldı.
5. Kalan karışım aynı Mini Spin kolonuna aktarıldı ve 3. basamak tekrar edildi.
6. Kolona 500 µL Solüsyon WN uygulandı ve 3,300xg'de 1 dakika santrifüjlendi. Alt kısım uzaklaştırıldı ve kolon tekrar tüpe yerleştirildi.
7. Kolona 500 µL yıkama Solüsyonu A eklendi ve 3,300 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alt kısım uzaklaştırıldı ve kolon tekrar tüpe yerleştirildi.
8. Altıncı adımı bir kez daha tekrarlandı.
9. Kolon, boş olarak 2 dakika boyunca 13,000xg'de santrifüj edildi ve alt kısım tüple beraber atıldı.
10. Fitre yeni 1,7 mL'lik bir elüsyon tüpüne aktarıldı ve 100 µL Elution Buffer B eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
11. 400xg'de 1 dakika santrifüj, ardından 5,800xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
12. Dokuzuncu adımda 100 uL ile indirilmiş DNA'ya 300 uL Bağlama Tamponu B eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
13. Tüm karışım yeni Mini Spin kolonuna aktarıldı ve 3,300xg'de 1 dakika santrifüjlendi ve alt kısım atıldı.
14. Kolona 500 µL Solüsyonu A eklendi ve 3,300 x g'de 1 dakika santrifüj edildi alt kısım atılarak bu işlem tekrar edildi.
15. Kolon, boş olarak 2 dakika boyunca 13,000xg'de santrifüj edildi ve alt kısım tüple beraber atıldı.

16. Fitre yeni 1.7 mL'lik bir elüsyon tüpüne aktarıldı ve 100 µL Elution Buffer B eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

17. 400xg'de 1 dakika santrifüj, ardından 5,800xg'de 2 dakika santrifüj edildi.

3.2.1.10. İzole edilen DNA'ların derişimlerinin belirlenmesi

Tüm protokoller ile aynı plazma örneğine ait üçer tekrarlı izolasyon yapılmış ve sonrasında izole edilen DNA'ların saflık ve konsantrasyonlarını belirlemek için optik dansite ölçümü gerçekleştirildi.

Nükleik asitler 260 nm'de, proteinler ve fenolik bileşikler 280 nm'de UV ışığını absorbe ederler. EDTA, karbonhidratlar, fenolik bileşikler UV ışığını 200-230nm aralığında absorbe ederken, özellikle DNA izolasyonlarında kullanılan Guanidin HCl 230nm'de UV ışığını absorbe ederler (119).

İzole edilen DNA'nın A260/280 absorbans oranının 1,8 ile 2 aralığında beklenmektedir. Aksi durumda DNA çözeltisinde protein kontaminasyonu olduğunu gösterir. A260/230 absorbans değerinin ise 2 ile 2,20 aralığında olması beklenir. Bu oranın düşük olması durumunda, çözeltinin kirli olduğu düşünülür. Bu amaçlar NanoDrop ND-100 spektro fotometre cihazı kullanılarak 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri belirlendi.

3.2.1.11. İzole edilen DNA'ların miktarının belirlenmesi

Plazma örneğinden DNA izolasyonunda, tüm protokollerin adımları ve kimyasalları farklı olduğundan, elde edilen DNA çözeltisi içerisinde farklı oranlarda ve çeşitte kimyasal safsızlıklar olması muhtemeldir.

İzolasyon sırasında ortaya çıkan bazı safsızlıklar, DNA'nın PCR ile analizi sırasında reaksiyonu inhibe edebildiğinden, bu safsızlıkların miktarı DNA izolasyonundan elde edilen verim kadar kritik öneme sahiptir (120). Bu sebeple tüm protokoller ile yapılan DNA izolasyonu sonrası, her izolasyon dan ikişerli olmak üzere, her protokolden toplam 6 tekrarlı hem nükleer DNA'yı hedefleyen hem de mtDNA'yı hedefleyen PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda tüm yöntemler on kat seyreltilerek PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu sayede hem izolasyon yöntemlerindeki DNA miktarı qPCR ile elde edilen eşik döngüsü (Ct) değerlerine göre belirlendi hem de seyreltilmiş ve seyreltilmemiş DNA numunelerinin Ct değerleri karşılaştırılarak yöntemden kaynaklı inhibisyon varlığının olup olmadığı belirlenmiştir.

3.2.1.12. İzole Edilen DNA'lardaki Safsızlıkların Nükleer Manyetik Rezonans(NMR) ile Belirlenmesi

Organik moleküllerin yapısal analizi için kullanılan en önemli yöntemlerden birisi Nükleer manyetik rezonans spektroskopisidir. Kantitatif nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (qNMR), ilaç analizi, biyolojik makromolekül tespiti ve gıda analizi gibi yöntemlerde önemli bir araç haline gelmiştir. Kromatografik teknikler gibi genel kantifikasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, qNMR yöntemi çeşitli avantajlara sahiptir. Bu avantajların bir kısmı aşağıda maddeler halinde verilmiştir(121,122).

- (i) örnek hazırlama kolay, hızlı ve türevsizdir
- (ii) özellikle harici standart yöntem kullanılması durumunda analizden sonra örneği geri kazanması
- (iii) Referans materyali qNMR'deki numuneden bağımsız olarak kullanılırken, kromatografik analizlerde numuneye yapısal bir benzerlik göstermesi gerekir,
- (iv) Kromatografik teknikler kalibrasyon eğrisine ihtiyaç duyarken, qNMR'de kalibrasyon eğrisinin kullanım tercihi operatöre bağlıdır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) verimi, izole edilen DNA saflığına ve konsantrasyonuna bağlıdır. İzole edilen DNA çözeltisinin safsızlığı PCR'yi inhibe edebilir: Serbest DNA analizlerinde, izole edilen DNA konsantrasyonu düşük olacağından, olası safsızlık düşük konsantrasyonlu biyo-belirteçlerin tespitinde PCR'yi inhibe yanlış sonuç alınmasına neden olacaktır. İzole edilen DNA çözeltisindeki safsızlıkların büyük çoğunluğu izolasyon yöntemi kaynaklı olduğundan, kullanılan yöntem serbest DNA analizlerinde büyük öneme sahiptir. Bu sebeple izlasyon çözeltisindeki safsızlıkların belirlenmesi bu alanda AR-Ge çalışması yapan araştırmacılara önemli veriler sağlayacaktır.

Bu sebeple bu tez çalışmasında karşılaştırması yapılan tüm protokollerden elde edilen DNA izolasyon çözeltileri üçer tekrarlı olmak üzere NMR cihazında analiz edilerek, çözelti içerisindeki safsızlıklar hassas olarak belirlenmiştir. Literatürde bu alanda çok kısıtlı çalışma vardır.

3.2.2. RNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol bireylerden alınan 5 -10 cc venöz kan örnekleri 3000 rpm'de 5dk santrifüj edilerek elde edilen serum örneklerinden ayrıca miRNA ve PD-L1 gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla ThermoFisher marka, “mirVana™ miRNA Isolation Kit” kullanılmıştır. İzolasyon basamakları aşağıda verilmiştir.

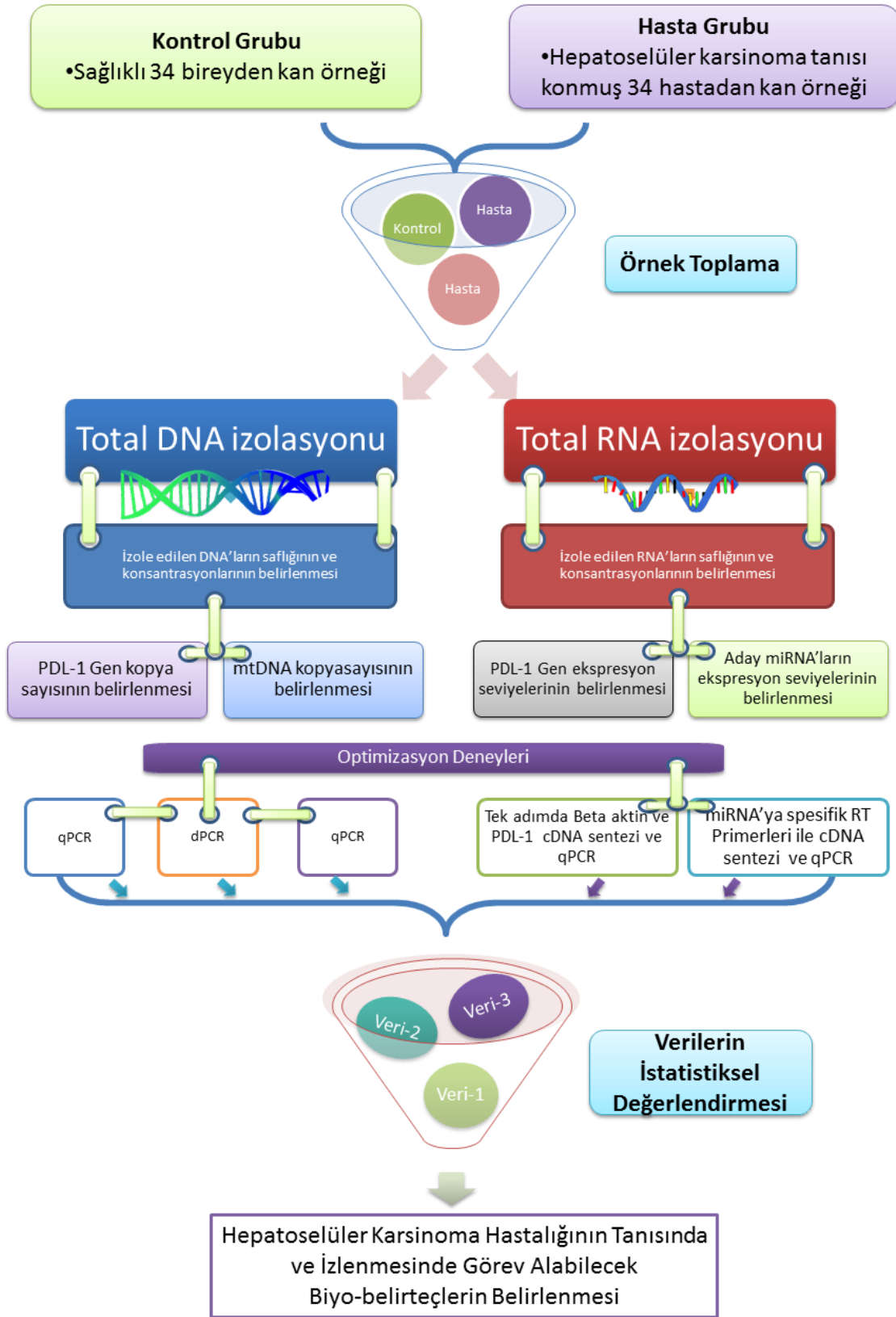
1. 500 µl serum içeren her bir tüpe 500 µl “Lysis Binding Solution” eklendi ve karışımlar vortekslendi.
2. Daha sonra üzerlerine 100 µl “Homogenate Additive” eklendi ve tekrar vorteks yapıldı,
3. Karışım 10 dakika buzda inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası, 1000 µl asit fenol kloroform (125:24:1) eklenerek 40-70 saniye vortekslendi.
5. Örnekler oda sıcaklığında 15,000x g'de 5 dakika santrifüjlendi.
6. Üst kısımdaki şeffaf faz yeni bir tüpe alındı.
7. Üst faz hacminin, 1,25 katı hacimde %100 etanol (oda sıcaklığında) eklenerek, pipetaj ile homojen hale getirildi.
8. Karışım daha sonra kolona aktararak. 10,000x g'de 15 saniye santrifüjlendi.
9. Alt kısım uzaklaştırıldı ve kolon üzerine 700 µl ‘mirVana Wash Solution 1’ eklendi ve 5-5 saniye santrifüjlendi.
10. Alt kısım uzaklaştırıldı ve kolon üzerine 500 µl ‘mirVana Wash Solution 2/3’ eklendi ve 5-15 saniye santrifüjlendi.
11. Dokuüzuncu basamak tekrar edildi ve sonrasında kolona bir şey eklenmeden boş halde 15 saniye santrifüjlendi.
12. Kolon temiz tüpe aktararak üzerine 95°C'ye ısıtılan “Elution Buffer”dan 40 µl eklendi ve 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
13. 15,000xg'de 30saniye santrifüj edilerek RNA eldesi sağlandı. RNA'lar daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.2.1. İzole edilen RNA'ların derişimlerinin belirlenmesi

Hasta ve kontrol grubu bireylerden alınan kan örneklerinden elde edilen serum örneklerinden, “mirVana™ miRNA Isolation Kit” ile RNA izolasyonları yapılmıştır. Sonrasında izole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyonlarını belirlemek için optik dansite ölçümü gerçekleştirilmiştir.

RNA 260 nm'de, büyük moleküller ve fenolik bileşikler 280 nm'de UV ışığını absorbe eder. EDTA, karbonhidratlar, fenolik bileşikler UV ışığını 200-230 nm aralığında absorbe ederken, RNA izolasyonlarında genellikle kullanılan, TRIZOL 230-270 nm'de, Guanidine isothiocyanate ise 260 nm'de, UV ışığını absorbe eder (123).

Bu çalışmada hastalardan ve gönüllü bireylerden kan örnekleri alınmasından, örnek toplama işleminden, Hepatoselüler karsinoma hastalığının tanısında ve izlenmesinde görev alabilecek biyo-belirteçlerin belirlenmesi aşamasına kadar olan tüm basamaklar ana hatlarıyla Şekil 3-1'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3-1: Çalışma planı

3.2.3. cDNA sentezi

RNA izolasyonları yapılan tüm örneklerden hem PD-L1 hem de miRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesi amacıyla cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

PD-L1 gen ekspresyonu için “TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step Kit” kullanılmıştır. Reaksiyon için gerekli karışım protokolü Tablo 3-3’de verilmiştir. cDNA reaksiyonunu ve sonrasında ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için gerekli PCR protokolü Tablo 3-4’de verilmiştir. PCR reaksiyonu için kullanılan primer ve prob sekansları Tablo 3-5’de verilmiştir (124).

Tablo 3-3: PD-L1 cDNA sentezi ve gen ekspresyonu karışım protokolü

PD-L1	Stok, nM	Son konsantrasyon	RT-qPCR, 1 örnek için gerekli hacim (uL)
TaqMan® RT-Enzyme Mix			0,5
İleri primer (F)	10000	900	1,8
Geri primer (R)	10000	900	1,8
Prob	10000	250	0,5
TaqMan® RT-PCR Mix (2×)	Stok	Stok	10
ddH ₂ O	-	-	0,40
RNA kalıbı (<1ug)	-	-	5
Toplam Hacim			20,00

Tablo 3-4: PD-L1 cDNA sentezi ve gen ekspresyonu PCR protokolü

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
cDNA sentezi	48°C	15 dk	1
Enzim inaktivasyonu	95°C	10 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	40
Primer bağlanması	60°C	1 dk	

Tablo 3-5: PD-L1 primer-prob sekansı

Primer/Prob	Sekans	Saflık	Modifikasyon	Büyüklik
İleri primer	5'-tctggcacatcctccaaatg-3'	HPLC	-	135 bp
Geri primer	5'-cagtgtacaccaaggcataataag-3'	HPLC	-	
Prob	5'-aaggactcacttggtattctgggagcca-3'	HPLC	FAM-BHQ1	

miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla hasta ve kontrol bireylerden izole edilen kalıp RNA, hedeflenen miRNA'lara özgü RT primerleri ile, thermo scientific 4366596 katalog numaralı, "TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit" kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. miRNA'dan cDNA reaksiyonunu için gerekli deney protokolü Tablo 3-6'da verilmiştir.

Tablo 3-6: miRNA cDNA sentezi karışım protokolü

Primer/Prob	Konsantrasyon	1 Örnek için gerekli hacim
Kalıp RNA	Stok	2,0 µL
10X RT buffer	Stok	0,75 µL
miR-spesifik primer	Stok	1,5 µL
dNTP karışımı	Stok	0,075 µL
RNase inhibitör	Stok	0,094 µL
Reverse Transkriptaz	Stok	0,5 µL

3.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR

Hasta ve kontrol bireylerden alınan serum örneklerinden izole edilen RNA örnekleri, “TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit” kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA’lardaki hedef bölgelere özgü primerler kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Tek basamaklı PCR reaksiyon tekniği PD-L1 gen ekspresyon seviyesinin ölçümü için uygun olduğundan, cDNA ile gen ekspresyon seviyesi ölçümü tek reaksiyonda gerçekleşmiştir (Tablo 3-3).

Hedef miRNA’ların ekspresyon seviyelerini ölçmek amacıyla, hedefe özgü RT primerler ile çoğaltılan kontrol ve hasta grubu örnekleri ilgili primer prob yardımıyla çoğaltılmış ve cihazın FAM kanalından sinyal okuması gerçekleştirilerek, ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. miRNA primer listesi Tablo 3-7’de verilmiştir.

Tablo 3-7: Hedef ve kontrol miRNA listesi

Hedef/Kontrol	Adı	Markası	Katalog No
Referans			
Hedef 1	hsa-mir-33a	Thermo Fisher Scientific	PN4427975
Hedef 2	hsa-mir-203b	Thermo Fisher Scientific	PN4427975
Hedef 3	hsa-mir 361-3p	Thermo Fisher Scientific	PN4427975
Hedef 4	hsa-mir-424	Thermo Fisher Scientific	PN4427975

miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişim Livak ve Schmittgen'nin 2001(125) yılında yaptıkları çalışma referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan miRNA'lar için referans olarak RNU6B seçilmiştir. Hasta ve kontrol örneklerinde hem hedeflenen miRNA'lara özgü primer ve prob kullanılmış hem de referans olarak seçilen RNU6B'ye özgü primer ve prob kullanılarak ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrası hem ekspresyon seviyesindeki değişimin belirlenmesi hedeflenen miRNA'ların hem de referans olarak kullanılan RNU6B'nin cT değerleri hesaplanmıştır. Sonrasında hedeflenen miRNA'lardaki, ekspresyon seviyesi değişimleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile belirlenmiş ve SPSS 22 paket programında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. PD-L1 Gen Kopya Sayısının Belirlenmesi

Bu tez projesinde hedeflenen serbest tümör RNA'sında PD-L1 gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi deneylerinde elde edilen sonuç ve literatürde yayınlanan güncel bilgiler doğrultusunda PD-L1 gen ekspresyon seviyesi sonuçlarının anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu sebeple hastalardan izole edilen DNA'larda PD-L1 gen kopya sayısının hastalıkla ilişkilendirileceği düşünülerek hasta ve kontrol bireylerden izole edilen serbest DNA örneklerinde PD-L1 ve kontrol olarak Beta Aktin gen kopya sayısı oranındaki olası değişimin belirlenmesi amacıyla bir dizi deney gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılacak primer ve probların optimizasyonları yapılmış, olası pipet hatalarının önüne geçmek için hem ayrı ayrı (Tablo 3-8) hem de, tek kuyuda çoklu hedefe yönelik PCR reaksiyonu (Multipleks PCR) gerçekleştirme deneyleri yapılmıştır (Tablo 3-9).

Tablo 3-8: PD-L1 gen kopya sayısı primer prob optimizasyonu

Adı	Stok, nM	Son konsantrasyon	1 örnek için gerekli hacim (uL)	PD-L1	Beta Aktin
				8x	8x
İleri primer (F)	20000	900	0,9	7,2	7,2
Geri primer (R)	20000	900	0,9	7,2	7,2
Prob (P)	20000	250	0,25	2	2
TaqMan® prob PCR Mix (2X)	Stok	Stok	10	80	80
ddH2O	-	-	2,95	23,6	23,6
DNA	-	-	5		
Toplam Hacim			20,00		

Optimizasyon sonrasında belirlenen konsantrasyon ve hacimde primer ve prob karışımları hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım ile tüm hasta ve kontrol örnekleri multipleks polimeraz zincir tepkimesi gerçekleştirilmek üzere Roche marka, “LightCycler® 480 Instrument II cihazında FAM ve HEX floresan okuma gerçekleştirilmiştir. PD-L1/Beta aktin gen kopya sayılarının oranlarındaki değişim belirlenmiştir.

Tablo 3-9: PD-L1 gen kopya sayısı multipleks primer prob optimizasyonu

Karışım	Stok, nM	Son konsantrasyon	1 örnek için gerekli hacim (uL)	6x
İleri primer (F)-Beta Aktin	20000	900	0,9	5,4
Geri primer (R)-Beta Aktin	20000	900	0,9	5,4
Prob (P)-Beta Aktin	20000	250	0,25	1,5
İleri primer (F)-PD-L1	20000	900	0,9	5,4
Geri primer (R)-PD-L1	20000	900	0,9	5,4
Prob (P)-PD-L1	20000	250	0,25	1,5
TaqMan® prob PCR Mix (2×)	Stok	Stok	10	60
ddH2O	-	-	0,90	5,4
DNA	-	-	5	
Toplam Hacim			20,00	

Multipleks optimize edilen PCR çözeltisi tüm örneklerde kullanılmak üzere, Roche marka, “LightCycler® 480 Instrument II” cihazına ait 96’lık tabakadaki kuyucuklara temiz alanda aktarılmış, sonrasında her kuyucuğa DNA örneği eklenmiştir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli PCR koşulları Tablo 3-10’da verilmiştir.

Tablo 3-10: PD-L1 gen kopya sayısı multipleks qPCR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	95°C	10 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	40
Primer bağlanması	60°C	1 dk	

3.2.6. mtDNA kopya sayısının belirlenmesi

Çalışma kapsamında hasta ve kontrol bireylerden alınan serum örneklerinden izole edilen serbest DNA örneklerinde mtDNA kopya sayısının belirlenmesi amacıyla, mtDNA’ya özgü MT16520F24 ileri, MT35R24 geri primerleri ile birlikte MT16557F25 TaqMan probu kullanılarak Gen Bank, NC_012920 numaralı sekansı kayıtlı mitokondriyal DNA’nın 7S bölgesinde kısa bölge çoğaltılmış ayrıca endojen gen olarak Beta aktin geni kullanılmıştır (59,126,127).

İlgili primerler sekansları literatürden taranmış, prob boyaları tasarlanmıştır. Tüm primer ve problemlerin optimizasyonları bu tez çalışması kapsamında yapılmıştır. İlgili primer ve prob listeleri Tablo 3-11’de verilmiştir.

Tablo 3-11: mtDNA ve Beta aktin primer ve prob sekansları

Gen Adı	Primer/Prob	Sekans	Modifikasyon	Büyüklik
Beta Aktin	İleri primer	5'- GGCACCACACCTTCTACAATGAG -3'	-	104 bp
	Geri primer	5'- GGTCATCTTCTCGCGGTTGG -3'	-	
	Prob	5'- TGCTGCTGACCGAGGCCCCC -3'	HEX-BHQ1	
mtDNA	İleri primer	5'- CATAAAGCCTAAATAGCCCACACG-3'	-	85 bp
	Geri primer	5'-CCGTGAGTGGTTAATAGGGTGATA-3'	-	
	Prob	5'-AGACATCACGATGGATCACAGGTCT-3'	FAM-BHQ1	

3.2.6.1. mtDNA ve Beta aktin primer ve prob optimizasyonu

Sipariş edilen primer ve problemlerin özgüllüğünün, son konsantrasyon optimizasyonlarının ve floresan değer optimizasyonlarının yapılması amacıyla bir dizi deney gerçekleştirildi. Bu amaçla hedefe özgü primer ve problemlerin farklı konsantrasyon kombinasyonları denenerek optimum deney koşulları belirlendi. Olası izolasyondan kaynaklı inhibisyonun önüne geçerek hatalı yönlendirmeyi engellemek amacıyla deneylerde ayrıca ticari olarak satılan Cambio marka ve CA-972-06 katalog numaralı sonicated human DNA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her iki DNA çözeltisinden üçer tekrarlı olarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

mtDNA ve nükleer DNA'yı temsilen Beta aktin geni, primer optimizasyonu için reaksiyon başına primer son konsantrasyonları 900 nanomol ile 300 nanomol, prob

konsantrasyonunun ise 250 ile 150 nanomol konsantrasyonlarında toplam sekiz farklı kombinasyon denenmiştir.

Optimizasyon için negatif kontroller de dahil toplam örnek sayısının düşük olması, ve hedeflenen primer konsantrasyonlarına ulaşmak için gerekli hacmin çekilmesi sırasında olası hatanın önüne geçebilmek için ileri ve geri primerler Tablo 3-12’de gösterildiği şekilde, karışım olarak hazırlanmıştır. Optimizasyonda primer konsantrasyonu dört şekilde yapıldığı için, karışımlar dört farklı tüplerde hazırlandı ve tüpler, X, Y, Z, T olarak kodlandı.

Tablo 3-12: İleri ve geri primer karışım kombinasyonları

Yöntem	Primer Adı	Stok (nM)	A (nM)	B (nM)	1x	10x (9+1) x2	F+R Toplam	10 Örnek için gerekli hacm
X	İleri primer F	20000	900	900	0,90	18,00	36,00 uL	18,00 uL
	Geri Primer R	20000	900	900	0,90	18,00		
	Prob	20000	250	150	-	-		
Y	İleri primer F	20000	900	900	0,90	18,00	24,00 uL	12,00 uL
	Geri Primer R	20000	300	300	0,30	6,00		
	Prob	20000	250	150	-	-		
Z	İleri primer F	20000	300	300	0,30	6,00	24,00 uL	12,00 uL
	Geri Primer R	20000	900	900	0,90	18,00		
	Prob	20000	250	150	-	-		
T	İleri primer F	20000	300	300	0,30	6,00	12,00 uL	6,00 uL
	Geri Primer R	20000	300	300	0,30	6,00		
	Prob	20000	250	150	-	-		
			1 rxn Hacimi	20,00 uL				

Hazırlanan karışımlar daha sonra kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.

Çalışmada kullanılacak optimum prob konsantrasyonunu belirlemek amacıyla iki farklı kombinasyon tasarlanmış ve hedeflenen konsantrasyonda prob ve Prob master karışımı hazırlanmıştır. Prob master ve 250 nanomol prob karışımı, “A” olarak kodlanmış ve hazırlama hesaplaması Tablo 3-13’de, Prob master ve 150 nanomol prob karışımı ise “B” olarak kodlanmış ve hazırlama hesaplaması Tablo 3-14’de verilmiştir.

Tablo 3-13: 250 nmol prob ve master karışımı

	2. Stok, nM				Reaksiyon başına gerekli hacim	6 Örnek+3 Negatif =9+(1)=10	Prob+ Master Karışımı (4 Yöntem için)
İleri primer F	20000	900	900	300	300	0,90	9,00
Geri Primer R	20000	900	300	900	300	0,90	9,00
Prob	20000	250	250	250	250	0,25	2,50
2XProbe Master						10,00	100,00
							400 uL
					1 reaksiyon hacmi	20.00 uL	

Tablo 3-14: 150 nmol prob ve master karışımı

	2. Stok, nM				Reaksiyon başına gerekli hacim	6 Örnek+3 Negatif =9+(1)=10	Prob+ Master Karışımı (4 Yöntem için)
İleri primer F	20000	900	900	300	300	0,90	9,00
Geri Primer R	20000	900	300	900	300	0,90	9,00
Prob	20000	150	150	150	150	0,15	1,50
2 X Probe Master						10,00	100,00
							400 uL
					1 reaksiyon hacmi	20.00 uL	

Hazırlanan prob karışımları ile daha önce hazırlanan primer karışımı kullanılarak 8 farklı kombinasyonda reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. PCR çözeltisini hazırlama protokolü Tablo 3-15’de verilmiştir.

Tablo 3-15: Sekiz farklı PCR kombinasyon protokolü

Yöntem	Prob Master+Prob (uL)		F+R Karışımı (uL)				ddH ₂ O (uL)
	A	B	X	Y	Z	T	
1AX	102,5		18				29,5
2AY	102,5			12			35,5
3AZ	102,5				12		35,5
4AT	102,5					6	41,5
1BX		101,5	18				30,5
2BY		101,5		12			36,5
3BZ		101,5			12		36,5
4BZ		101,5				6	42,5

Sekiz farklı yönteme göre hazırlanan PCR çözeltisi, Roche marka, “LightCycler® 480 Instrument II” cihazına ait 96’lık tabakadaki kuyucuklara temiz alanda aktarılmış, sonrasında her kuyucuğa DNA örneği eklenmiştir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli PCR koşulları Tablo 3-16’da verilmiştir.

Tablo 3-16: qPCR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü	
Denatürasyon	95°C	10 dk		1
Denatürasyon	95°C	15 sn	}	40
Primer bağlanması	64°C	1 dk		

qPCR sonrası, aynı DNA örneğinde farklı primer ve prob kombinasyonlarından elde edilen eşik değeri (Ct) belirlenmiştir. Farklı primer ve prob konsantrasyonunda PCR sonrası olası istenmeyen bağlanmanın kontrolü amacıyla tüm örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezinde 120 V'da 50 dakika yürütülerek, UV altında görüntülenmiştir. Jel görüntüsü ile Ct değerleri birlikte değerlendirilerek, her bir reaksiyon için, beta aktin geni çalışıldığında 900 nanomol ileri, 300 nanomol geri ve 150 nanomol prob konsantrasyonunun optimum PCR reaksiyonunu oluşturduğu, mtDNA'yı temsil eden primer prob çalışıldığında ise, 900 nanomol ileri, 900 nanomol geri ve 250 nanomol prob konsantrasyonunun optimum PCR reaksiyonunu oluşturduğu belirlenmiştir.

qPCR reaksiyonu sonrasında elde edilen veriler değerlendirilerek, optimum PCR koşullarını sağlayan primer ve prob konsantrasyonlarındaki tüm örneklerin hem mtDNA hem de nükleer DNA kopya sayıları, dijital PCR ile kantitatif olarak ölçülmüştür. Tüm örneklerin ilk olarak seyreltim yapılmadan reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve elde edilen değerler kopya/uL cinsinden değerlendirilmiş ve dijital PCR'ın optimum çalışma aralığında olmayan yüksek konsantrasyona sahip örnekler seyreltilerek deney tekrar edilmiştir.

Dijital PCR reaksiyonları, gerçek zamanlı PCR'ın aksine 14,5 uL'de gerçekleştirilmiştir. qPCR reaksiyonu ile optimizasyonu yapılan mtDNA ve Beta Aktin primerleri kullanılarak hazırlanan PCR çözeltisi Applied Biosystems QuantStudio 3D Digital PCR System cihazı ile ön reaksiyon gerçekleştirilmiştir. qPCR'dan elde edilen verilerin mtDNA için uygun olduğu ancak Beta aktin geni için prob konsantrasyonunun sinyalinin düşük olduğu gözlemlenmiş ve okunan sinyalin daha yüksek olması amacıyla prob konsantrasyonu reaksiyon başına 250 nanomol olacak şekilde güncellenmiştir. Güncellenen primer ve prob konsantrasyonları ile tüm örneklerin reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Her bir deneyde maksimum çalışılabilecek örnek sayısı 24 olduğundan örnekler farklı günlerde çalışılmıştır. Bu amaçla, hazırlanan mtDNA reaksiyon karışım protokolü Tablo 3-17'de ve Beta aktin reaksiyon karışım protokolü Tablo 3-18'de verilmiştir.

Tablo 3-17: dPCR mtDNA reaksiyon karışımı

	2. Stok nM	Son Konsantrasyon (uL)	1 Reaksiyon için gerekli hacim (uL)
Primer (F)	20000	900	0,22
Primer (R)	20000	900	0,22
Prob FAM	20000	250	0,11
ddH2O	-	-	1,71
2 X dPCR Master	Stok	Stok	7,25
DNA	-	-	5
Toplam Hacim			14,5

Tablo 3-18: dPCR Beta aktin reaksiyon karışımı

	2. Stok nM	Son Konsantrasyon (uL)	1 Reaksiyon için gerekli hacim (uL)
Primer (F)	20000	900	0,22
Primer (R)	20000	300	0,22
Prob HEX	20000	250	0,11
ddH2O	-	-	1,71
2 X dPCR Master	Stok	Stok	7,25
DNA	-	-	5
Toplam Hacim			14,5

PCR kabininde hazırlanan reaksiyon çözeltileri, yine kabin içerisinde 24 farklı PCR tüpünün her birine 9,5 uL hacimde reaksiyon karışımı eklenmiştir. PCR tüpleri daha sonra deneyin yapılacağı alana getirilerek her bir PCR tüpüne 5'er uL hacimde DNA örneği eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Hazırlanan PCR karışımları her örnek için ayrı ayrı çiplere yüklenmiştir. (Şekil 3-2).



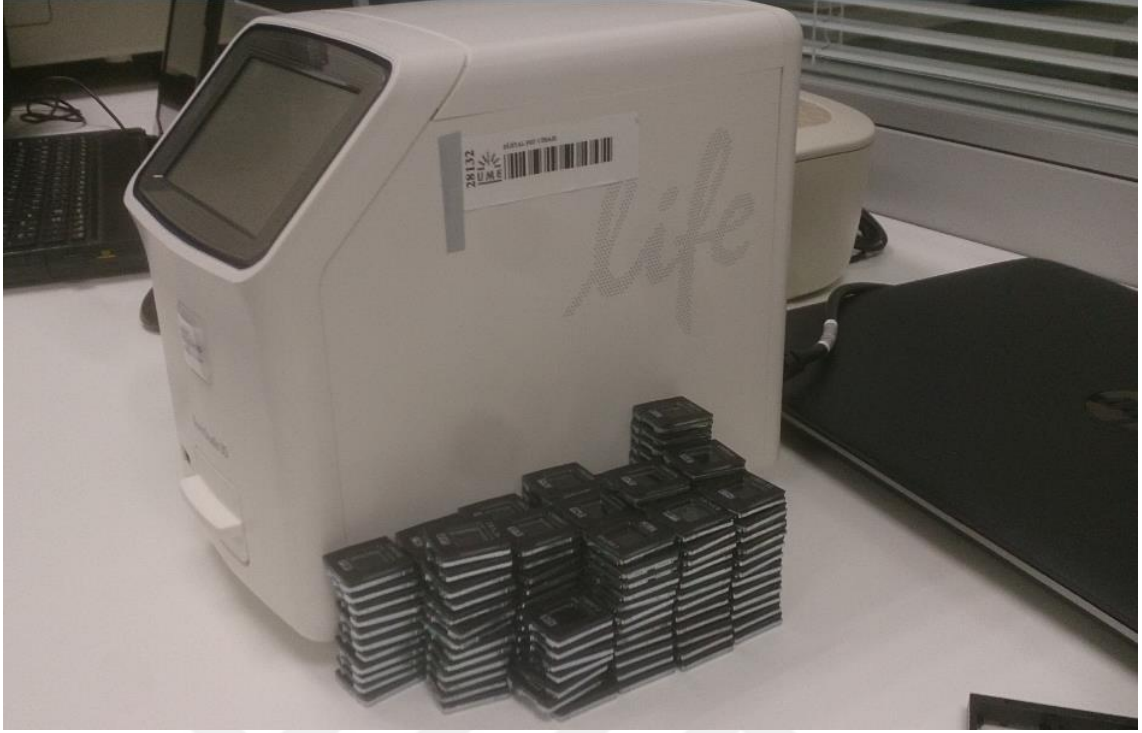
Şekil 3-2: dPCR çiplere DNA yükleme görüntüsü

Çip yükleme işlemi sonrası dPCR reaksiyonları gerçekleştirilmek üzere ısıl döngü cihazına yerleştirilmiştir. dPCR ısıl döngü reaksiyon basamakları Tablo 3-19’da verilmiştir.

Tablo 3-19: dPCR koşulları

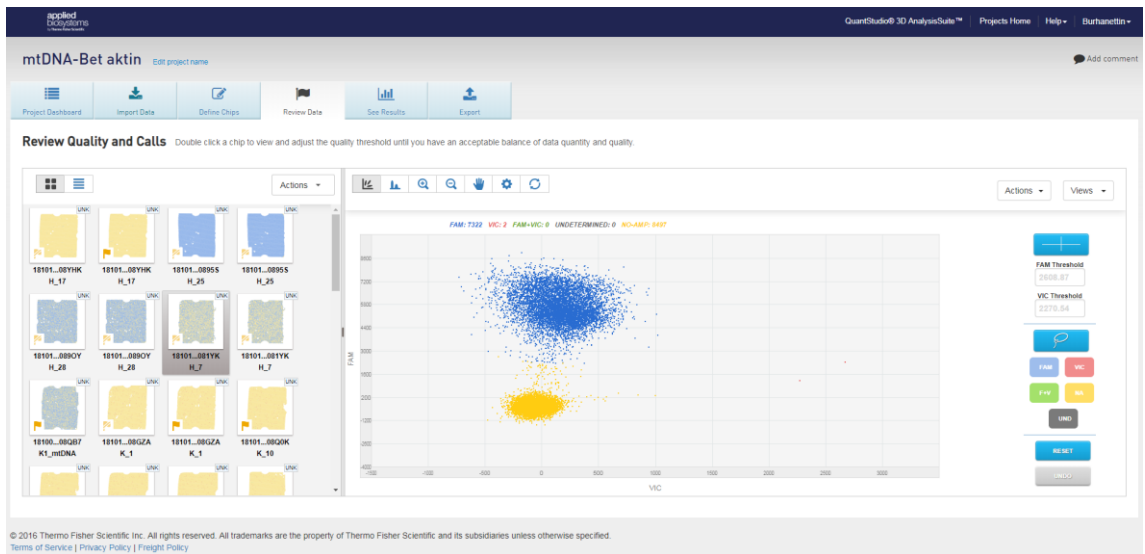
Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	95°C	10 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	39
Primer bağlanması	60°C	1 dk	

Isıl döngü cihazında reaksiyon gerçekleşmesi sonrasında tüm çipler olası yansımaları önlemek ve çip üzerindeki yağ kalıntılarını uzaklaştırmak için 2-propanol kullanılarak tozsuz peçete ile silinmiş ve sonrasında sırası ile ikişer tekrarlı olmak üzere spektrofotometrik olarak okumaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: dPCR çip okutma görüntüsü

Çip okutması sonrasında çiplerden alınan ham veriler “QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software” yazılımına yüklenerek, olası okuma ve yazılımsal hataların önüne geçmek için manuel olarak analizleri gerçekleştirildi (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: QuantStudio 3D analiz yazılımı

dPCR cihazından alınan verilerin optimum verimde olması için, üretici tarafından 200-3000 kopya optimum DNA kopya sayısı olduğu bildirilmiştir. Cihazdan alınan veriler sonrasında bazı örnekler mtDNA kopya sayısının cihazın optimum çalışma aralığı dışında olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple elde edilen kopya sayısı verilerine göre ilgili örneklerde seyreltim yapılarak deneyler tekrar edilmiştir.

3.2.7. İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için SPSS 22 paket programı kullanılmıştır.

İlk olarak, hasta ve kontrol grubunun PCR reaksiyonu sonucu hesaplanan değerlerin normal dağılıp dağılmadığı belirlemek amacıyla bir dizi test gerçekleştirilmiştir. Verilerin normallik değerlendirmesi için ana testler Kolmogorov-Smirnov (KS) testi, Lilliefors düzeltilmiş KS testi, Shapiro-Wilk testi, Anderson-Sevğilim testi, Cramer- von Mises testi ve D'Agostino çarpıklık testi gibi birçok test kullanılabilir (128–130).

Bu tez projesinde de ilk olarak, hasta ve kontrol grubunun PCR reaksiyonu sonucu hesaplanan değerlerin normal dağılıp dağılmadığı belirlemek amacıyla Skewness (Çarpıklık) ve Kurtosis (Basıklık) değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama sonucunda - 1,5 ile +1 aralığının dışında yer alan verilerin normal dağılmadığı kabul edilmiştir. Ayrıca Shapiro-Wilk testi sonucu p değerinin 0,05'den küçük olması durumunda verilerin normal dağılmadığı kabul edilmiştir.

Normal dağılım göstermediği belirlenen verilerin analizi için “parametrik olmayan 2-bağımsız gruplar” analizi yapılarak Mann-Whitney testi değerleri elde edilmiştir. Bu test sonucuna göre $p < 0,05$ bulunduğu durumda, hasta ve kontrol grubu arasındaki fark anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında HCC hastalarında serbest DNA analizi ile biyo-belirteç taranması amaçlanmıştır. İlk olarak serbet DNA'dan izolasyon yöntemi geliştirilmesi sonrasında PD-L1 gen kopya sayısının Beta aktin gen kopya sayısına oranının gerçek zamanlı PCR yöntemi ile belirlenmesi, hedeflenen dört miRNA'ya ait ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ve mtDNA kopya sayısındaki değişimin hem kantitatif PCR ile hem de dijital PCR ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

4.1. Serbest DNA İzolasyon Yöntem Karşılaştırmasına Ait Bulgular

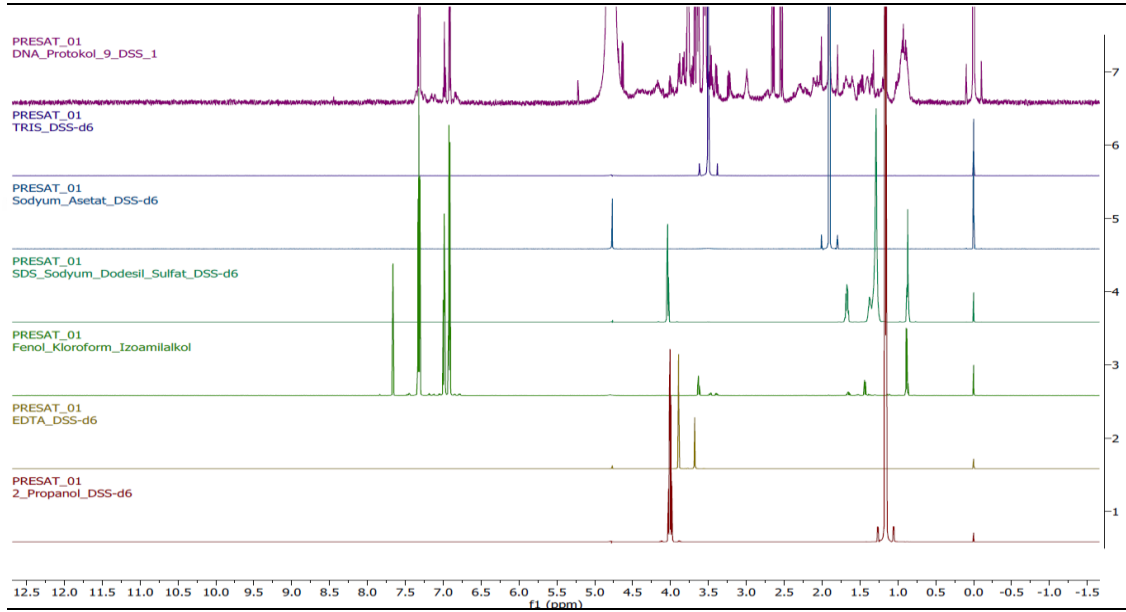
Bu çalışmada 9 farklı yöntem; silica jel yöntemi, Fenol Kloroform Metodu-1, Fenol Kloroform Metodu-2, amonyum asetat metodu, Sodium n-laurilsarkosin metodu, Sodyum asetat metodu, Silica Jel Metodu-2, Zymo cell-free isolation kit ve Norgen cell-free isolation kit ile aynı plazma örneğinden üçer tekrarlı serbest DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'ların A260/280, A260/230 değerleri belirlenerek, saflık ve konsantrasyonları hakkında karşılaştırma yapılmıştır (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Farklı izolasyon yöntemlere ait serbest DNA konsantrasyonları

Yöntem Adı	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
Fenol Kloroform Metodu-1	428,54	8,57	4,72	1,78	1,45
Silica Jel Metodu-1	41,32	0,83	0,37	2,27	0,41
Fenol Kloroform Metodu-2	13,23	0,26	0,19	1,09	0,50
Amonyum Asetat Metodu	51,11	1,02	0,70	1,46	2,94
Sodium N-Laurilsarkosin Metodu	497,12	9,94	13,93	0,71	0,99
Silica Jel Metodu-2	219,23	4,38	6,78	0,65	0,73
Sodyum Asetat Metodu	392,50	7,85	6,04	1,29	0,62
Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit	12,07	0,24	0,15	1,66	0,24
Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit	4,45	0,09	0,07	1,25	0,41

İzolasyon yönteminden kaynaklı olan bazı safsızlıklar, polimeraz zincirleme tepkimesini inhibe edebildiğinden yöntemler arası safsızlıkların derişimlerinin belirlenerek karşılaştırılması önemlidir. Bu sebepler tüm yöntemlerle izole edilen DNA'lardaki safsızlıklar Nükleer Manyetik Rezonans(NMR) ile kütesel olarak belirlenmiştir (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Farklı izolasyon yöntemlerinde NMR safsızlık değeri



Yöntemler arasında izole edilen DNA'nın verimini karşılaştırmak amacıyla her izolasyon yönteminden iki tekrarlı olmak üzere, her protokolden toplam 6 tekrarlı hem nükleer DNA'yı hedefleyen hem de mtDNA'yı hedefleyen PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası tüm izolasyon yöntemlerinin Ct değeri hesaplanmıştır (Tablo 4-3 ve Tablo 4-4).

Tablo 4-3: Tüm izolasyon yöntemlerinin nükleer DNA qPCR Ct değerleri

Yöntem Adı	Stok Ct	Standart Sapma	1/10 Ct	Standart Sapma
Fenol Kloroform Metodu-1	34,9	1,3	38,0	1,2
Silica Jel Metodu-1	31,0	0,2	34,7	0,5
Fenol Kloroform Metodu-2	31,1	0,0	34,6	0,4
Amonyum Asetat Metodu	32,8	1,2	36,8	0,7
Sodium N-Laurilsarkosin Metodu	39,2	-	38,1	1,4
Silica Jel Metodu-2	36,9	0,6	39,7	0,6
Sodyum Asetat Metodu	35,6	0,6	38,4	0,9
Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit	31,1	0,5	34,5	0,3
Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit	31,6	0,2	35,2	0,4
Negatif	-	-		
Pozitif	26,0	0,1	30,7	

Tablo 4-4: Tüm izolasyon yöntemlerinin qPCR mtDNA Ct değerleri

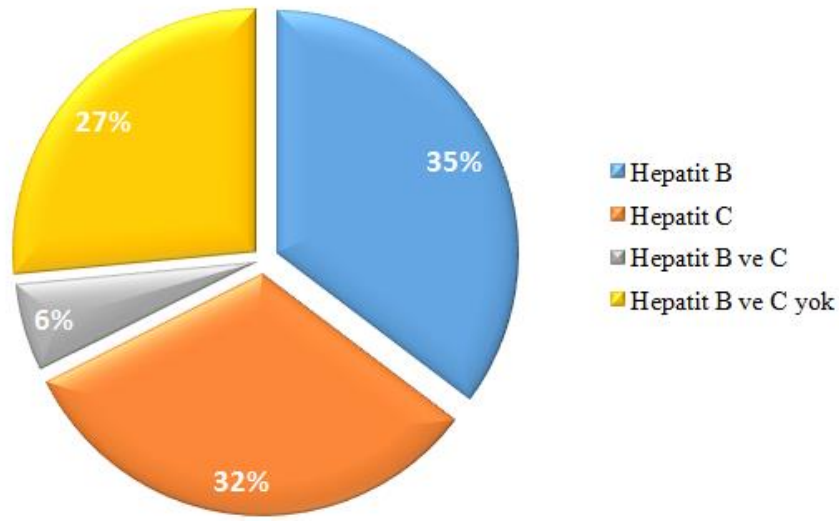
Yöntem Adı	Stok Ct	Standart Sapma	1/10 Ct	Standart Sapma
Fenol Kloroform Metodu-1	26,2	1,1	27,7	0,3
Silica Jel Metodu-1	21,9	0,2	25,4	0,2
Fenol Kloroform Metodu-2	20,9	0,1	25,6	0,2
Amonyum Asetat Metodu	23,3	0,9	26,8	0,9
Sodium N-Laurilsarkosin Metodu	35,0		28,2	0,1
Silica Jel Metodu-2	27,1	0,5	33,3	0,3
Sodyum Asetat Metodu	26,1	0,6	32,1	0,3
Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit	21,5	0,4	24,8	0,2
Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit	21,8	0,1	25,1	0,2
Negatif		0,0		
Pozitif	18,8	0,0	22,2	0,0

Tüm izolasyon yöntemlerinin A260/280 ve A260/230 absorbans değerleri, qNMR safsızlık değerleri, nükleer DNA ve mtDNA PCR sonucu Ct değerleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde ticari olarak satılan Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit ve Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit ile bu tez çalışmasında geliştirilen Silica Jel Metodu-1 ve Fenol Kloroform Metodu-2 yöntemi en yüksek verimde ve saflıkta serbest DNA izolasyonuna olanak sağladığı belirlenmiştir.

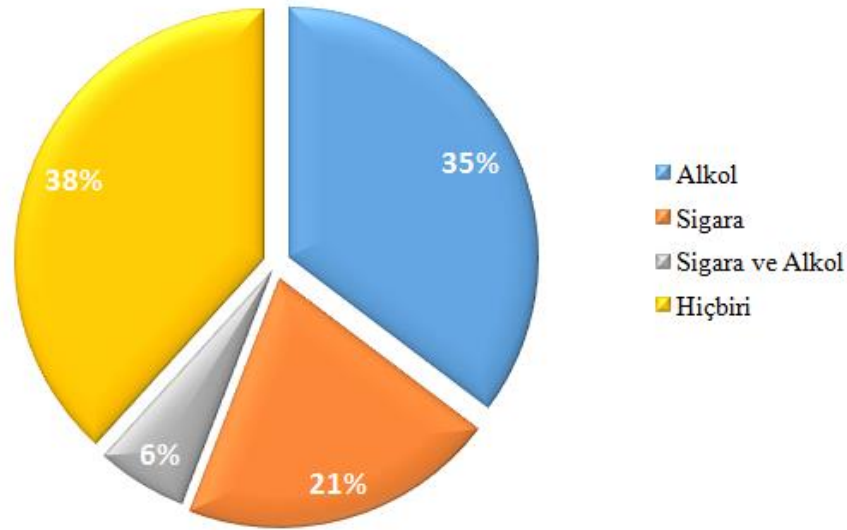
4.2. Hasta ve kontrol örneklere ait bilgiler

Bu tez çalışmasında Hepatoselüler karsinoma hastalığının erken teşhisinde ve tedavisinin izlenmesinde kullanılabilecek biyo-belirteç taranması hedeflenmiş, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü ve İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi polikliniklerine başvuran yeni tanısı konulmuş 34 HCC hastasından alınan serum örnekleri hasta ve hastalıkla ilişkisi olmayan 34 kontrol grubu bireylerden alınan serum örneklerinde serbest DNA izole edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya katılan 34 hastanın 13'üne Hepatit B tanısı konmuş, 12'sine Hepatit C tanısı konulmuş ve 2 hastaya ise hem Hepatit B hem de Hepatit C tanısı konulmuştur (Şekil 4-1). Hastaların 8'ine ise Siroz tanısı konulmuştur. Hastaların 12'si hayatının belli dönemlerinde sigara kullanırken, 7'si hayatının belli dönemlerinde alkol kullanmıştır. Hem sigara hem de alkol kullanan hasta sayısı 2 dir. (Şekil 4-2). Hastaların 14'ünü kadınlar, 20'sini erkekler oluşturmaktadır. Hasta bireylerin en yaşlısı 75, en genci ise 34 yaşındadır. Hastaların yaş ortalaması 46 dır. Kontrol grubunun ise 14'ünü kadınlar, 20'sini erkekler oluşturmaktadır. Kontrol grubu bireyler, her hangi bir kanser tanısı konulmamış, en yaşlısı 75, en genci ise 34 yaşında olan gönüllülerden oluşmuştur. Kontrol grubunun 8'i sigara kullanıcısı, 7'si hayatlarının belli dönemlerinde alkol kullandığını bildirmiştir.



Şekil 4-1: Hasta grubu Hepatit B ve Hepatit C dağılımı



Şekil 4-2: Hasta grubu Sigara ve Alkol kullanım dağılımı

Hasta ve kontrol bireylerden alınan 5 -10 cc venöz kan örnekleri 3000 rpm’de 5dk santrifüj edilerek elde edilen serum örneklerinden ayrıca “mirVana™ miRNA Isolation Kit” kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış optik dansite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Optik dansite sonuçlarına göre tüm örneklerde RNA izolasyonu gerçekleşmiş hem hasta hem de kontrol örneklerde serbest RNA olduğundan dolayı konsantrasyonlarının düşük, izolasyon çözeltisinde ise safsızlıkların yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Hastalardan izole edilen RNA'ların optik dansite sonuçları

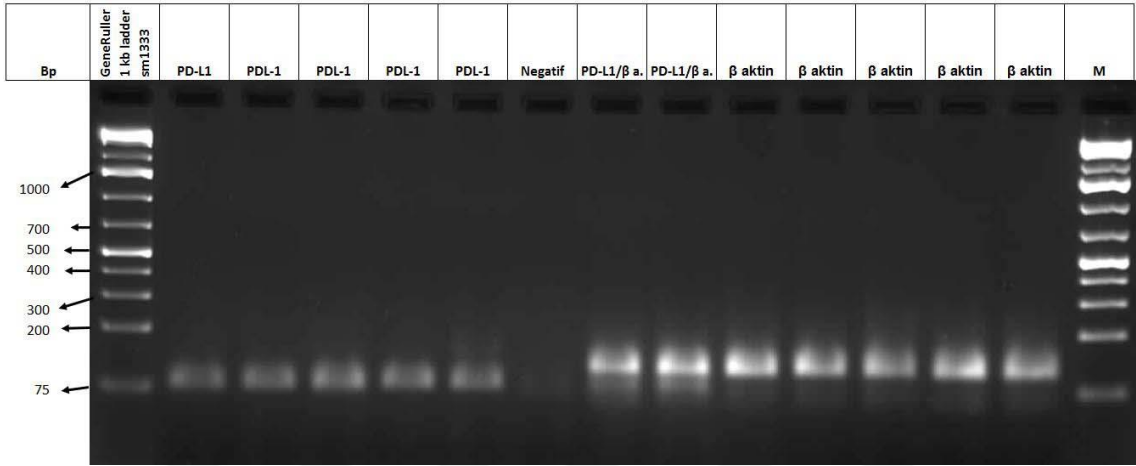
Örnek Adı	ng/ul	260/280	260/230
Hasta- 1	15.8	1.17	0.13
Hasta- 2	9.6	1.32	0.14
Hasta- 3	4.2	1.46	0.36
Hasta- 4	6.8	1.47	0.54
Hasta- 5	22.1	1.38	0.04
Hasta- 6	84.2	1.57	0.15
Hasta- 7	10.7	0.96	0.08
Hasta- 8	4.1	1.58	0.07
Hasta- 9	8.1	0.87	0.10
Hasta- 10	69.4	1.51	0.10
Hasta- 11	4.5	0.78	0.10
Hasta- 12	4.2	0.99	0.16
Hasta- 13	10.5	1.39	0.15
Hasta- 14	4.9	1.60	0.16
Hasta- 15	18.0	1.18	0.03
Hasta- 16	3.5	1.19	0.05
Hasta- 17	15.8	1.36	0.04
Hasta- 18	70.5	1.49	0.10
Hasta- 19	21.9	0.61	0.11
Hasta- 20	53.0	1.98	0.11
Hasta- 21	3.5	1.24	0.10
Hasta- 22	8.2	1.30	0.02
Hasta- 23	13.1	1.18	0.08
Hasta- 24	6.8	0.74	0.12
Hasta- 25	5.0	1.31	0.17
Hasta- 26	5.3	0.81	0.10
Hasta- 27	7.3	1.52	0.67
Hasta- 28	3.5	1.49	0.09
Hasta- 29	36.5	0.89	0.46
Hasta- 30	12.5	1.32	0.04
Hasta- 31	4.4	0.81	0.11
Hasta- 32	5.2	1.37	0.31
Hasta- 33	20.4	1.45	0.21
Hasta- 34	3.5	1.91	0.06

Tablo 4-6: Kontrollerden izole edilen RNA'ların optik dansite sonuçları

Örnek Adı	ng/ul	260/280	260/230
Kontrol- 1	2,2	1,48	0,01
Kontrol- 2	5,53	0,80	0,08
Kontrol- 3	13,6	1,54	0,05
Kontrol- 4	4,1	0,92	0,05
Kontrol- 5	4,4	1,36	0,03
Kontrol- 6	6,1	1,11	0,03
Kontrol- 7	4,9	1,28	0,04
Kontrol- 8	15,8	1,09	0,05
Kontrol- 9	16,0	0,75	0,07
Kontrol- 10	6,04	1,33	0,03
Kontrol- 11	5,21	0,82	-0,10
Kontrol- 12	5,15	1,42	0,06
Kontrol- 13	19,18	1,44	0,05
Kontrol- 14	9,55	0,72	0,04
Kontrol- 15	6,37	1,57	0,01
Kontrol- 16	21,09	0,62	0,08
Kontrol- 17	3,23	1,39	0,01
Kontrol- 18	10,00	1,30	0,11
Kontrol- 19	4,23	0,93	0,02
Kontrol- 20	7,81	0,77	0,06
Kontrol- 21	6,19	1,33	0,03
Kontrol- 22	22,89	1,55	0,04
Kontrol- 23	2,45	1,24	0,14
Kontrol- 24	7,86	1,52	0,05
Kontrol- 25	5,40	1,28	0,06
Kontrol- 26	1,76	3,85	0,11
Kontrol- 27	4,37	1,41	0,02
Kontrol- 28	6,82	1,34	0,03
Kontrol- 29	5,09	1,17	0,07
Kontrol- 30	2,70	1,00	0,05
Kontrol- 31	3,40	0,49	0,03
Kontrol- 32	8,45	1,73	0,02
Kontrol- 33	5,44	0,73	0,11
Kontrol- 34	6,19	1,22	0,07

4.3. PD-L1/Beta aktin gen kopya sayısı değişim analiz bulguları

Hasta ve kontrol bireylerden izole edilen serbest DNA örneklerinde PD-L1/Beta aktin gen kopya sayısı oranındaki olası değişimin belirlenmesi amacıyla her iki gene ait primer ve probalar hem ayrı ayrı hem de çoklu olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak PCR deneyi gerçekleştirilmiş sonrasında agaroz jel elektroforezinde DNA bantlarının istenilen şekilde, tekli ve çoklu olduğu ayrı ayrı gözlemlenmiştir (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: PD-L1 ve Beta aktin genleri agaroz jel elektroforezi

Tüm hasta ve kontrol bireylerden alınan serum örneklerinden izole edilen serbest DNA’larda, PD-L1/Beta aktin gen kopya sayısı hesaplanırken ölçüm belirsizliğini düşürmek amacıyla çoklu PCR reaksiyonu tercih edilmiştir. Deney tüm hasta ve kontrol bireyler için iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu PD-L1/Beta aktin Ct değerleri Tablo 4-7’de, Hasta grubu PD-L1/Beta aktin Ct değerleri Tablo 4-8’de verilmiştir.

Tablo 4-7: Kontrol grubu PD-L1/Beta aktin Ct değerleri

Kontrol Numarası	FAM-Ct	VIC-Ct	FAM-VIC ΔCt	Ortalama ΔCt	Standart Sapma
Kontrol-1	32,10	30,53	1,57		
Kontrol-2	31,82	29,12	2,70		
Kontrol-3	33,48	31,77	1,72		
Kontrol-4	32,92	31,07	1,85		
Kontrol-5	32,27	30,55	1,72		
Kontrol-6	32,49	30,18	2,32		
Kontrol-7	34,14	32,39	1,75		
Kontrol-8	34,24	32,09	2,15		
Kontrol-9	33,07	30,42	2,65		
Kontrol-10	33,56	31,78	1,78		
Kontrol-11	33,23	31,44	1,79		
Kontrol-12	32,89	30,20	2,69		
Kontrol-13	34,18	31,75	2,43		
Kontrol-14	31,96	30,08	1,88		
Kontrol-15	33,94	32,16	1,78		
Kontrol-16	33,23	31,44	1,79		
Kontrol-17	32,57	30,03	2,55	2,202353	$\pm 0,44$
Kontrol-18	31,74	29,97	1,78		
Kontrol-19	33,06	30,58	2,48		
Kontrol-20	33,76	31,39	2,37		
Kontrol-21	33,22	30,82	2,40		
Kontrol-22	34,38	33,45	0,93		
Kontrol-23	31,77	29,16	2,61		
Kontrol-24	31,95	29,27	2,68		
Kontrol-25	31,46	28,95	2,51		
Kontrol-26	35,20	33,40	1,79		
Kontrol-27	32,84	30,21	2,63		
Kontrol-28	32,78	30,52	2,26		
Kontrol-29	32,24	29,70	2,54		
Kontrol-30	33,80	31,11	2,69		
Kontrol-31	31,76	29,18	2,58		
Kontrol-32	34,02	31,54	2,48		
Kontrol-33	33,13	30,53	2,60		
Kontrol-34	32,73	30,25	2,48		

Tablo 4-8: Hasta grubu PD-L1/Beta aktin Ct değerleri

Hasta Numarası	Ortalama FAM-Ct	Ortalama Hex-Ct	FAM-VIC ΔCt	Ortalama ΔCt	Standart Sapma
Hasta-1	32,36	30,07	2,29		
Hasta-2	31,46	28,77	2,69		
Hasta-3	30,55	27,86	2,69		
Hasta-4	32,64	30,34	2,30		
Hasta-5	31,31	28,96	2,36		
Hasta-6	32,83	30,82	2,01		
Hasta-7	31,41	28,67	2,75		
Hasta-8	32,72	30,19	2,53		
Hasta-9	32,90	30,64	2,26		
Hasta-10	34,77	32,20	2,58		
Hasta-11	32,80	30,02	2,78		
Hasta-12	32,82	30,13	2,69		
Hasta-13	31,39	30,12	1,27		
Hasta-14	32,01	29,68	2,33		
Hasta-15	31,87	29,71	2,17		
Hasta-16	30,39	28,32	2,07		
Hasta-17	32,11	30,23	1,88	2,35	±0,42
Hasta-18	31,55	29,40	2,15		
Hasta-19	28,05	25,12	2,93		
Hasta-20	31,14	28,18	2,97		
Hasta-21	34,08	32,46	1,62		
Hasta-22	29,95	28,77	1,18		
Hasta-23	30,31	27,75	2,56		
Hasta-24	31,60	29,06	2,54		
Hasta-25	26,94	24,13	2,81		
Hasta-26	33,56	31,18	2,38		
Hasta-27	33,12	30,98	2,14		
Hasta-28	30,29	27,86	2,44		
Hasta-29	31,72	29,09	2,63		
Hasta-30	31,14	28,71	2,43		
Hasta-31	29,13	26,44	2,69		
Hasta-32	29,26	27,07	2,19		
Hasta-33	33,82	31,63	2,20		
Hasta-34	29,63	27,02	2,61		

4.4. Serbest mtDNA kopya sayısı analiz bulguları

Hasta ve kontrol bireylerden alınan serum örneklerinden izole edilen serbest DNA örnekleri ilk olarak konsantrasyonları ölçülmüş, hastalardan izole edilen DNA'ların optik dansite sonuçları Tablo 4-9'da, kontrollerden izole edilen DNA'ların optik dansite sonuçları Tablo 4-10'da verilmiştir.

Tablo 4-9: Hastalardan izole edilen DNA'ların optik dansite sonuçları

Örnek Adı	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
Kontrol- 1	10,2	0,204	0,107	1,91	0,86
Kontrol- 2	10,34	0,207	0,125	1,65	0,88
Kontrol- 3	36,29	0,726	0,496	1,46	0,91
Kontrol- 4	23,46	0,469	0,323	1,45	0,78
Kontrol- 5	40,77	0,815	0,547	1,49	0,96
Kontrol- 6	12,01	0,24	0,138	1,74	0,86
Kontrol- 7	25,87	0,517	0,359	1,44	0,76
Kontrol- 8	38,57	0,771	0,526	1,47	0,91
Kontrol- 9	20,54	0,411	0,261	1,58	0,76
Kontrol- 10	5,57	0,111	0,082	1,37	0,8
Kontrol- 11	6,13	0,123	0,075	1,63	0,81
Kontrol- 12	5,9	0,118	0,062	1,89	0,77
Kontrol- 13	6,4	0,128	0,079	1,63	0,75
Kontrol- 14	6,78	0,136	0,084	1,62	0,66
Kontrol- 15	45,15	0,903	0,621	1,45	0,96
Kontrol- 16	8,68	0,174	0,087	2	0,89
Kontrol- 17	10,84	0,217	0,124	1,75	0,85
Kontrol- 18	10,68	0,214	0,138	1,55	0,88
Kontrol- 19	1,66	0,033	0,104	0,32	1,71
Kontrol- 20	29,36	0,587	0,392	1,5	0,86
Kontrol- 21	29,6	0,592	0,401	1,48	0,73
Kontrol- 22	6,1	0,122	0,087	1,4	0,77
Kontrol- 23	20	0,4	0,261	1,53	0,77
Kontrol- 24	41,28	0,826	0,546	1,51	0,94
Kontrol- 25	32,46	0,649	0,416	1,56	0,9
Kontrol- 26	41,49	0,83	0,567	1,46	0,95
Kontrol- 27	23	0,46	0,31	1,48	0,77
Kontrol- 28	4,76	0,095	0,045	2,14	0,83
Kontrol- 29	5,53	0,111	0,07	1,57	0,85
Kontrol- 30	22,29	0,446	0,29	1,54	0,78
Kontrol- 31	24,07	0,481	0,316	1,53	0,85
Kontrol- 32	10,31	0,206	0,124	1,67	0,89
Kontrol- 33	7,26	0,145	0,095	1,52	0,67
Kontrol- 34	23,27	0,465	0,311	1,5	0,83

Tablo 4-10: Kontrollerden izole edilen DNA'ların optik dansite sonuçları

Örnek Adı	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
Kontrol- 1	10,2	0,204	0,107	1,91	0,86
Kontrol- 2	10,34	0,207	0,125	1,65	0,88
Kontrol- 3	36,29	0,726	0,496	1,46	0,91
Kontrol- 4	23,46	0,469	0,323	1,45	0,78
Kontrol- 5	40,77	0,815	0,547	1,49	0,96
Kontrol- 6	12,01	0,24	0,138	1,74	0,86
Kontrol- 7	25,87	0,517	0,359	1,44	0,76
Kontrol- 8	38,57	0,771	0,526	1,47	0,91
Kontrol- 9	20,54	0,411	0,261	1,58	0,76
Kontrol- 10	5,57	0,111	0,082	1,37	0,8
Kontrol- 11	6,13	0,123	0,075	1,63	0,81
Kontrol- 12	5,9	0,118	0,062	1,89	0,77
Kontrol- 13	6,4	0,128	0,079	1,63	0,75
Kontrol- 14	6,78	0,136	0,084	1,62	0,66
Kontrol- 15	45,15	0,903	0,621	1,45	0,96
Kontrol- 16	8,68	0,174	0,087	2	0,89
Kontrol- 17	10,84	0,217	0,124	1,75	0,85
Kontrol- 18	10,68	0,214	0,138	1,55	0,88
Kontrol- 19	1,66	0,033	0,104	0,32	1,71
Kontrol- 20	29,36	0,587	0,392	1,5	0,86
Kontrol- 21	29,6	0,592	0,401	1,48	0,73
Kontrol- 22	6,1	0,122	0,087	1,4	0,77
Kontrol- 23	20	0,4	0,261	1,53	0,77
Kontrol- 24	41,28	0,826	0,546	1,51	0,94
Kontrol- 25	32,46	0,649	0,416	1,56	0,9
Kontrol- 26	41,49	0,83	0,567	1,46	0,95
Kontrol- 27	23	0,46	0,31	1,48	0,77
Kontrol- 28	4,76	0,095	0,045	2,14	0,83
Kontrol- 29	5,53	0,111	0,07	1,57	0,85
Kontrol- 30	22,29	0,446	0,29	1,54	0,78
Kontrol- 31	24,07	0,481	0,316	1,53	0,85
Kontrol- 32	10,31	0,206	0,124	1,67	0,89
Kontrol- 33	7,26	0,145	0,095	1,52	0,67
Kontrol- 34	23,27	0,465	0,311	1,5	0,83

Hasta ve kontrollerden izole edilen DNA'ların konsantrasyonlarındaki değişim hem serbest DNA olmasından kaynaklı belirsizliğin yüksek olması hem de izolasyon örneğinin içerdiği yağ miktarı ile doğrudan orantılı oluğu düşünülmektedir. Analiz sırasında aynı kişiye ait iki gen göreceli olarak değerlendirildiğinden izole edilen DNA'nın konsantrasyonu analiz sonucunu değiştirmeyecektir.

mtDNA kopya sayısındaki değişimin belirlenmesi amacıyla Beta aktin genine oranı hem qPCR hem de dPCR ile belirlenmiştir. İkişer tekrarlı gerçekleştirilen qPCR reaksiyonu sonucu elde edilen hasta grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni qPCR Ct değerleri ortalamaları Tablo 4-11'de verilmiştir.



Tablo 4-11: Hasta grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni qPCR Ct değerleri

Hasta Numarası	Ortalama FAM-Ct	Ortalama Hex-Ct	HEX-FAM Δ Ct	Ortalama Δ Ct	Standart Sapma
Hasta-1	27,77	30,79	3,02		
Hasta-2	24,085	27,1	3,015		
Hasta-3	27,235	30,385	3,15		
Hasta-4	24,575	29,725	5,15		
Hasta-5	24,01	26,755	2,745		
Hasta-6	24,765	28,36	3,595		
Hasta-7	22,715	26,245	3,53		
Hasta-8	24,58	29,825	5,245		
Hasta-9	24,475	28,48	4,005		
Hasta-10	26,78	31,25	4,47		
Hasta-11	24,43	28,62	4,19	3,73	0,94
Hasta-12	25,425	28,985	3,56		
Hasta-13	24,385	27,95	3,565		
Hasta-14	23,87	28,01	4,14		
Hasta-15	22,94	29,245	6,305		
Hasta-16	23,18	26,38	3,2		
Hasta-17	25,515	27,985	2,47		
Hasta-18	23,49	27,6	4,11		
Hasta-19	21,36	23,595	2,235		
Hasta-20	23,125	26,99	3,865		
Hasta-21	24,175	28,74	4,565		
Hasta-22	23,995	28,41	4,415		
Hasta-23	23,105	26,5	3,395		
Hasta-24	24,02	27,65	3,63		
Hasta-25	19,53	22,7	3,17		
Hasta-26	25,07	29,17	4,1		
Hasta-27	25,375	29,27	3,895		
Hasta-28	23,825	26,495	2,67		
Hasta-29	23,935	27,81	3,875		
Hasta-30	23,325	27,46	4,135		
Hasta-31	23,085	24,98	1,895		
Hasta-32	20,675	24,75	4,075		
Hasta-33	25,055	30,265	5,21		
Hasta-34	23,315	25,635	2,32		

Hasta grubundan elde edilen veriler karşılaştırılmak üzere aynı reaksiyon kontrol grubunda da ikişer tekrarlı olmak üzere gerçekleştirilmiştir. qPCR reaksiyonu sonucu elde edilen kontrol grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni qPCR Ct değerleri Tablo 4-12’de verilmiştir.

Tablo 4-12: Kontrol grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni qPCR Ct değerleri

Kontrol Numarası	Ortalama FAM-Ct	Ortalama Hex-Ct	HEX-FAM Δ Ct	Ortalama Δ Ct	Standart Sapma
Kontrol-1	24,355	28,635	4,28		
Kontrol-2	23,455	27,64	4,185		
Kontrol-3	25,675	30,175	4,5		
Kontrol-4	23,885	29,05	5,165		
Kontrol-5	24,055	28,435	4,38		
Kontrol-6	23,545	27,84	4,295		
Kontrol-7	25,73	30,28	4,55		
Kontrol-8	24,12	30,33	6,21		
Kontrol-9	23,405	28,53	5,125		
Kontrol-10	24,155	29,45	5,295		
Kontrol-11	24,39	29,59	5,2		
Kontrol-12	23,74	28,3	4,56		
Kontrol-13	24,315	28,805	4,49	4,53	0,54
Kontrol-14	23,19	27,125	3,935		
Kontrol-15	25	29,465	4,465		
Kontrol-16	24,815	29,185	4,37		
Kontrol-17	23,98	28,42	4,44		
Kontrol-18	25,06	29,115	4,055		
Kontrol-19	24,17	27,875	3,705		
Kontrol-20	24,755	28,515	3,76		
Kontrol-21	24,105	28,16	4,055		
Kontrol-22	27,125	31,595	4,47		
Kontrol-23	23,73	27,66	3,93		
Kontrol-24	23,63	28,165	4,535		
Kontrol-25	24,13	28,425	4,295		
Kontrol-26	24,865	29,45	4,585		

Tablo 4-13: devamı

Kontrol Numarası	Ortalama FAM-Ct	Ortalama Hex-Ct	HEX-FAM Δ Ct
Kontrol-27	24,91	29,49	4,58
Kontrol-28	23,23	28,31	5,08
Kontrol-29	24,21	27,88	3,67
Kontrol-30	24,515	29,41	4,895
Kontrol-31	22,865	27,46	4,595
Kontrol-32	24,6	29,615	5,015
Kontrol-33	24,355	28,405	4,05
Kontrol-34	23,265	28,46	5,195

mtDNA kopya sayısındaki değişimin hassas olarak belirlenmesi için, Beta aktin genine oranı dPCR ile belirlenmiştir. Her bir reaksiyonda maksimum 24 örnek (Çip) çalışılabilirdiğinden, reaksiyon başına maksimum 24 örnek çalışılmıştır. Özellikle mtDNA kopya sayısının dijital PCR çalışma aralığı dışında kalan (yüksek değer) örnekler seyreltilerek reaksiyonları tekrar gerçekleştirilmiştir.

dPCR reaksiyonu sonucu elde edilen hasta grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni çip görüntüleri “QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software” yazılımında tüm örneklerin bir birlerinden bağımsız analizleri sonucu elde edilen mikro litredeki kopya sayısı değerleri ve yazılımında kullanılan “poison” istatistikliğine ait ortaya çıkan hata değeri Tablo 4-14’de verilmiştir

Tablo 4-14: Hasta grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni kopya sayısı değerleri

Hasta NO	mt DNA k/µl	Kopya/ Mikrolitre (FAM)	Poison hatası (FAM)	Beta Aktin k/µl	Kopya/ mikrolitre (HEX)	Poison hatası (FAM)	mtDNA /Beta aktin
H_1	3046,3	3003,3 - 3090	1,43%	73,542	68,774 - 78,641	6,93%	41,4
H_2	3544,9	3489,1 - 3601,5	1,60%	58,827	55,944 - 61,858	5,15%	60,3
H_3	1456,6	1436,4 - 1477	1,41%	34,877	32,655 - 37,249	6,80%	41,8
H_4	1617,4	1595,6 - 1639,5	1,37%	39,691	37,326 - 42,207	6,34%	40,7
H_5	2425,4	2390,7 - 2460,6	1,45%	14,674	13,263 - 16,235	10,64%	165,3
H_6	1107,3	1091,3 - 1123,6	1,47%	23,63	22,074 - 25,296	7,05%	46,9
H_7	837,37	823,48 - 851,5	1,69%	49,028	46,417 - 51,786	5,63%	17,1
H_8	702,08	690,43 - 713,92	1,69%	7,933	6,887 - 9,139	15,20%	88,5
H_9	1035,7	1020,3 - 1051,2	1,50%	14,882	12,805 - 17,296	16,22%	69,6
H_10	257,44	250,83 - 264,23	2,64%	5,833	4,986 - 6,824	16,99%	44,2
H_11	1398,3	1378,5 - 1418,4	1,44%	18,672	17,072 - 20,422	9,37%	74,8
H_12	649,74	638,23 - 661,46	1,80%	15,158	13,724 - 16,742	10,45%	42,8
H_13	1701,9	1678,9 - 1725,1	1,37%	32,975	30,794 - 35,31	7,08%	51,6
H_14	1940,3	1914,4 - 1966,5	1,35%	23,639	21,821 - 25,609	8,33%	82,1
H_15	1795,6	1771,1 - 1820,3	1,38%	26,272	24,319 - 28,382	8,03%	68,3
H_16	1809,2	1784,8 - 1834	1,37%	74,53	71,271 - 77,939	4,57%	24,3
H_17	1734,2	1710,7 - 1750,2	1,34%	38,93	36,41 - 41,44	6,45%	44,5
H_18	526,29	516,63 - 536,13	1,87%	44,934	42,686 - 47,301	5,27%	11,7
H_19	3272,4	3226,1 - 3319,3	1,43%	292,87	285,69 - 300,22	2,51%	11,2
H_20	2195,8	2166 - 2226	1,38%	35,186	32,957 - 37,567	6,76%	62,4
H_21	1847,9	1823,3 - 1872,8	1,35%	110,33	106,23 - 114,59	3,86%	16,7
H_22	1583,1	1560,9 - 1605,6	1,42%	29,992	27,964 - 32,167	7,25%	52,0
H_23	3031,8	2990,1 - 3074,1	1,40%	99,86	95,871 - 104,02	4,16%	30,4
H_24	1665,3	1643,4 - 1687,4	1,33%	40,668	38,292 - 43,193	6,21%	40,9
H_25	2152,5	2123,3 - 2182	1,37%	69,748	66,455 - 73,204	4,95%	30,8
H_26	1306,6	1287,9 - 1325,6	1,46%	15,012	13,555 - 16,624	10,74%	87,1
H_27	369,25	361,16 - 377,51	2,24%	10,041	8,857 - 11,384	13,37%	36,7
H_28	1669,3	1647,7 - 1691,1	1,31%	61,996	59,011 - 65,132	5,06%	26,9
H_29	1801,1	1776,7 - 1825,9	1,38%	35,358	32,132 - 38,907	10,04%	50,9
H_30	2810,9	2772,4 - 2849,9	1,39%	44,371	40,807 - 48,248	8,74%	63,4
H_31	3284,6	3236,4 - 3333,6	1,49%	197,86	192,46 - 203,42	2,81%	16,6
H_32	2768,8	2730,3 - 2807,3	1,39%	170,62	165,4 - 176	3,15%	16,3
H_33	785,79	773,19 - 798,59	1,63%	10,643	9,436 - 12,005	12,80%	73,8
H_34	2566,7	2531,6 - 2602,3	1,39%	129,14	124,66 - 133,78	3,59%	19,8

dPCR reaksiyonu sonucu elde edilen kontrol grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni kopya sayısı değerleri Tablo 4-15’de verilmiştir.

Tablo 4-15: Kontrol grubu örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni kopya sayısı değerleri

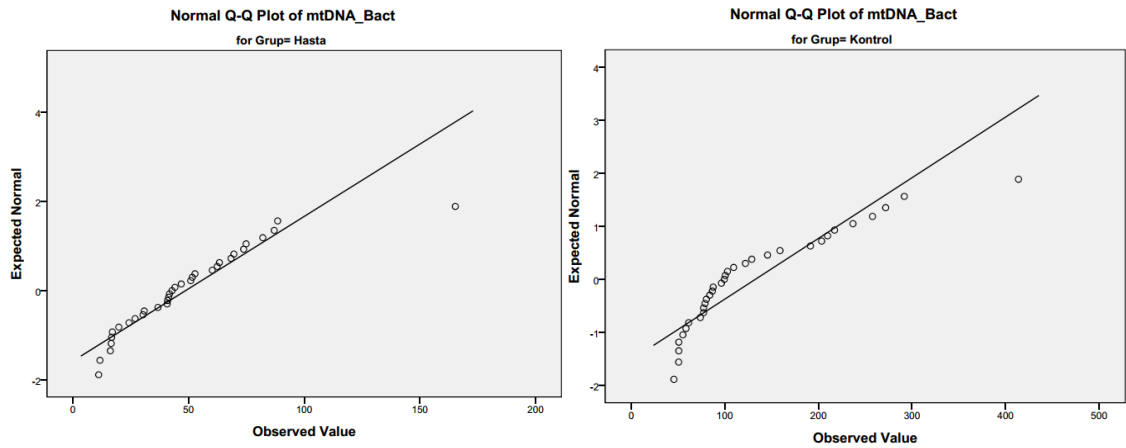
Kontrol NO	mt DNA k/μl	Kopya/ mikrolitre (FAM)	Poison hatası (FAM)	Beta Aktin k/μl	Kopya/ mikrolitre (HEX)	Poison hatası (FAM)	mtDNA /Beta aktin
K_1	1244,5	1226,4 - 1262,9	0,0148	12,388	11,104 - 13,82	0,1156	100,5
K_2	1968,6	1941,7 - 1995,8	0,0138	24,948	23,095 - 26,95	0,0802	78,9
K_3	1746	1721,7 - 1770,7	0,0141	6,753	5,833 - 7,819	0,1578	258,5
K_4	982,26	966,76 - 998,02	0,016	16,796	15,268 - 18,478	0,10013	58,5
K_5	1934,3	1907,6 - 1961,3	0,014	19,445	17,846 - 21,187	0,0896	99,5
K_6	1579,4	1558 - 1601,2	0,0138	7,529	6,553 - 8,652	0,1491	209,7
K_7	980,04	964,87 - 995,44	0,0157	6,725	5,822 - 7,767	0,155	145,7
K_8	1974,8	1947,2 - 2002,9	0,0142	9,09	7,975 - 10,362	0,1399	217,3
K_9	1769,8	1745,2 - 1794,8	0,0141	13,736	12,361 - 15,265	0,1113	128,8
K_10	2699,9	2661,7 - 2738,7	0,0144	11,398	10,167 - 12,779	0,1211	236,8
K_11	2883,4	2840,4 - 2927	0,0151	14,174	12,818 - 15,674	0,1058	203,5
K_12	1914,5	1888,7 - 1940,7	0,0137	6,561	5,625 - 7,654	0,1665	291,8
K_13	544,6	534,34 - 555,05	0,0192	6,283	5,376 - 7,344	0,1688	86,7
K_14	3487	3436,3 - 3538,5	0,0148	33,919	31,719 - 36,271	0,0693	102,8
K_15	461	451,28 - 470,93	0,0215	7,51	6,497 - 8,681	0,15592	61,4
K_16	3057,9	3012,9 - 3103,6	0,015	7,39	6,408 - 8,522	0,1532	413,8
K_17	2554	2517,5 - 2590,9	0,0145	16,073	14,602 - 17,693	0,1008	158,9
K_18	3196,8	3150 - 3244,3	0,0149	11,758	10,496 - 13,172	0,1202	271,8
K_19	891,51	877,02 - 906,25	0,0165	16,169	14,657 - 17,836	0,1031	55,1
K_20	502,16	492,55 - 511,95	0,0195	9,883	8,27 - 11,811	0,1951	50,8
K_21	708,97	697,22 - 720,92	0,0169	8,835	7,729 - 10,099	0,143	80,2
K_22	308,78	301,44 - 316,3	0,0243	6,075	5,227 - 7,06	0,16222	50,8
K_23	1669,3	1645,5 - 1693,3	0,0144	32,948	30,758 - 35,295	0,0712	50,6
K_24	1463,9	1443,6 - 1484,4	0,014	5,679	4,823 - 6,687	0,17744	257,7
K_25	1892,2	1867,1 - 1917,6	0,0134	22,527	20,787 - 24,412	0,0837	83,9
K_26	205,96	200,01 - 212,09	0,0298	4,516	3,771 - 5,41	0,1977	45,6
K_27	992,13	976,78 - 1007,7	0,0157	12,838	11,58 - 14,234	0,1087	77,3
K_28	2002,1	1975,7 - 2029	0,0134	18,295	16,678 - 20,068	0,0969	109,4
K_29	1040,7	1024,9 - 1056,7	0,0154	5,435	4,585 - 6,442	0,1853	191,5
K_30	809,34	796,19 - 822,71	0,0165	9,25	7,723 - 11,079	0,1977	87,5
K_31	2635,1	2599,3 - 2671,3	0,0138	34,101	31,83 - 36,535	0,0714	77,3
K_32	660,15	648,85 - 671,65	0,0174	5,41	4,273 - 6,85	0,2661	122,0
K_33	949,98	935,61 - 964,57	0,0154	12,86	11,543 - 14,328	0,1141	73,9
K_34	1557,6	1535,3 - 1580,2	0,0145	16,166	14,652 - 17,838	0,1034	96,3

Hasta ve kontrol grubuna ait örneklerin mtDNA kopya sayısının Beta aktin geni kopya sayısına oranı hassas olarak belirlenmiştir. Analiz sonrası elde edilen hasta ve kontrol grubu verilerin dağılımlarının normalliğinin belirlenmesi amacıyla, SPSS statistics 22 programında, Skewness (Çarpıklık) ve Kurtosis (Basıklık) değerleri hesaplanmış (Tablo 4-16). Kolmogorov-Smirnov Shapiro-Wilk testleri uygulanmıştır.

Tablo 4-16: mtDNA-Beta aktin kopya sayısı dağılım değerleri

	Skewness	Kurtosis	Kolmogorov-Smirnov	Shapiro-Wilk
İstatistik değeri	1,84	3,647	,000003	,000002
Std hata	,291	0,574	-	-

Hem Kolmogorov-Smirnov hem de Shapiro-Wilk, $p < 0,05$ olduğundan kontrol ve hasta grubu örneklerin mtDNA kopya sayısının Beta aktin gen kopyasayısına oran değerlerinin normal dağılmadığı belirlenmiştir.



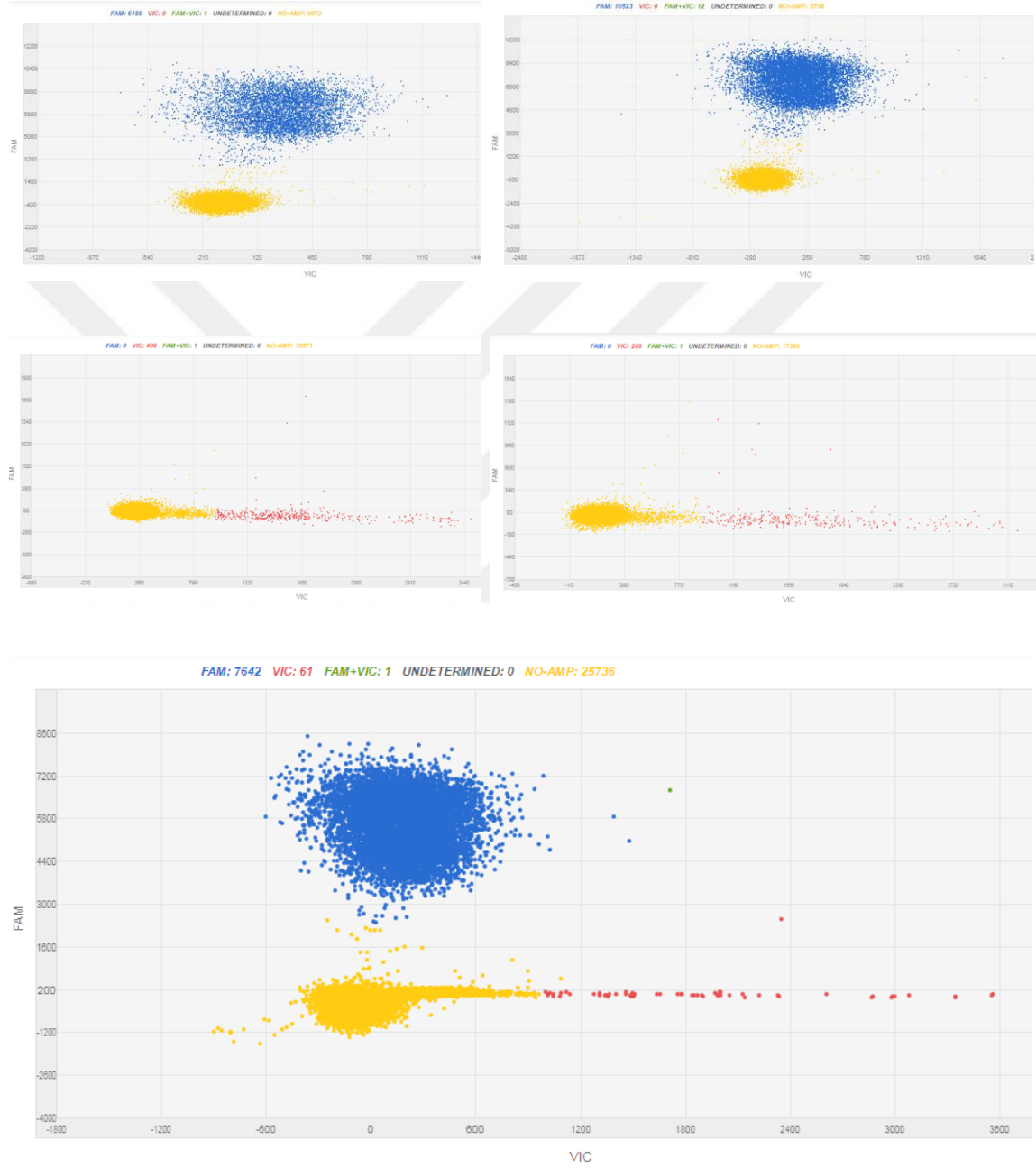
Şekil 4-4: Hasta ve kontrol grubu mtDNA kopya sayısının Beta aktin gen kopyasayısına oran dağılım grafiği

Hasta ve kontrol grubuna ait tüm verilere “parametrik olmayan 2-bağımsız gruplar” analizi yapılarak Mann-Whitney testi değerleri elde edilmiştir. Bu test sonucuna göre $p < 0,05$ bulunduğu için hasta ve kontrol grubu arasında mtDNA kopya sayısının Beta aktin gen kopyasayısına oran değerlerini anlamlı bulunmuştur. Bu verilere göre hasta ve kontrol grubu 2,8 kat fark olduğu ve mtDNA kopya sayısının Beta aktin gen kopyasayısına oranının hasta grubunda düştüğü belirlenmiştir (Tablo 4-17).

Tablo 4-17: Hasta ve kontrol grubu mtDNA kopya sayısının Beta aktin gen kopyasayısına oranı Mann-Whitney test değerleri

Grup	N	mtDNA /Beta aktin	Standart Sapma	Z	p
Hasta	34	48,6	2,02	-5,532	,0000002
Kontrol	34	136,3	2,3		
Kontrol/Hasta			2,804		

Hasta ve kontrol grubuna ait bazı örneklerin mtDNA ve Beta aktin geni dPCR reaksiyonu sonucu çiplerden okunan FAM ve HEX (VIC) absorbands örnek değerleri ve görüntüleri ile negatif kuyulardan alınan görüntüler Şekil 4-5’de verilmiştir.



Şekil 4-5: Çiplerden okunan FAM ve HEX (VIC) absorbands örnek değerleri ve görüntüleri

4.5. miRNA ekspresyon analizi bulguları

Çalışma kapsamında hasta ve kontrol grubu bireylerde, hsa-mir-33a, hsa-mir-203, hsa-mir-361 ve hsa-mir-424 ile kontrol olarak RNU6B'nin ekspresyon seviyeleri belirlendi.

Hasta grubu mikroRNA Δ Ct değeri: (hedef miRNA Ct) – (Ct RNU6B)

Kontrol grubu mikroRNA Δ Ct değeri:: (Hasta Ct miR)- (Kontrol Ct U6)

Hasta/Kontrol $\Delta\Delta$ Ct: (Δ Ct miR-Hasta) – (Δ Ct miR-Kontrol)

$2^{\Delta\Delta Ct}$

qPCR reaksiyonu sonucu elde edilen Ct değerleri kullanılarak hasta ve kontrol grubu bireyler arasındaki ekspresyon seviyeleri değişimi gözlemlendi. Aşağıda elde edilen bulgular her bir hedef miRNA için ayrı ayrı verilmiştir.

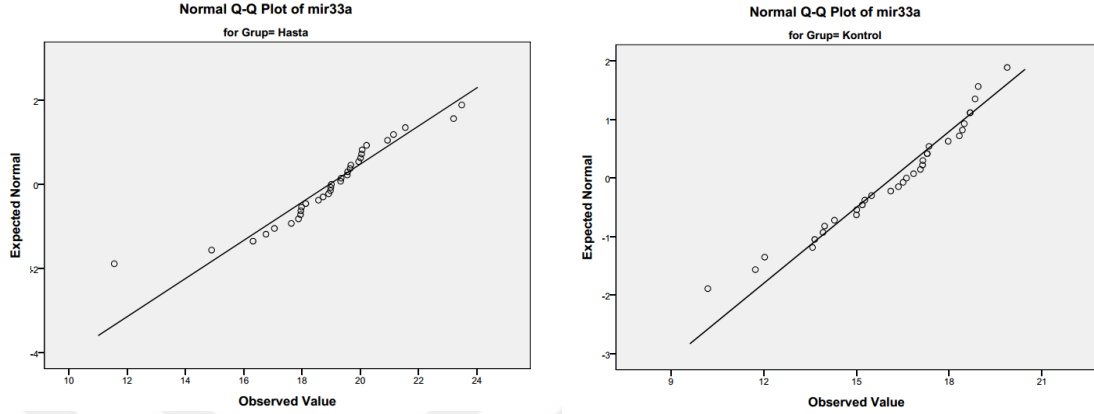
4.5.1. hsa-mir-33a ekspresyon seviyesi bulguları

Kontrol ve hastalardan izole edilen RNA'larda hsa-mir-33a ekspresyon değişim değerleri, RNU6B ile kıyaslanarak delta-delta-Ct analizi ile belirlendi. İlk olarak hasta ve kontrol grubu verilerin dağılımları, SPSS statistics 22 programında, Skewness (Çarpıklık) ve Kurtosis (Basıklık) değerleri hesaplanmış (Tablo 4-18). Kolmogorov-Smirnov Shapiro-Wilk testleri uygulanmıştır.

Tablo 4-18: hsa-mir-33a ekspresyon seviyesi dağılım değerleri

	Skewness	Kurtosis	Kolmogorov-Smirnov	Shapiro-Wilk
İstatistik değeri	-,504	,350	,200	,108
Std hata	,293	0,578	-	-

Hem Kolmogorov-Smirnov hem de Shapiro-Wilk, $p>0,05$ olduğundan kontrol ve hasta grubu örneklerin hsa-mir-33a ekspresyon seviyesinin delta Ct değerlerinin normal dağıldığı belirlenmiştir.



Şekil 4-6: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-33a ekspresyon dağılım grafiği

Hasta ve kontrol grubuna ait tüm verilere “bağımsız gruplar için t-testi” analizi yapılmış ve $p<0,05$ bulunduğu için hasta ve kontrol grubu arasında hsa-mir-33a ekspresyon seviyelerinde fark anlamlı bulunmuştur. Bu verilere göre hasta ve kontrol grubu arasında $2^{2,87}$ (7,3) kat fark olduğu ve hsa-mir-33a’nın hasta grubunda ekspresyon seviyesinin bu oranda azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4-19).

Tablo 4-19: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-33a t-test değerleri

		Ortalama	Standart			
Grup	N	ΔCt	Sapma	t	df	p
Hasta	33	18,94	2,2	5,17	65	,000002
Kontrol	34	16,07	2			
$\Delta\Delta Ct$			2,87			

4.5.2. hsa-mir-203b ekspresyon seviyesi bulguları

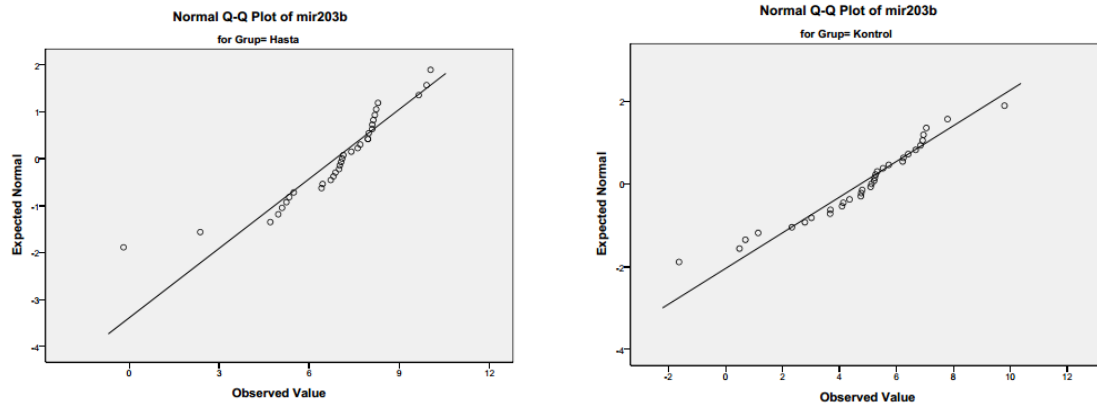
Kontrol ve hastalardan izole edilen RNA’larda hsa-mir-203b ekspresyon değışim değeri, RNU6B ile kıyaslanarak delta-delta-Ct analizi ile belirlendi. İlk olarak hasta ve kontrol grubu verilerin dağılımları, SPSS statistics 22 programında, Skewness (Çarpıklık) ve Kurtosis (Basıklık) değeri hesaplanmış (Tablo 4-20). Kolmogorov-Smirnov Shapiro-Wilk testleri uygulanmıştır.

Tablo 4-20: hsa-mir-203b ekspresyon seviyesi dağılım değeri

	Skewness	Kurtosis	Kolmogorov-Smirnov	Shapiro-Wilk
İstatistik değeri	-,813	,724	,044	,008
Std hata	,293	0,578	-	-

Hem Kolmogorov-Smirnov hem de Shapiro-Wilk, $p < 0,05$ olduğundan kontrol ve hasta grubu örneklerin hsa-mir-203b ekspresyon seviyesinin delta Ct değeri normal dağılmadığı belirlenmiştir.

Tablo 4-21: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-203b ekspresyon dağılım grafiğı



Hasta ve kontrol grubuna ait tüm verilere “parametrik olmayan 2-bağımsız gruplar” analizi yapılarak Mann-Whitney testi değeri elde edilmiştir. Bu test sonucuna göre $p < 0,05$ bulunduğu için hasta ve kontrol grubu arasında hsa-mir-203b ekspresyon seviyelerinde fark anlamlı bulunmuştur. Bu verilere göre hasta ve kontrol

grubu arasında $2^{4,6}$ (4,6) kat fark olduğu ve hsa-mir-203b'nin hasta grubunda ekspresyon seviyesinin bu oranda azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4-22).

Tablo 4-22: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-203b Mann-Whitney test değerleri

		Ortalama	Standart		
Grup	N	ΔCt	Sapma	Z	p
Hasta	33	6,87	2,02	-4,314	,000007
Kontrol	34	4,66	2,3		
$\Delta\Delta Ct$			2,21		

4.5.3. hsa-mir-361 Ekspresyon Seviyesi Bulguları

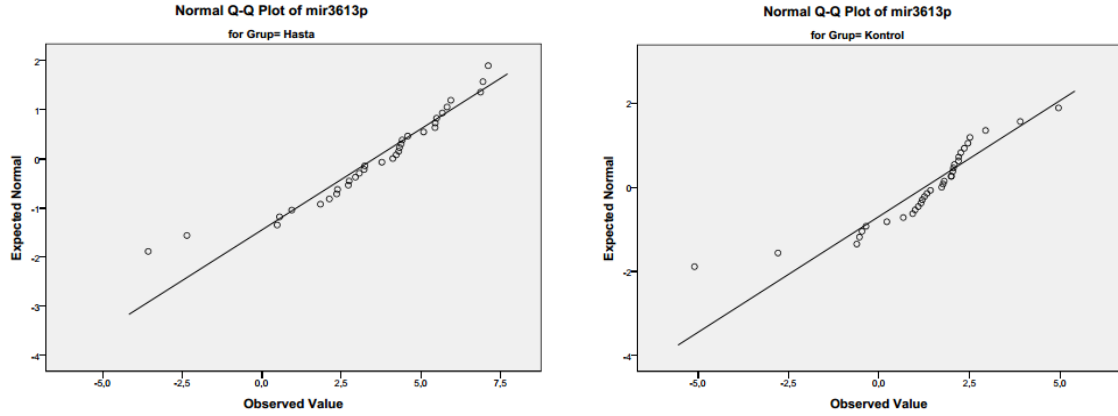
Kontrol ve hastalardan izole edilen RNA'larda hsa-mir-361 ekspresyon değişim değerleri, RNU6B ile kıyaslanarak delta-delta-Ct analizi ile belirlendi. İlk olarak hasta ve kontrol grubu verilerin dağılımları, SPSS statistics 22 programında, Skewness (Çarpıklık) ve Kurtosis (Basıklık) değerleri hesaplanmış (Tablo 4-23). Kolmogorov-Smirnov Shapiro-Wilk testleri uygulanmıştır.

Tablo 4-23: hsa-mir-361 ekspresyon seviyesi dağılım değerleri

	Skewness	Kurtosis	Kolmogorov-Smirnov	Shapiro-Wilk
İstatistik değeri	-,452	,752	,087	,972
Std hata	,293	0,578	-	-

Hem Kolmogorov-Smirnov hem de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$ olduğundan kontrol ve hasta grubu örneklerin hsa-mir-361-3p ekspresyon seviyesinin delta Ct değerlerinin normal dağıldığı belirlenmiştir.

Tablo 4-24: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-361 ekspresyon dağılım grafiği



Hasta ve kontrol grubuna ait tüm verilere “bağımsız gruplar için t-testi” analizi yapılmış ve $p < 0,05$ bulunduğu için hasta ve kontrol grubu arasında hsa-mir-361-3p ekspresyon seviyelerinde fark anlamlı bulunmuştur. Bu verilere göre hasta ve kontrol grubu arasında $2^{2,35}$ (5,1) kat fark olduğu ve hsa-mir-361-3p’nin hasta grubunda ekspresyon seviyesinin bu oranda azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4-25).

Tablo 4-25: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-361-3p t-test değerleri

Grup	N	Ortalama ΔCt	Standart Sapma	t	df	p
Hasta	33	3,54	2,43	4,474	65	,000032
Kontrol	34	1,19	1,83			
$\Delta\Delta Ct$				2,35		

4.5.4. hsa-mir-424 ekspresyon seviyesi bulguları

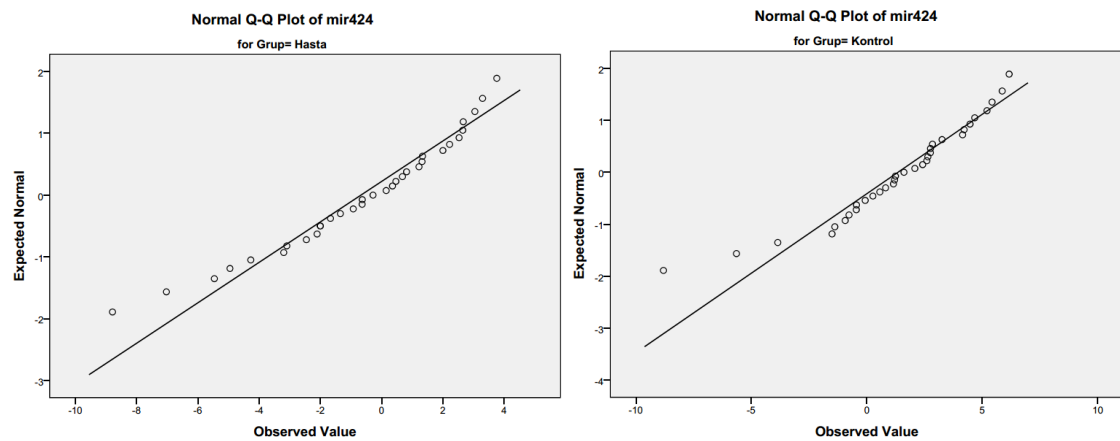
Kontrol ve hastalardan izole edilen RNA’larda hsa-mir-361 ekspresyon değışim değeri, RNU6B ile kıyaslanarak delta-delta-Ct analizi ile belirlendi. İlk olarak hasta ve kontrol grubu verilerin dağılımları, SPSS statistics 22 programında, Skewness (Çarpıklık) ve Kurtosis (Basıklık) değeri hesaplanmış (Tablo 4-26). Kolmogorov-Smirnov Shapiro-Wilk testleri uygulanmıştır.

Tablo 4-26: hsa-mir-424 ekspresyon seviyesi dağılım değeri

	Skewness	Kurtosis	Kolmogorov-Smirnov	Shapiro-Wilk
İstatistik değeri	-,947	3,649	,200	,066
Std hata	,314	0,618	-	-

Hem Kolmogorov-Smirnov hem de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$ olduğundan kontrol ve hasta grubu örneklerin hsa-mir-424 ekspresyon seviyesinin delta Ct değeri normal dağıldığı belirlenmiştir.

Tablo 4-27: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-424 ekspresyon dağılım grafiğı



Hasta ve kontrol grubu Ct verilerine göre iki grup arasında $2^{-0,49}$ (0,7) kat fark olduğu ve hsa-mir-424'ün hasta grubunda ekspresyon seviyesinin bu oranda arttığı belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubuna ait tüm verilere “bağımsız gruplar için t-testi” analizi yapılmış ve $p>0,05$ bulunduğu için hasta ve kontrol grubu arasında hsa-mir-424 ekspresyon seviyelerinde fark anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4-28).

Tablo 4-28: Hasta ve kontrol grubu hsa-mir-424 t-test değerleri

Grup	N	Ortalama ΔCt	Standart Sapma	t	df	p
Hasta	33	-,96	0,96	-,769	65	,446
Kontrol	34	1,45	1,45			
$\Delta\Delta Ct$			-0,49			

5. TARTIŞMA

Kanser, tüm dünyada hızla yayılan ve zamanla farklı türleri ortaya çıkan, insan ölümlerinin başlıca nedenlerinden olan global bir sorundur(131). Hastalığın bu denli öneme sahip olması, ülkemizde ve dünyada birçok bilim insanının araştırma konusu olmasına neden olmuştur. Gelişmekte olan ülkelerde kanserin diğer ülkelere göre daha hızlı ilerlemesindeki en büyük sebebin, doğal olmayan beslenme, çevresel ajanların her geçen gün artması, sentetik gıdaların tüketilmesi ve teknolojinin getirdiği fiziksel mutajenler olduğu düşünülmektedir(132). Gelişen teknoloji hastalığın ortaya çıkmasında ve yayılmasında rol alırken, hastalığın teşhis ve tedavisinde de önemli role sahiptir(133). Gelişen modern moleküler biyoloji teknikleri ve cihazları sayesinde hastalıkların moleküler yollarının yeni keşiflerinin yapılması, daha düşük belirsizlikle net bilgi edinilmesi her geçen gün giderek artan bir ivmede devam etmektedir(134,135).

Son yıllarda gelişen teknikler ile hastadan alınan likit biyopsi örneklerinde tümör belirteçlerinin varlığı belirlenmiştir. Bu belirteçlerin en büyük avantajı hastadan cerrahi operasyona gerek kalmadan alınan likit biyopsi örneğinde, tümör dokuyu temsil edebilecek genetik bilgiyi ihtiva etmesidir(136,137). Bu belirteçlerin en büyük dezavantajlarından birisi hastadan alınan likit biyopside belirteç konsantrasyonunun düşük olmasıdır. Serum veya plazmadan serbest DNA ve RNA izolasyonu’da bu esasa dayanır(138).

Genetik analizlerin temeli, Polimeraz Zincirleme Tepkimesi; DNA ve RNA örneklerinin laboratuvar ortamında hazırlanan karışım ile bir dizi ısı döngüsü sonucu çoğaltılarak analiz edilmesi esasına dayanır. Bu reaksiyonun her hangi bir inhibisyona uğramadan gerçekleşmesi izole edilen nükleik asidin konsantrasyonuna ve saflığına bağlıdır(139). Serbest DNA’ların analizlerinde de bu reaksiyonlar gerçekleştirildiğinden, analizin doğru ve güvenilir sonuç vermesi için optimum izolasyon yöntemi ile saflaştırılması gerektiği düşünülmektedir(140,141). Bu DNA’ların izolasyonu için çeşitli ticari kitler bulunmaktadır ancak laboratuvar ortamında hazırlan izolasyon yöntemleri kısıtlıdır. Ticari kitlerin maliyetlerinin yüksekliği mevcut izolasyon yöntemlerinde fenol kullanımı gibi nedenlerden dolayı bu yöntemlere alternatif yöntem geliştirilmesi bu tez projesinde ayrıca gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla ikisi ticari kit olmak üzere 9 farklı izolasyon yöntemi ile aynı plazma örneğinden ikişer tekrarlı serbest DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yöntemler arasında karşılaştırma yapmak için hem nükleer DNA'yı hedef alan primerler ve prob ile PCR gerçekleştirilmiş hem de kopya sayısı daha fazla olduğundan ölçümün daha hassas olabileceği düşünülerek mitokondriyal DNA'yı hedefleyen primerler ve prob ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde Silika jel metod-1'in ve Fenol-kloroform metod-2'nin ticari kitler ile elde edilen sonuçlar ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Geliştirilen Silika tabanlı izolasyon yönteminde Fenol-kloroform gibi toksik maddeler kullanılmaması, izolasyon yönteminin çok kısa ve maksimum verimde DNA eldesine olanak sağlaması nedeniyle, bu yöntemin birçok araştırmacı tarafından kullanılabileceği düşünülmektedir.

Silika yönteminde kaotropik ajan olarak Guanidine thiocyanate kullanılmış ve bu sayede silika parçaları pozitif yüklü hale getirilerek, negatif yüklü DNA ile köprü oluşturması sağlanmıştır. Bu sayede aradaki bağ kırılmadığı sürece çözelti içerisindeki DNA haricindeki tüm moleküller yıkanarak uzaklaştırılmış ve sonrasında aradaki bağ kırılarak saf DNA eldesi sağlanmıştır(142,143). Laboratuvar ortamında hazırlanan silika jel tabanlı izolasyon yönteminin pratik, yüksek verimde ve düşük maliyetli olması açısından diğer yöntemlere göre daha uygulanabilir olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada örnek sayısının çokluğu, ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması nedeni ile Norgen Biotek Corp. Katalog No. 55100 Cell Free DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasının ana hedefinde, karaciğerin primer malign tümörlerinden biri olan Hepatoselüler karsinoma'nın tanısında ve izlenmesinde biyo-belirteç taranması amaçlanmıştır. Hastalığın ortaya çıkmasında, en önemli etkenin Hepatit B ve Hepatit C enfeksiyonu olduğu düşünülse de yüksek miktarda aflatoksin maruziyeti ve aşırı alkol tüketimi gibi dış etmenlerin de rol aldığı bilinmektedir(144,145). Gelişimi önlene bilse de tedavisi zor olan HCC, kanser ilişkili ölümlerin başında gelmektedir. Hastalığın ortaya çıkmasında rol alan çeşitli genetik yolların rol aldığı düşünülse de moleküler patogenezi diğer birçok kanser türü gibi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Hastalığın patogenezinde rol alan bazı moleküllerin belirlenmesi için, 34 hasta ve 34 sağlıklı gönüllülerden alınan serum örneklerinde serbest DNA ve RNA analizleri yapılmıştır.

Ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunan mitokondri, hücrenin enerji metabolizması, serbest radikal üretimi, kalsiyum homeostazı ve apoptoz gibi temel

hücresel fonksiyonlarında görev alır. Kendi genomu olan mitokondriler, bir hücrede birden fazla bulunabilirler. 16,5 kb'dan oluşan çift iplikli, halkasal olan Mitokondriyal DNA, maternal kalıtım gösterir(146–148). Histonları ve intronları bulunmadığından tamir mekanizmaları zayıftır ve bu sebeple mitokondride gerçekleşen metabolik reaksiyonlar sonucu meydana gelen reaktif oksijen türlerine ve diğer genotoksik ajanlara karşı aşırı duyarlıdır. Mitokondri normal olmayan durumlarda genomlarındaki yüksek mutasyon oranlarından kaynaklı olumsuz etkileri azaltmak için DNA kopya sayısını artırır(149,150).

Literatürde oksidatif stres sonucu akciğer ve kolorektal kanseri gibi malignitelerde mtDNA kopya sayısının arttığı bildirilmiştir. Ancak mide kanseri, meme kanseri, Ewing sarkoma ve HCC gibi malignitelerde ise mtDNA kopya sayısının azaldığı bildirilmiştir. Bunun nedeninin mitokondriyal genomun replikasyonunu düzenleyen kodlanmayan D-loop bölgesinde meydana gelen nokta mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir(151,152). Ayrıca mtDNA kopya sayısında azalmanın oksidatif kapasitesini azaltacağını, nükleer DNA hasarına ve apoptoz direncine neden olabileceği bildirilmiştir. Ling Li ve arkadaşları 116 HBV ilişkili HCC hastasında mtDNA kopya sayısındaki değişimini belirleme amaçlı qPCR ile yaptıkları çalışmada, HCC hastalarında mtDNA kopya sayısının ciddi oranda azaldığını bildirmişlerdir(4).

Bu çalışmada mtDNA'nın hepatoselüler karsinoma da potansiyel biyo-belirteç olabileceği düşünülerek serum örneklerinden izole edilen total DNA örneklerinde tümör DNA'sı hedeflenmiş ve mtDNA kopya sayısındaki değişim belirlenmiştir. Bu amaçla hem sağlıklı hemde hasta gönüllülerden alınan serum örneklerinden total DNA izolasyonu yapılmış, mtDNA ile endojen gen olarak Beta aktin genine özgü primer ve probler kullanılarak hem chip tabanlı dijital PCR hem de qPCR ile reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Dijital PCR ile mtDNA'nın kopya sayısının belirlenmesi çalışmaları henüz çok kısıtlıdır. Hepatoselüler karsinomada dijital PCR ile kopya sayısının belirlenmesi ilk defa bu çalışma ile yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubu örneklerinden dijital PCR sonucu elde edilen kopya sayısı değerleri istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve normal dağılmadığı belirlenmiştir. Bu sebeple veriler “parametrik olmayan 2-bağımsız gruplar” analizi yapılarak Mann-Whitney testi değeri elde edilmiştir. Bu test sonucunda p değeri 0,05'ten küçük bulunarak hasta ve kontrol grubu arasında mtDNA kopya sayısı farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Bu verilere göre hasta grubu mtDNA kopya sayısının Beta aktin genine oranı 48,6 kopya iken, kontrol grubu mtDNA kopya sayısının Beta aktin genine oranı 136,3 kopya olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre sağlıklı gönüllülerde hastalara oranla 2,8 kat daha fazla mtDNA bulunduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bilgi literatür ile paralellik göstermektedir(4). Bu veriler ışığında ileride örnek sayısının çoğaltılarak hasta ve kontrol grubu arasındaki farkın daha düşük belirsizlikle verilmesi planlanmaktadır. mtDNA'nın kopya sayısının Beta aktin genine oranı ayrıca geleneksel yöntem olan qPCR ile yapılmış ve elde edilen Ct değerleri SPSS 22 paket programında değerlendirilmiştir. qPCR sonucunda hasta grubunda mtDNA'nın Ct değerinin, Beta aktin genine Ct değerinden farkı 3,73 iken kontrol grubunda 4,53 Ct bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu arasındaki fark değerlendirildiğinde $1,7 (2^{0,8})$ kat fark bulunmuştur. Dijital PCR ile qPCR arasındaki bu farkta en büyük etmenin, qPCR'ın belirleme limitinin dijital PCR'a göre çok daha düşük olmasıdır. Dijital PCR tek kopyayı bile belirleyebilecek yetenektedir. Bu çalışmada da referans gen olarak Beta aktin geni kullanılmış, hedef DNA molekülü de serum örneklerinden izole edilmiştir. Serbest DNA'da nükleer DNA konsantrasyonunun mtDNA'ya oranla çok daha düşük konsantrasyonda olduğu düşünüldüğünde, özellikle kopya sayısının düşük olduğu örneklerde dijital PCR'ın çok daha hassas sonuç verdiği düşünülmektedir. Bu çalışmada hem literatüre mtDNA kopya sayısının iki farklı yöntemle analizinin sonuçlarının karşılaştırılması yapılmış hem de dijital PCR ile elde edilen mtDNA kopya sayısı kesin miktar tayini yapılmıştır.

Serum örneklerinden izole edilen total RNA örneklerinde tümör RNA'sı hedeflenerek PD-L1 ekspresyon seviyesinin belirlenmesi amaçlanmış ancak RT-qPCR sonucun da elde edilen verilerin anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Bu durum RNA'nın kolay parçalanabildiği ve özellikle tümör RNA'sının kanda çok düşük seviyede dolaştığından kaynaklandığı yorumlanmıştır. Yine bu bilgi yakın zamanda yapılan araştırma ile örtüşmüştür. PD-L1 ekspresyon seviyesinin anlamlı bulunmaması nedeniyle PD-L1 gen kopya sayısının anlamlı olabileceği düşünülerek DNA hedeflenmiş ve qPCR analizi gerçekleştirilmiştir.

qPCR deney sonucunda elde edilen Ct verilerine göre hasta grubunun PD-L1/Beta aktin gen kopya sayısı oranı 2,35 iken kontrol grubunun PD-L1/Beta aktin gen kopya sayısı oranı 2,20 olarak belirlenmiştir. Hasta ve kontrol bireyler arasındaki 0,15

Ct fark literatürle paralellik göstermiş ve PD-L1/Beta aktin gen kopya sayısı oranında anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir(153).

MikroRNA'lar, hücre çekirdeğinde eksprese olduktan sonra hem çekirdek içerisinde hem de sitoplazma da çeşitli işlemlerden geçerek olgun hale gelen, kodlayıcı özelliği olmayan RNA parçacıklarıdır. Hücrede meydana gelen birçok olayda rol aldıklarından araştırmacılar tarafından, miRNA'ların çeşitli kanser türlerinde prognostik ve prediktif biyobelirteçler olabileceği düşünülerek giderek artan sayıda çalışmalar yapılmaktadır(154,155). Bu tez projesinde de hasta ve kontrollerden alınan serum örneklerinden izole edilen RNA örneklerinde ayrıca hedeflenen dört farklı miRNA'nın (hsa-mir-33a, hsa-mir-203b, hsa-mir 361-3p, hsa-mir-424) ekspresyon seviyesindeki değişimin belirlenmesi amacıyla Thermo Fisher Scientific marka Taqman prob tabanlı kitler kullanılarak RNU6b genine oranı qPCR ile belirlenmiştir.

Literatürde çeşitli kanser türlerinde biyo-belirteç olarak hsa-mir-33a'nın hedeflendiği birçok çalışma vardır(156,157). mir33a hem insanlarda hem de bazı hayvan türlerinde bulunmaktadır. İntronik bir miRNA olan miR-33a'nın ilk olarak, lipid ve kolesterol metabolizmasını düzenlediği ve sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 2 (SREBP-2) geninin sekansı içinde lokalize olduğu bildirilmiştir. Daha sonraki kanser araştırmalarında, akciğer kanserinde ekspresyon seviyesinin azaldığı, kemik metastazını inhibe ettiği, lenfoma hücre hatlarında ve kolon kanserinde onkojenik kinaz Pim-1'in ekspresyon seviyesini baskıladığı bildirilerek, tümör baskılayıcı miRNA'lar grubuna dahil edilmiştir(158). hsa-mir-33a'nın hem HCC'nin moleküler mekanizmasında rol alabileceği hem de hastalığın görülme sıklığının giderek artması, ileride moleküler düzeyde hastalığın daha da türlendirileceği düşünülerek bu tez projesinde ekspresyon seviyesi hedeflenen miRNA'lar grubuna dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubu örneklerinden alınan Ct değerleri “bağımsız gruplar için t-testi” analizi ile p değeri 0,05'ten küçük bulunarak hasta ve kontrol grubu arasında hsa-mir-33a ekspresyon seviyelerinde farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Delta-delta Ct yöntemine göre değerlendirildiğinde hasta grubunda hsa-mir-33a'nın 7,3 kat daha az eksprese olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bilgi literatür ile paralellik göstermektedir. Bu veriler ışığında ileride örnek sayısının çoğaltılarak hasta ve kontrol grubu arasındaki farkın daha düşük belirsizlikle verilmesi planlanmaktadır.

Çalışmamızda ekspresyon seviyesindeki değişimi belirlemeyi hedeflediğimiz bir diğer mikro RNA olan hsa-mir-203b, lösemi, özofagus, meme gibi çeşitli kanser türlerinde tümör baskılayıcı role sahip olduğu, bu hastalarda ekspresyon seviyesinin azaldığı bildirilmiştir(158). Boll ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada mir203'ün prostat kanserinde hücre proliferasyonunda ve invazyonunda etkin rol aldığı bildirilmiştir(159). Bu bilgilere karşın Iorio ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mir203'ün ovaryum kanserinde ekspresyonunun arttığını bildirilmiştir(160). Bu durum miRNA'ların her hastalık türünde farklı roller aldığını göstermektedir. hsa-mir-203b'nin hem HCC'nin moleküler mekanizmasında rol alabileceği hem de hastalığın görülme sıklığının giderek artması, ileride moleküler düzeyde hastalığın daha da türlendirileceği düşünülerek bu tez projesinde ekspresyon seviyesi hedeflenen miRNA'lar grubuna dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubu örneklerinden alınan Ct değerleri istatistiksel olarak değerlendirilerek normal dağılmadığı belirlenmiştir. Bu sebeple veriler Mann-Whitney testi ile analiz edilmiştir. Bu test sonucunda p değeri 0,05'ten küçük bulunarak hasta ve kontrol grubu arasında hsa-mir-203b ekspresyon seviyelerinde fark anlamlı bulunmuştur. Delta-delta Ct yöntemine göre değerlendirildiğinde hasta grubunda hsa-mir-203b'nin 4,6 kat daha az eksprese olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bilgi literatür ile paralellik göstermektedir. Bu veriler ışığında ileride örnek sayısının çoğaltılarak hasta ve kontrol grubu arasındaki farkın daha düşük belirsizlikle verilmesi planlanmaktadır.

Hepatoselüler karsinoma'nın moleküler mekanizmasında rol alacağı düşünülen bir diğer hedef miRNA olan hsa-mir-361-3p'nin çeşitli kanser türlerinde hastalığın mekanizmasında etkin rol aldığı bildirilmiştir. Wei Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada miR-361-3p'nin aşırı ekspresyonunun, NSCLC hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonu in vitro ve in vivo olarak baskıladığını bildirmişler ve mir361-3p'nin kanserin tanı ve tedavisinde etkin rol alabileceğini bildirmişlerdir(161). Literatürde ayrıca miR-361 ekspresyonunun çeşitli kanser tipinde, örneğin serviks kanserinde, skuamöz hücreli karsinomda, prostat kanserinde, kolorektal ve mide kanserinde etkin rol aldığını bildirir çalışmalar vardır(162–164). Bu çalışmalarda mir-361'in kanserin türüne göre ekspresyon seviyesinin farklı olabileceği bildirilmiştir. hsa-mir-361-3p'nin hem HCC'nin tanı ve tedavisinde rol alabileceği hem de hastalığın görülme sıklığının giderek artması, ileride moleküler düzeyde hastalığın daha da

türlendirileceği düşünülerek bu tez projesinde ekspresyon seviyesi hedeflenen miRNA'lar grubuna dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubu örneklerinden alınan Ct değerleri “bağımsız gruplar için t-testi” analizi ile p değeri 0,05’ten küçük bulunarak hasta ve kontrol grubu arasında hsa-mir-361-3p ekspresyon seviyelerinde farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Delta-delta Ct yöntemine göre değerlendirildiğinde hasta grubunda hsa-mir-361-3p’nin 5,1 kat daha az eksprese olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bilgi literatür ile paralellik göstermektedir. Bu veriler ışığında ileride örnek sayısının çoğaltılarak hasta ve kontrol grubu arasındaki farkın daha düşük belirsizlikle verilmesi planlanmaktadır.

Hasta ve kontrol grubu bireylerde ekspresyon seviyesindeki değişimin gösterilmesi hedeflenen bir diğer miRNA olan hsa-mir-424’nın, bazı kanser tiplerinde hücre proliferasyonun ve metastazını inhibe ettiği bildirilmiştir(165). Lei yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mir424’ün hepatoselüler karsinomada ekspresyon seviyesinin düştüğünü, hücre göçünü ve invazyonunu baskıladığını bildirmiştir(165). Tüm bu çalışmaların yanında mir424’ün HCC nin moleküler mekanizmasındaki etkisinin tam olarak açıklanmaması dolayısıyla, ekspresyon seviyesindeki değişimin belirlenmesi hedeflenen miRNA'lar grubuna dahil edilmiştir.

Hasta ve kontrol grubu örneklerinden alınan Ct değerleri normal dağılım gösterdiğinden “bağımsız gruplar için t-testi” analizi ile p değeri 0,05’ten küçük bulunarak hasta ve kontrol grubu arasında hsa-mir-424 ekspresyon seviyelerinde farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Delta-delta Ct yöntemine göre değerlendirildiğinde hasta grubunda hsa- hsa-mir-424’ün arasında -0,49 Ct fark bulunmuştur. Bu değer polimeraz zincirleme tepkimesinin belirsizlik değerinin yüksek olması ve pipetten gelen belirsizlikler göz önüne alındığında anlamlı olarak kabul edilmemiştir. Ancak elde edilen bu veriler ışığında ileride örnek sayısının çoğaltılarak hasta ve kontrol grubu arasındaki farkın daha düşük belirsizlikle hesaplanmasının, mir424’ün HCC’deki rolünü daha net ortaya koyacaktır.

Gelişen moleküler biyoloji teknikleri, miRNA’ların vektör kullanılarak hücre içerisine aktarılmasına veya kimyasal ajanlar kullanılarak indüklenebilmesine olanak sağlamaktadır. Birçok kanserin moleküler mekanizmasında rol alan bu küçük moleküllerin mekanizmalarının aydınlatılması ile birlikte hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceğini göstermektedir.

miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, hastada yapılan patolojik ve klinik analizlerden alınan sonuçlar ile örtüşmesi bu moleküllerin hastalığın tanısında belirteç olabileceğini göstermektedir. Bu moleküllerin analizlerinin günden güne artması, hastalığıdaki moleküler rolünü tam olarak ortaya koyacaktır. Özellikle tümör baskılayıcı mikroRNA'ların, moleküler rollerinin tam olarak aydınlatılması ile birlikte yakın zamanda hastalığın tanısında, evrelendirilmesinde klinisyenler tarafından kullanılacağı düşünülmektedir. Bu tez projesinde de hepatoselüler karsinoma hastalığında rol aldığı düşünülen dört farklı miRNA'nın ekspresyon seviyesi belirlenmiş ve hastalığın ortaya çıkmasında ve gelişmesinde, hsa-mir-33a, hsa-mir-203b, hsa-mir-361-3p ekspresyon seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin hepatoselüler karsinoma'nın moleküler mekanizmasının ortaya çıkarılmasında araştırmacılara yardımcı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. TÜİK. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2016. Türkiye İstatistik Kurumu. 2017;2015–6.
2. Biemar F, Foti M. Global progress against cancer-challenges and opportunities. *Cancer Biol Med* [Internet]. 2013;10:183–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3860343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Jonathan M Schwartz, Robert L Carithers J. Epidemiology and etiologic associations of hepatocellular carcinoma [Internet]. *www.uptodate.com*. 2018. Available from: [https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-etiological-associations-of-hepatocellular-carcinoma?search=hepatocellular carcinoma&source=search_result&selectedTitle=3~150&usage_type=default&display_rank=3](https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-etiological-associations-of-hepatocellular-carcinoma?search=hepatocellular%20carcinoma&source=search_result&selectedTitle=3~150&usage_type=default&display_rank=3)
4. Li L, Hann H-W, Wan S, Hann RS, Wang C, Lai Y, et al. Cell-free circulating mitochondrial DNA content and risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic HBV infection. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6:23992. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep23992>
5. Taanman J-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. Elsevier; 1999 [cited 2018 May 2];1410:103–23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272898001613>
6. BAI R-K, PERNG C-L, HSU C-H, WONG L-JC. Quantitative PCR Analysis of Mitochondrial DNA Content in Patients with Mitochondrial Disease. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2004;1011:304–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1293.029>
7. Lee J-W, Park KD, Im J-A, Kim MY, Lee D-C. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood is associated with cognitive function in apparently healthy elderly women. *Clin Chim Acta* [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2018 May 2];411:592–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898110000562>
8. Bonner MR, Shen M, Liu C-S, DiVita M, He X, Lan Q. Mitochondrial DNA content and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer* [Internet]. Elsevier; 2009 [cited 2018 May 2];63:331–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169500208003565>
9. Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: Key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*. 2008;27:5959–74.
10. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. England; 2006;6:857–66.
11. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. England; 2006;6:259–69.
12. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. United States; 2005. page 15–20.
13. Straub M, Drecoll E, Pfarr N, Weichert W, Langer R, Hapfelmeier A, et al. CD274/PD-L1 gene amplification and PD-L1 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncotarget*. United States;

- 2016;7:12024–34.
14. Zhang J, Gao J, Li Y, Nie J, Dai L, Hu W, et al. Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thorac. Cancer*. Chichester, UK; 2015. page 534–8.
 15. Phillips KA, Ann Sakowski J, Trosman J, Douglas MP, Liang S-Y, Neumann P. The economic value of personalized medicine tests: what we know and what we need to know. *Genet Med*. United States; 2014;16:251–7.
 16. Lanzarini C. Human liver and microRNA profiling: effects of donor and recipient age-mismatch in transplant. *Università degli Studi di Palermo*; 2012.
 17. Couinaud C. *Le foie; etudes anatomiques et chirurgicales*. Paris: Masson; 1957.
 18. Hikspoors JPJM, Peeters MMJP, Kruepunga N, Hayelom K, Mommen GMC, Lamers WH. Human liver segments: role of cryptic liver lobes and vascular physiology in the development of liver veins and left-right asymmetry. 2017;1–12.
 19. Gotra A, Sivakumaran L, Chartrand G, Vu K-N, Vandenbroucke-Menu F, Kauffmann C, et al. Liver segmentation: indications, techniques and future directions. *Insights Imaging*. Springer Berlin Heidelberg; 2017;8:377–92.
 20. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*. 2014;4:177–97.
 21. Yuksel N. Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşimleri. *Klin Psikiyatr*. 2001;1:5–16.
 22. Dixon J, Lane K, Macphee I, Philips B. Xenobiotic metabolism: the effect of acute kidney injury on non-renal drug clearance and hepatic drug metabolism. *Int J Mol Sci. Molecular Diversity Preservation International (MDPI)*; 2014;15:2538–53.
 23. Ozougwu JC. Physiology of the liver. *Int J Res Pharm Biosci*. 2017;4:13–24.
 24. Lee WS, Sokol RJ. Liver disease in mitochondrial disorders. *Semin Liver Dis*. 2007;27:259–73.
 25. Veltri KL, Espiritu M, Singh G. Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *J Cell Physiol*. 143:160–4.
 26. Kapan M. Karaci □ erin Primer Habis Tümörleri. 2002;159–82.
 27. Astarıcı HM, Özyalvaçlı G, Sertçelik A. The diagnostic value of pCEA, mCEA, AFP and CK19 in differentiating primary and metastatic carcinoma of liver. *Abant Med J [Internet]*. 2016;5:39–46. Available from: http://www.journalagent.com/z4/download_fulltext.asp?pdire=abantmedj&plng=eng&un=ABANT-94557
 28. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2.
 29. Fu X, Zhu Y, Zheng B, Zou Y, Wang C, Wu P, et al. KIFC1 , a novel potential prognostic factor and therapeutic target in hepatocellular carcinoma. 2018;1912–22.
 30. Balogh J, Victor D, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, et al. Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma [Internet]*. 2016;Volume 3:41–53. Available from: <https://www.dovepress.com/hepatocellular-carcinoma-a-review-peer-reviewed-article-JHC>
 31. Bilgen A. Hepatoselüler Kanserli Hastalarda Vitamin D Düzeyinin Sağkalıma Etkisi. *T.C. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi*; 2016.
 32. Seydel GŞ. Hepatosellüler Karsinomaya Neden Olan Genlerin Gen Ekspresyonunun Kantitatif Ölçümü. *T.C. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri*

- Enstitüsü; 2011.
33. Kaya B. Hepatosellüler Karsinomlu Hastalarda mi-RNA'nın Önemi. T.C.Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2016.
 34. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol.* 2006;45:529–38.
 35. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2008;14:4300–8.
 36. António M, Gonçalves D. Hepatocellular carcinoma : epidemiology , biology , diagnosis , and therapies q. 2013;59:514–24.
 37. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of HCC: Consider the Population. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47:1–10.
 38. Oyagbemi AA, Azeez OI, Saba AB. Hepatocellular carcinoma and the underlying mechanisms. *Afr Health Sci [Internet].* 2010;10:93–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2895801&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 39. Kew MC. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer.* 2014;3:31–40.
 40. Davis GL, Dempster J, Meler JD, Orr DW, Walberg MW, Brown B, et al. Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem. *Proc (Bayl Univ Med Cent) [Internet].* 2008;21:266–80. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2446418&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 41. Uzunalioglu Z, Lin S. Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma in Turkey. 2001;46:1022–8.
 42. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J Clin Exp Investig [Internet].* 2015;6:331–6. Available from: <http://dergipark.gov.tr/doi/10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545>
 43. Martens NH. Şikonin Maddesinin Hepatosellüler Karsinoma Hücrelerinin Kök Hücre Ve Emt Özelliklerine Etkisi. T.C. Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2018.
 44. Herbst DA, Reddy KR. Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma. 2012;1:180–2.
 45. Chen SL, Morgan TR. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci [Internet].* Sydney: Ivyspring International Publisher; 2006;3:47–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1415841/>
 46. Keyvani H, Fazlalipour M, Monavari SHR, Mollaie HR. Hepatitis C virus--proteins, diagnosis, treatment and new approaches for vaccine development. *Asian Pac J Cancer Prev. Thailand;* 2012;13:5931–49.
 47. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol [Internet].* Baishideng Publishing Group Inc; 2016;22:7824–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5016383/>
 48. Tozun N, Ozdogan O, Cakaloglu Y, Idilman R, Karasu Z, Akarca U, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections and risk factors in Turkey: a fieldwork TURHEP study. *Clin Microbiol Infect. England;* 2015;21:1020–6.

49. Elberry MH, Darwish NHE, Mousa SA. Hepatitis C virus management: potential impact of nanotechnology. *Virol J.* 2017;14:88.
50. Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. New Insights into the Epigenetics of Hepatocellular Carcinoma. 2017;2017.
51. Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ. Epigenetic regulation and cancer (review). *Oncol Rep.* 2014;31:523–32.
52. Deng Y, Nagae G, Midorikawa Y, Yagi K, Tsutsumi S, Yamamoto S, et al. Identification of genes preferentially methylated in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. 2010;101:1501–10.
53. Fang T, Sun X, Chen J, Zhao Y, Sun R, Ren N, et al. Long Non-coding RNAs are Differentially Expressed in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines with Differing Metastatic Potential. 2014;15:10513–24.
54. Mehra M, Chauhan R. Long Noncoding RNAs as a Key Player in Hepatocellular Carcinoma. 2017;
55. Peeva VM. Rearranged DNA in mitochondrial DNA maintenance disorders. 2014;
56. Henze K, Martin W. Essence of mitochondria. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2003;426:127. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/426127a>
57. Koç F, Sarıca Y. Mitokondri ; Biyokimyası. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Derg. 2003;12:1–13.
58. Nelson 1942- DL (David L. Lehninger principles of biochemistry [Internet]. Fourth edition. New York : W.H. Freeman, 2005.; 2005. Available from: <https://search.library.wisc.edu/catalog/999964334502121>
59. Baron M. Copy number variations of the mitochondrial DNA as potential cause of mitochondrial diseases. 2010;
60. Duchon RM. Topical Review Mitochondria and calcium : from cell signalling to cell death. *J Physiol.* 2000;57–88.
61. Elçin YM. Lehninger – Biyokimyanın İlkeleri – Beşinci Baskıdan Çeviri. 5. Baskıda. Elçin YM, editor. Ankara: PalmeYayıncılık; 2013.
62. Jemt E, Shi Y, Mehmedovic M, Uhler JP, Freyer C, Gustafsson CM, et al. Regulation of DNA replication at the end of the mitochondrial D-loop involves the helicase TWINKLE. 2015;43:9262–75.
63. Lee SR, Han J. Review Article Mitochondrial Nucleoid : Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Hindawi*; 2017;2017.
64. Smeitink J, Heuvel L Van Den, Dimauro S. THE GENETICS AND PATHOLOGY OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION. 2001;2:342–52.
65. Barthe C, Fardeau M, Lombe A. Late-Onset Mitochondrial DNA Depletion : DNA Copy Number , Multiple Deletions , and Compensation. 2001;607–17.
66. Yin PH, Wu CC, Lin JC, Chi CW, Wei YH, Lee HC. Somatic mutations of mitochondrial genome in hepatocellular carcinoma. *Mitochondrion* [Internet]. Mitochondria Research Society; 2010;10:174–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2009.12.147>
67. Zhang Y, Qu Y, Gao K, Yang Q, Shi B, Hou P, et al. High copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts good prognosis in glioma patients. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2015;5:1207–16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4449448&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
68. Lee HC, Li SH, Lin JC, Wu CC, Yeh DC, Wei YH. Somatic mutations in the D-

- loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2004;547:71–8.
69. Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Lui WY, et al. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2004;90:2390–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/6601838>
 70. Yamada S, Nomoto S, Fujii T, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, et al. Correlation between copy number of mitochondrial DNA and clinico-pathologic parameters of hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2006;32:303–7.
 71. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–85:843–54.
 72. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* [Internet]. 2009;7:147–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672022908600443>
 73. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. 2009;92–105.
 74. Kurar E. MikroRNA Biyogenezi. 2015;10:211–8.
 75. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. 2008;26:462–9.
 76. Çınar İ, Dursun HG. miRNA Biyogenezi ve Kanser Patogenezindeki Fonksiyonu miRNA Biogenesis and Functions on Cancer Pathogenesis. 2016; Available from: <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/227804>
 77. Vazİrİ PA. Ökaryot Hücrelerde Korunmuş Mikro RNA ' lar ve Hedef Transkripsyonları n Faliyetleri Scoping the Conserved micro-RNAs and Their Target Transcripts in Eukaryotes Cells. 2012;5:96–8.
 78. Güzel E. Prostat kanserli hastaların prostat sekresyon sıvılarından mirna eldesi ve mikroarray yöntemi ile miRNA ekspresyon profillerinin karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi; 2013.
 79. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2015;15:321–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859809/>
 80. Güzel E. Ewing Sarkoma'da Yeni Metastaz Biyomarkırları'nın Tespit Edilmesi. İstanbul Üniversitesi; 2017.
 81. Bienertova-Vasku J, Sana J, Slaby O. The role of microRNAs in mitochondria in cancer. *Cancer Lett. Ireland*; 2013;336:1–7.
 82. Goud MR, Hua ZA. Role of microRNA in the regulation of mitochondrial functions. 2015;3:83–8.
 83. Dasgupta N, Peng Y, Tan Z, Ciruolo G, Wang D, Li R. miRNAs in mtDNA-less cell mitochondria. 2015. page 15004-.
 84. Wang X, Song C, Zhou X, Han X, Li J, Wang Z, et al. Mitochondria Associated MicroRNA Expression Profiling of Heart Failure. *Biomed Res. Int*. 2017.
 85. Barrey E, Saint-Auret G, Bonnamy B, Damas D, Boyer O, Gidrol X. Pre-microRNA and Mature microRNA in Human Mitochondria. Klymkowsky M, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2011 [cited 2018 Sep 17];6:e20220. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020220>
 86. Burchard J, Zhang C, Liu AM, Poon RTP, Lee NPY, Wong K-F, et al.

- microRNA-122 as a regulator of mitochondrial metabolic gene network in hepatocellular carcinoma. *Mol Syst Biol*. England; 2010;6:402.
87. Vohwinkel CU, Lecuona E, Sun H, Sommer N, Vadász I, Chandel NS, et al. Elevated CO₂ levels cause mitochondrial dysfunction and impair cell proliferation. *J Biol Chem*. 2011;286:37067–76.
 88. Aoi W, Naito Y, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Ichikawa H, et al. The microRNA miR-696 regulates PGC-1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. United States; 2010;298:E799-806.
 89. Li P, Jiao J, Gao G, Prabhakar BS. Control of mitochondrial activity by miRNAs. *J Cell Biochem* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2011;113:1104–10. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcb.24004>
 90. Yamamoto H, Morino K, Nishio Y, Ugi S, Yoshizaki T, Kashiwagi A, et al. MicroRNA-494 regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through mitochondrial transcription factor A and Forkhead box j3. *AJP Endocrinol Metab* [Internet]. 2012;303:E1419–27. Available from: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.00097.2012>
 91. Tian J, Hu X, Gao W, Zhang J, Chen M, Zhang X, et al. Identification a novel tumor-suppressive hsa-miR-599 regulates cells proliferation, migration and invasion by targeting oncogenic MYC in hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res*. 2016;8:2575–84.
 92. Amr KS, Elmawgoud Atia HA, Elazeem Elbnhawy RA, Ezzat WM. Early diagnostic evaluation of miR-122 and miR-224 as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Genes Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;4:215–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.10.003>
 93. Jiang L, Cheng Q, Zhang BH, Zhang MZ. Circulating micrnas as biomarkers in hepatocellular carcinoma screening a validation set from China. *Med (United States)*. 2015;94:1–10.
 94. Shen S, Lin Y, Yuan X, Shen L, Chen J, Chen L, et al. Biomarker MicroRNAs for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Functional Survey and Comparison. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6:1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep38311>
 95. Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, Ulger M, Serin MS, Sezgin O, et al. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2014;41:4513–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3322-3>
 96. Yunqiao L, Vanke H, Jun X, Tangmeng G. MicroRNA-206, down-regulated in hepatocellular carcinoma, suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Hepatogastroenterology*. Greece; 2014;61:1302–7.
 97. El-Garem H, Ammer A, Shehab H, Shaker O, Anwer M, El-Akel W, et al. Circulating microRNA, miR-122 and miR-221 signature in Egyptian patients with chronic hepatitis C related hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* [Internet]. Baishideng Publishing Group Inc; 2014;6:818–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4243156/>
 98. El-Abd NE, Fawzy NA, El-Sheikh SM, Soliman ME. Circulating miRNA-122, miRNA-199a, and miRNA-16 as Biomarkers for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Mol Diagn Ther*. New Zealand; 2015;19:213–20.
 99. Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Blelloch RH, et al. MicroRNAs

- Control Hepatocyte Proliferation During Liver Regeneration. *Hepatology* [Internet]. 2010;51:1735–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3108060/>
100. MANDEL P, METAIS P. [Not Available]. *C R Seances Soc Biol Fil. France*; 1948;142:241–3.
 101. Tan EM, Carr RI, Kunkel HG, Tan EM, Schur PH, Carr RI, et al. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus . Find the latest version : Deoxyribonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus. 1966;45:1732–40.
 102. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res. United States*; 1977;37:646–50.
 103. Pehlivan S, Avcı S, Sever T, Bayram A, Balcı Oğuzkan S. Dolaşımdaki Serbest DNA ve Önemi. *Gaziantep Tıp Derg.* 2010;16:75–80.
 104. Tamkovich SN, Anna V. Circulating DNA and DNase Activity in Human Blood. 2006;196:191–6.
 105. Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer : diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. 2014;
 106. Rossi G, Mu Z, Rademaker AW, Austin LK, Strickland KS, Lima R, et al. Cell-Free DNA and Circulating Tumor Cells : Comprehensive Liquid Biopsy Analysis in Advanced Breast Cancer. 2018;24:560–9.
 107. Yan L, Chen Y, Zhou J, Zhao H, Zhang H. International Journal of Infectious Diseases Diagnostic value of circulating cell-free DNA levels for hepatocellular carcinoma. *Int J Infect Dis* [Internet]. International Society for Infectious Diseases; 2018;67:92–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.12.002>
 108. Bai J, Gao Z, Li X, Dong L, Han W, Nie J. Regulation of PD-1 / PD-L1 pathway and resistance to PD-1 / PD- L1 blockade. 2017;8:110693–707.
 109. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy : Mechanism , Combinations , and Clinical Outcome. 2017;8:1–15.
 110. Dosset M, Vargas TR, Lagrange A, Boidot R, Végran F, Roussey A, et al. PD-1 / PD-L1 pathway : an adaptive immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapy in colorectal cancer. *Oncoimmunology* [Internet]. Taylor & Francis; 2018;7:1–14. Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1433981>
 111. Huang C, Wang Y, Luo G, Han F. Relationship Between PD-L1 Expression and CD8 + T-cell Immune Responses in Hepatocellular Carcinoma. 2017;40:323–33.
 112. Myakishevi VM. No Title [Internet]. www.protocol-online.org. 1995 [cited 2018 Sep 11]. page 1. Available from: http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?ID=1161
 113. Mohammadi N, Kazemi B, Roozkhosh G, Masoomi K, Taghi M. Original Article A Simple , Inexpensive and Safe Method for DNA Extraction of Frigid and Clotted Blood Samples. 2015;119–23.
 114. Clemens H, Markus S, Roland G, Richard G. A modified Phenol-chloroform of tumor patients co m e r c i a l u s e m o n l o n e r a l. 2013;4:1–3.
 115. Bartlett JMS, Stirling D, Carroll P, Casimir D, Pearson H, Stirling D, et al. *PCR Protocols*. Second Edi. Humana Press; 2003.

116. Ishizawa M, Kobayashi Y, Miyamura T, Matsuura S. Simple procedure of DNA isolation from human serum. 1991;19:5792.
117. Yuan H, Zhu Z-Z, Lu Y, Liu F, Zhang W, Huang G, et al. A Modified Extraction Method of Circulating Free DNA for Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Analysis. *Yonsei Med J* [Internet]. 2012;53:132. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3349/ymj.2012.53.1.132>
118. Yalçinkaya B, Yumbul E, Mozioglu E, Akgoz M. Comparison of DNA extraction methods for meat analysis. *Food Chem* [Internet]. 2017;221:1253–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616318556>
119. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J Vis Exp* [Internet]. MyJove Corporation; 2010;2565. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3346308/>
120. Idris B, Goodwin W. Comparison of Chelex 1 -100 with two solid phase DNA extraction techniques. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2015;5:e274–5. Available from: [https://www.fsigeneticssup.com/article/S1875-1768\(15\)30175-X/pdf](https://www.fsigeneticssup.com/article/S1875-1768(15)30175-X/pdf)
121. Holzgrabe U, Diehl BW, Wawer I. NMR spectroscopy in pharmacy. *J Pharm Biomed Anal. England*; 1998;17:557–616.
122. Liu Y, Liu Z, Yang H, He L. Direct Comparison of (19)F qNMR and (1)H qNMR by Characterizing Atorvastatin Calcium Content. *J Anal Methods Chem* [Internet]. 2016/09/01. Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016:7627823. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27688925>
123. Wang C, Hao J, Zhang F, Su K, Wang D-A. RNA extraction from polysaccharide-based cell-laden hydrogel scaffolds. *Anal Biochem* [Internet]. Academic Press; 2008 [cited 2018 Sep 18];380:333–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269708003801>
124. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8(+) T Cells. *Sci Transl Med* [Internet]. 2013;5:200ra116-200ra116. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4136707/>
125. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods. United States*; 2001;25:402–8.
126. Zsurka G, Baron M, Stewart JD, Kornblum C, Bös M, Sassen R, et al. Clonally expanded mitochondrial DNA mutations in epileptic individuals with mutated DNA polymerase γ . *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67:857–66.
127. Kornblum C, Nicholls TJ, Haack TB, Schöler S, Peeva V, Danhauser K, et al. Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nat Genet*. 2013;45:214–9.
128. Yap BW, Sim CH. Comparisons of various types of normality tests. *J Stat Comput Simul*. Taylor & Francis; 2011;81:2141–55.
129. Thode H. Testing For Normality. Boca Rat. CRC Press. 2002.
130. Ghasemi A, Zahediasl S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *Int J Endocrinol Metab*. 2012/04/20. Kowsar; 2012;10:486–9.
131. Nagai H, Kim YH. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *J Thorac Dis* [Internet]. AME Publishing Company; 2017;9:448–51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28449441>

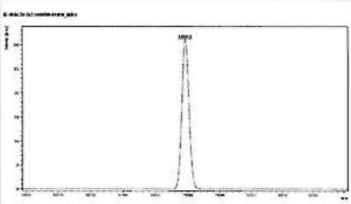
132. Yagi T. A perspective of Genes and Environment for the development of environmental mutagen research in Asia. *Genes Environ Off J Japanese Environ Mutagen Soc* [Internet]. BioMed Central; 2017;39:23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29021869>
133. Christaki E. New technologies in predicting, preventing and controlling emerging infectious diseases. *Virulence* [Internet]. Taylor & Francis; 2015;6:558–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068569>
134. Beilby J. Diagnostic molecular biology. *Clin Biochem Rev* [Internet]. The Australian Association of Clinical Biochemists; 2006;27:3–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886042>
135. Jones GM, Busby E, Garson JA, Grant PR, Nastouli E, Devonshire AS, et al. Digital PCR dynamic range is approaching that of real-time quantitative PCR. *Biomol Detect Quantif* [Internet]. 2016;10:31–3. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214753516300316>
136. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* [Internet]. Impact Journals LLC; 2016;7:48832–41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27223063>
137. Neumann MHD, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy – Current Status and Where We Need to Progress. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2018;16:190–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2001037018300060>
138. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2016;14:898 LP-908. Available from: <http://mcr.aacrjournals.org/content/14/10/898.abstract>
139. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* [Internet]. MyJove Corporation; 2012;e3998–e3998. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664923>
140. Fawzy A, Sweify KM, El-Fayoumy HM, Nofal N. Quantitative analysis of plasma cell-free DNA and its DNA integrity in patients with metastatic prostate cancer using ALU sequence. *J Egypt Natl Canc Inst* [Internet]. 2016;28:235–42. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110036216300541>
141. Kumar M, Choudhury Y, Ghosh SK, Mondal R. Application and optimization of minimally invasive cell-free DNA techniques in oncogenomics. *Tumour Biol. United States*; 2018;40:1010428318760342.
142. Tagliavia M, Nicosia A, Gianguzza F. Complete decontamination and regeneration of DNA purification silica columns. *Anal Biochem. United States*; 2009;385:182–3.
143. Mason PE, Neilson GW, Dempsey CE, Barnes AC, Cruickshank JM. The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2003;100:4557 LP-4561. Available from: <http://www.pnas.org/content/100/8/4557.abstract>
144. Kirk GD, Turner PC, Gong Y, Lesi OA, Mendy M, Goedert JJ, et al. Hepatocellular carcinoma and polymorphisms in carcinogen-metabolizing and DNA repair enzymes in a population with aflatoxin exposure and hepatitis B virus endemicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. United States*; 2005;14:373–9.

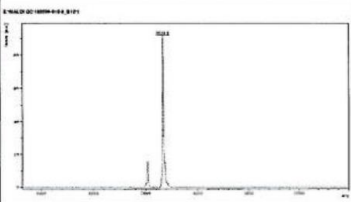
145. Palliyaguru DL, Wu F. Global geographical overlap of aflatoxin and hepatitis C: controlling risk factors for liver cancer worldwide. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. England; 2013;30:534–40.
146. Waterhouse NJ. The cellular energy crisis: mitochondria and cell death. *Med Sci Sports Exerc*. United States; 2003;35:105–10.
147. Medeiros TC, Thomas RL, Ghillebert R, Graef M. Autophagy balances mtDNA synthesis and degradation by DNA polymerase POLG during starvation. *J Cell Biol*. United States; 2018;217:1601–11.
148. Allen J, Romay-Tallon R, Brymer KJ, Caruncho HJ, Kalynchuk LE. Mitochondria and Mood: Mitochondrial Dysfunction as a Key Player in the Manifestation of Depression. *Front Neurosci* [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2018;12:386. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29928190>
149. Stumpf JD, Copeland WC. Mitochondrial DNA replication and disease: insights from DNA polymerase γ mutations. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2010/10/08. 2011;68:219–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20927567>
150. Marin-Garcia J. Mitochondrial DNA repair: a novel therapeutic target for heart failure. *Heart Fail Rev*. United States; 2016;21:475–87.
151. Hu L, Yao X, Shen Y. Altered mitochondrial DNA copy number contributes to human cancer risk: evidence from an updated meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6:35859. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27775013>
152. Lindqvist D, Wolkowitz O, Picard M, Ohlsson L, Bersani FS, Fernström J, et al. Circulating Cell-Free Mitochondrial DNA-a Novel Marker of Mitochondrial Stress Associated With Suicidality and Major Depressive Disorder. *Biol Psychiatry* [Internet]. Elsevier; 2018;83:S25–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.02.079>
153. Ishiba T, Hoffmann A-C, Usher J, Elshimali Y, Sturdevant T, Dang M, et al. Frequencies and expression levels of programmed death ligand 1 (PD-L1) in circulating tumor RNA (ctRNA) in various cancer types. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Academic Press; 2018 [cited 2018 Oct 11];500:621–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X18308994?via%3Dihub>
154. Mahdiannasser M, Karami Z. An innovative paradigm of methods in microRNAs detection: highlighting DNazymes, the illuminators. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2018;107:123–44. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656631830109X>
155. Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015/03/22. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015:125094. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874201>
156. Kim SH, Kim GJ, Umemura T, Lee SG, Cho KJ. Aberrant expression of plasma microRNA-33a in an atherosclerosis-risk group. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2016/09/23. Springer Netherlands; 2017;44:79–88. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27664032>
157. Lopez-Santillan M, Larrabeiti-Etxebarria A, Arzuaga-Mendez J, Lopez-Lopez E, Garcia-Orad A. Circulating miRNAs as biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review. *Oncotarget* [Internet]. Impact Journals LLC;

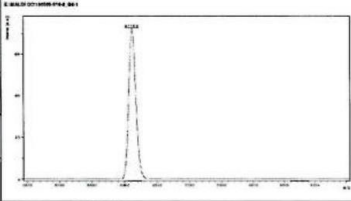
- 2018;9:22850–61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29854319>
158. Xie RT, Cong XL, Zhong XM, Luo P, Yang HQ, Lu GX, et al. MicroRNA-33a downregulation is associated with tumorigenesis and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2018;15:4571–7.
 159. Boll K, Reiche K, Kasack K, Morbt N, Kretzschmar AK, Tamm JM, et al. MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma. *Oncogene*. England; 2013;32:277–85.
 160. Iorio M V, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*. United States; 2007;67:8699–707.
 161. Chen W, Wang J, Liu S, Wang S, Cheng Y, Zhou W, et al. MicroRNA-361-3p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting SH2B1 in NSCLC. *J Exp Clin Cancer Res [Internet]*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research; 2016;35:1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-016-0357-4>
 162. Dal Monte M, Landi D, Martini D, Bagnoli P. Antiangiogenic role of miR-361 in human umbilical vein endothelial cells: functional interaction with the peptide somatostatin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. Germany; 2013;386:15–27.
 163. Liu D, Tao T, Xu B, Chen S, Liu C, Zhang L, et al. MiR-361-5p acts as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting signal transducer and activator of transcription-6(STAT6). *Biochem Biophys Res Commun*. United States; 2014;445:151–6.
 164. Ma F, Song H, Guo B, Zhang Y, Zheng Y, Lin C, et al. MiR-361-5p inhibits colorectal and gastric cancer growth and metastasis by targeting staphylococcal nuclease domain containing-1. *Oncotarget*. United States; 2015;6:17404–16.
 165. Yang H, Zheng W, Shuai X, Chang R-M, Yu L, Fang F, et al. MicroRNA-424 inhibits Akt3/E2F3 axis and tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget [Internet]*. 2015;6:27736–50. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/4811>

HAM VERİLER

5.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Primer ve Prob Bilgileri

Oligo	BA341F_341 - 363_forward						
SEQ	5' - GGC ACC ACA CCT TCT ACA ATG AG - 3' (23mer)						
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)	
	calculated	measured	OD	nmol			
52.17	6977.6	6962.5	4.3	17.0	0.2	64.7	
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification			
170.0		HPLC					

Oligo	BA392TM_392 - 411_Probe						
SEQ	5' - TGC TGC TGA CCG AGG CCC CC - 3' (20mer)						
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)	
	calculated	measured	OD	nmol			
75.0	7337.6	7329.5	4.0	20.0	0.2	68.7	
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification			
200.0		HPLC		5' HEX - 3' BHQ1			

Oligo	BA444R_444 - 425_reverse						
SEQ	5' - GGT CAT CTT CTC GCG GTT GG - 3' (20mer)						
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)	
	calculated	measured	OD	nmol			
60.0	6131.0	6118.3	3.4	17.0	0.2	62.5	
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification			
170.0		HPLC					

5.2. PD-L1 Primer ve Prob Sekans Bilgileri

>NM_014143.3 Homo sapiens CD274 molecule (CD274), transcript variant 1, mRNA

GGCGCAACGCTGAGCAGCTGGCGCGTCCCGCGCGGCCCCAGTTCTGCGCAGCTTCCCGAGGC
TCCGCACCAGCCGCGCTTCTGTCCGCCTGCAGGGCATTCCAGAAAGATGAGGATATTTGCTG
TCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTGCTGAACGCATTTACTGTCACGGTTCCCAAGGACC
TATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATGCAAATTTCCAGTAGAAAAACA
ATTAGACCTGGCTGCTACTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATTCAATTTG
TGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTTCAAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGGCTGTT
GAAGGACCAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGAT
GCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGGTGGTGCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAA
AGTCAATGCCCCATACAACAAAATCAACCAAAGAATTTTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTG
AACATGAACTGACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGGACAAGCAG
TGACCATCAAGTCCTGAGTGGTAAGACCACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAAGCTT
TTCAATGTGACCAGCACACTGAGAATCAACACAACAACTAATGAGATTTTCTACTGCACTTT
TAGGAGATTAGATCCTGAGGAAAACCATACAGCTGAATTGGTTCATCCCAGAACTACCCTGG
CACATCCTCCAAATGAAAGGACTCACTTGGTAATTCTGGGAGCCATCTTATTATGCCTTGGT
GTAGCACTGACATTCATCTTCCGTTTAAAGAAAAGGGAGAATGATGGATGTGAAAAAATGTG
GCATCCAAGATACAACTCAAAGAAGCAAAGTGATACACATTTGGAGGAGACGTAATCCAG
CATTGGAACCTTCTGATCTTCAAGCAGGGATTCTCAACCTGTGGTTTAGGGGTTTCATCGGGGC
TGAGCGTGACAAGAGGAAGGAATGGGCCCCGTGGGATGCAGGCAATGTGGGACTTAAAGG
CCCAAGCACTGAAAATGGAACCTGGCGAAAGCAGAGGAGGAGAATGAAGAAAGATGGAGT
CAAACAGGGAGCCTGGAGGGAGACCTTGATACTTTCAAATGCCTGAGGGGCTCATCGAGCG
CTGTGACAGGGAGAAAGGATACCTTGAACAAGGAGCCTCCAAGCAAATCATCCATTGCTC
ATCCTAGGAAGACGGGTTGAGAATCCCTAATTTGAGGGTCAGTTCCTGCAGAAGTGCCCTTT
GCCTCCACTCAATGCCTCAATTTGTTTTCTGCATGACTGAGAGTCTCAGTGTTGGAACGGGAC
AGTATTTATGTATGAGTTTTTCTATTTATTTTGAAGTCTGTGAGGTCTTCTTGTGATGTGAGTG
TGGTTGTGAATGATTTCTTTTGAAGATATATTGTAGTAGATGTTACAATTTTGTGCCAAACT
AACTTGCTGCTTAATGATTTGCTCACATCTAGTAAAACATGGAGTATTTGTAAGGTGCTTG
GTCTCCTCTATAACTACAAGTATACATTGGAAGCATAAAGATCAAACCGTTGGTTGCATAGG
ATGTCACCTTTATTTAACCCTTAATACTCTGGTTGACCTAATCTTATTCTCAGACCTCAAGT
GTCTGTGCAGTATCTGTTCCATTTAAATATCAGCTTTACAATTATGTGGTAGCCTACACACAT
AATCTCATTTCATCGCTGTAACCACCCTGTTGTGATAACCCTATTATTTTACCCTATCGTACA
GCTGAGGAAGCAAACAGATTAAGTAACCTTGCCCAACCAGTAAATAGCAGACCTCAGACTG
CCACCCACTGTCCTTTTATAATACAATTTACAGCTATATTTTACTTTAAGCAATTCCTTTTATTC
AAAAACCATTTATTAAGTGCCCTTGCAATATCAATCGCTGTGCCAGGCATTGAATCTACAGA
TGTGAGCAAGACAAAGTACCTGTCCTCAAGGAGCTCATAGTATAATGAGGAGATTAACAAG
AAAATGTATTATTACAATTTAGTCCAGTGTCATAGCATAAGGATGATGCGAGGGGAAAAACCC
GAGCAGTGTTGCCAAGAGGAGGAAATAGGCCAATGTGGTCTGGGACGGTTGGATATACTTA
AACATCTTAATAATCAGAGTAATTTTCATTTACAAAGAGAGGTGCGTACTTAAAATAACCCCT
GAAAAATAACACTGGAATTCCTTTTCTAGCATTATATTTATTCCTGATTTGCCTTTGCCATAT
AATCTAATGCTTGTTTATATAGTGTCTGGTATTGTTTAAACAGTTCTGTCTTTTCTATTTAAATG
CCACTAAATTTTAAATTCATACCTTTCCATGATTCAAATTCAAAAGATCCCATGGGAGATG
GTTGGAATCTCCACTTCATCCTCCAAGCCATTCAAGTTTCCCTTCCAGAAGCAACTGCTAC
TGCCTTTCATTCATATGTTCTTCTAAAGATAGTCTACATTTGGAAATGTATGTTAAAGACACG
TATTTTAAATTTTCTTAAATAGTAACACATTTGTATGTCTGCTGTGCTACTTTGCTATTTT
TATTTATTTAGTGTTTCTTATATAGCAGATGGAATGAATTTGAAGTTCCAGGGCTGAGGAT
CCATGCCTTCTTTGTTTCTAAGTTATCTTTCCCATAGCTTTTCAATTATCTTTCATATGATCCAG
TATATGTTAAATATGTCCTACATATACATTTAGACAACCACCATTGTTAAGTATTTGCTCTA
GGACAGAGTTTGGATTTGTTTATGTTTGCTCAAAAGGAGACCCATGGGCTCTCCAGGGTGCA
CTGAGTCAATCTAGTCCTAAAAAGCAATCTTATTATTAACCTCTGTATGACAGAATCATGTCTG
GAACCTTTGTTTTCTGCTTTCTGTCAAGTATAAACTTCACCTTGATGCTGTACTTGCAAAATC
ACATTTTCTTTCTGGAAATTCGGGCAGTGACCTTGACTGCTAGCTACCCTGTGCCAGAAAAG
CCTCATTCGTTGTGCTTGAACCCTTGAATGCCACCAGCTGTCATCACTACACAGCCCTCCTAA
GAGGCTTCCTGGAGGTTTCGAGATTGAGATGCCCTGGGAGATCCCAGAGTTTCTTTCCCTCT
TGGCCATATTCTGGTGTCAATGACAAGGAGTACCTTGGCTTTGCCACATGTCAAGGCTGAAG

AAACAGTGTCTCCAACAGAGCTCCTTGTGTTATCTGTTTGTACATGTGCATTTGTACAGTAAT
 TGGTGTGACAGTGTCTTTGTGTGAATTACAGGCAAGAATTGTGGCTGAGCAAGGCACATAG
 TCTACTCAGTCTATTCTTAAGTCCTAACTCCTCCTTGTGGTGTGGATTTGTAAGGCACTTTAT
 CCCTTTTGTCTCATGTTTCATCGTAAATGGCATAGGCAGAGATGATACCTAATTCTGCATTTG
 ATTGTCACTTTTTGTACCTGCATTAATTTAATAAAAATATTCTTATTTATTTTGTACTTGGTAC
 ACCAGCATGTCCATTTTCTTGTTTATTTTGTGTTTAATAAAAATGTTTCAGTTTAACATCCCAGTG
 GAGAAAGTTAAAAAA

5.3. mtDNA Primer ve Prob Sekans Bilgileri

*Mitokondriyal genom halkasal olduğundan mavi ile gösterilen kısım aynı zamanda sekans sonuna eklenmiştir. İleri primer ve prob sekans sonunda yer alırken probun bir kısmı sekansın sonunda diğer kısmı başında, geri primer sekans başında yer almaktadır.

>NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome

GATCACAGGTC **TATCAGCCTATTAAACCAGTCACGG** GAGCTCTCCATGCATTTGGTATTTTCGTCTGGGGG
 GTATGCACGCGATAGCATTGCGAGACGCTGGAGCCGGAGCACCCTATGTGCGAGTATCTGTCTTTGATT
 CCTGCCTCATCCTATTATTATTCGCACCTACGTTCAATAATTACAGGCGAACATACTTACTAAAGTGTGTT
 AATTAATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACAATTGAATGTCTGCACAGCCACTTTCCACACAGACA
 TCATAACAAAAAATTTCCACCAAACCCCCCTCCCCGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTG
 CCAAACCCCCAAAAACAAAGAACCCTAACACCAGCCTAACCCAGATTTCAAATTTTATCTTTTGGCGGTAT
 GCACTTTTAACAGTCACCCCCCACTAACACATTATTTTCCCCTCCCCTCCCATCTACTACTAATCTCATC
 AATACAACCCCCGCCCATCCTACCCAGCACACACACACCCGCTGCTAACCCCATACCCCGAACCAACCAA
 ACCCCAAAGACACCCCCCACAGTTTATGTAGCTTACCTCCTCAAAGCAATACACTGAAAAATGTTTAGAC
 GGGTCCACATCACCCCATAAACAAATAGGTTTGGTCTAGCCTTTCTATTAGCTTTAGTAAGATTACAC
 ATGCAAGCATCCCCGTTCCAGTGAGTTACCCCTTAAATACCCAGCATCAAAGGAACAAAGCATCAAG
 CACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCT
 TTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCACAGGGTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACCG
 CGGTCCACACGATTAACCCAAGTCAATAGAAGCCGGCGTAAAGAGTGTTTTAGATCACCCCTCCCCAAT
 AAAGCTAAAACTCACCTGAGTTGTAAAAAACTCCAGTTGACACAAAATAGACTACGAAAGTGGCTTTA
 ACATATCTGAACACACAATAGCTAAGACCCAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAAC
 CTCAACAGTTAAATCAACAAAACCTGCTCGCCAGAACACTACGAGCCACAGCTTAAAACTCAAAGGACC
 TGGCGGTGCTTCAATCCCTCTAGAGGAGCCTGTCTGTAAATCGATAAACCCCGATCAACCTCACCACC
 TCTTGCTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTGATGAAGGCTACAAAGTAAGCGCAAGTACC
 CACGTAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGGTGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCCA
 GAAAACTACGATAGCCCTTATGAACTTAAGGGTGAAGGTGGATTAGCAGTAACTAAGAGTAGAG
 TGCTTAGTTGAACAGGGCCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGG
 ACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATATAGAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACTGGAA
 AGTGCACTTGGACGACACCAGAGTGTAAGCTTAAACAAAAGCACCACCTTACACTTAGGAGATTTCAACT
 TAACTTGACCTCTGAGCTAAACCTAGCCCCAGAACCCCACTCCACCTTACTACGAGCAACCTTACCA
 AACCATTTACCCAAATAAAGTATAGGCGATAGAAATTGAAACCTGGCGCAATAGATATAGTACCGCAA
 GGGAAAGATGAAAAATTATAACCAAGCATAATATAGCAAGGACTAACCCCTATACCTTCTGCATAATG
 AATTAAGTAGAAATAACTTTGCAAGGAGAGCCAAAGCTAAGACCCCGAAACCAGACGAGCTACCTAA
 GAACAGCTAAAAGAGCACACCCGCTCTATGTAGCAAAATAGTGGGAAGATTTATAGGTAGAGGCGACAA
 ACCTACCGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCCAAGATAGAATCTTAGTTCAACTTTAAATTTGCCACAG
 AACCTCTAAATCCCCTTGTAAATTTAACTGTTAGTCCAAAGAGGAACAGCTCTTTGGACACTAGGAAA
 AAACCTTGTAGAGAGAGTAAAAAATTTAACACCCATAGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCAATTAAGAAA
 GCGTTCAAGCTCAACACCCACTACCTAAAAAATCCCAAACATATAACTGAACTCCTCACACCCCAATTGG
 ACCAATCTATACCCCTATAGAAGAACTAATGTTAGTATAAGTAACATGAAAAATTCTCCTCCGCATAA
 GCCTGCGTCAGATTAAAACACTGAACTGACAATTAACAGCCCAATATCTACAATCAACCAACAAGTCAT
 TATTACCCTCACTGTCAACCCAACACAGGCATGCTCATAAGGAAAGGTTAAAAAAGTAAAAGGAACT
 CGGCAATCTTACCCCGCTGTTTACCAAAAAACATCACCTTAGCATCACCCAGTATTAGAGGCACCGCC
 TGCCCAAGTGACACATGTTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGTTCCT
 TAAATAGGGACCTGTATGAATGGCTCCACGAGGGTTCAGCTGTCTCTTACTTTTAAACAGTGAATTTGA
 CCTGCCCGTGAAGAGGCGGGCATAACACAGCAAGACCGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTTTATTAAT
 GCAAACAGTACCTAACAAACCCACAGGTCCTAACTACCAAACTGCATTAAAAATTTTCGGTTGGGGC
 GACCTCGGAGCAGAACCCAACCTCCGAGCAGTACATGCTAAGACTTCACCAGTCAAAGCGAACTACTA
 TACTCAATTGATCCAATAACTTGACCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTATTCT
 AGAGTCCATATCAACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCGATGGTGCAGCCGCT
 ATTAAGGTTTCGTTTGTTCACGATTAAAGTCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGTAATCCAGGTC

GGTTTCTATCTACNTTCAAATTCCTCCCTGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGCCTACTTCACAAAGC
GCCTTCCCCCGTAAATGATATCATCTCAACTTAGTATTATACCCACACCCACCCAAGAAGAGGGTTTGT
AAGATGGCAGAGCCCGTAATCGCATAAAACCTTAAACCTTTACAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTCTTA
ACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTAATCGCAATGGCATTCTAATGCT
TACCGAACGAAAAATCTAGGCTATATACAACTACGCAAAGGCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGC
TACTACAACCCCTTCGCTGACGCCATAAACTCTTCACCAAAGAGCCCCTAAAACCCGCCACATCTACCA
TCACCCTCTACATACCCGCCCGACCTTAGCTCTCACCATCGCTCTTCTACTATGAACCCCTCCCAT
ACCCAACCCCTGGTCAACCTCAACCTAGGCCTCCTATTTATTCTAGCCACCTCTAGCCTAGCCGTTTAC
TCAATCCTCTGATCAGGGTGAGCATCAAACCTCAAACCTACGCCCTGATCGGCGCACTGCGAGCAGTAGCC
CAAACAATCTCATATGAAGTCACCCTAGCCATCATTCTACTATCAACATTACTAATAAGTGGCTCCTTTA
ACCTCTCCACCCCTTATCACACACAAGAACACCTCTGATTACTCTGCCATCATGACCCCTGGCCATAAT
ATGATTTATCTCCACACTAGCAGAGACCAACCGAACCCCTTCGACCTTGCCGAAGGGGAGTCCGAAC
AGTCTCAGGCTTCAACATCGAATACGCCGACGGCCCTTCGCCCTATTCTTCATAGCCGAATACACAAA
CATTATTATAAAACACCCCTCACCATAACAATCTTCTAGGAACAACATATAGCAGCATTAAGCTCCCTGA
ACTCTACACAACATATTTTGTACCAAGACCCCTACTTCTAACCTCCCTGTTCTTATGAATTGGAACAGCA
TACCCCGGATTCCGCTACGACCAACTCATACACCTCCTATGAAAAAACTTCTACCCTACCCCTAGCA
TTACTTATATGATATGTCTCCATACCCATTACAATCTCCAGCATTCCCCCTCAAACCTAAGAAATATGTC
TGATAAAAGAGTTACTTTGATAGAGTAAATAATAGGAGCTTAAACCCCTTATTTCTAGGACTATGAGA
ATCGAACCCATCCCTGAGAATCCAAAATTTCTCCGTGCCACCTATCACACCCCATCTAAAGTAAGGTCA
GCTAAATAAGCTATCGGGCCCATACCCCGAAAATGTTGGTTATACCTTCCCGTACTAATTAATCCCT
GGCCCAACCCGTCTACTCTACTCTTTTGCAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGATT
TTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTAGCTTTTATTCCAGTTCTAACCAAAAAAATAAACCT
CGTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTATTTCTCAGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCT
ATCCTCTTCAACAATATACTCTCCGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATCAATACTCATCATT
ATAATCATAATAGCTATAGCAATAAACTAGGAATAGCCCCCTTCACTTCTGAGTCCAGAGGTTACC
CAAGGCACCCCTCTGACATCCGGCTGCTTCTTCTCATATGACAAAACTAGCCCCCATCTCAATCATA
TACCAATCTCTCCCTCACTAAACGTAAGCCTTCTCTCACTCTCTCAATCTTATCCATCATAGCAGGCA
GTTGAGGTGATTAAACCAAAACCCAGCTACGCAAAATCTTAGCATACTCCTCAATTACCCCATAGGAT
GAATAATAGCAGTTCTACCGTACAACCCCTAACATAACCAATTCTTAATTTAACTATTTATATTCTAAC
TACTACCGCATTCCTACTACTCAACTTAACTCCAGCACCACGACCCTACTACTATCTCGCACCTGAAAC
AAGCTAACATGACTAACACCCCTTAATTCCATCCACCCCTCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTAACC
GGCTTTTTGCCCCAATGGGGCATTATCGAAGAAATTCACAAAAACAATAGCCTCATCATCCCCACCATC
ATAGCCACCATCACCCCTCTTAACCTCTACTTCTACCTACGCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTAC
TCCCCATATCTAACACGTAATAAAATAAAATGACAGTTTGAACATACAAAAACCCACCCCTTCTCCCCA
CACTACTCGCCCTTACCACGCTACTCTACTCTTCCCTTTTATACTAATAATCTTATAGAAATTTAG
GTTAAATACAGACCAAGAGCCTTCAAAGCCCTCAGTAAGTTGCAATACTTAATTTCTGTAACAGCTAAG
GACTGCAAAACCCCACTCTGCATCAACTGAACGCAAAATCAGCCACTTTAATTAAGCTAAGCCCTTACTA
GACCAATGGGACTTAAACCCACAAACACTTAGTTAACAGCTAAGCACCTAATCAACTGGCTTCAATCT
ACTTCTCCCGCCGCGGGAAAAAGGCGGGAGAGCCCGGCAGGTTTGAAGCTGCTTCTTGAATTTG
CAATTCATATGAAAATCACCTCGGAGCTGGTAAAAAGAGGCCTAACCCCTGTCTTTAGATTACAGTC
CAATGCTTCACTCAGCCATTTTACCTACCCCACTGATGTTGCGCGACCGTTGACTATTCTTACAAAC
CACAAAGACATTGGAACACTATACCTATTATTCGGCGCATGAGCTGGAGTCTTAGGCACAGCTCTAAGC
CTCCTTATTCGAGCCGAGCTGGGCCAGCCAGGCAACCTTCTAGGTAACGACCACATCAACCGTATATC
GTCACAGCCCATGCATTTGTAATAATCTTCTCATAGTAATACCCATCATAATCGGAGGCTTTGGCAACT
GACTAGTTCCCCTAATAATCGGTGCCCCGATATGGCGTTTCCCGCATAAACAACATAAGCTTCTGAC
TCTTACCTCCCTCTCTCTACTCTGCTCGCATCTGCTATAGTGGAGGCCGAGCAGGAACAGGTTGAA
CAGTCTACCCCTCCCTTAGCAGGGAATACTCCCACCCCTGGAGCCTCCGTAGACCTAACCATCTTCTCCT
ACACCTAGCAGGTGTCTCTCTATCTTAGGGGCCATCAATTTATCATCAACAATTATCAATATAAAACC
CCCTGCCATAACCCAATACCAACGCCCCCTCTCGTCTGATCCGTCTAATCACAGCAGTCTACTTCTC
CTATCTCTCCCACTAGCTGCTGGCATCAGTACTACTAATACAGACCGCAACCTCAACACCCCTCT
TCGACCCCGCCGAGGAGGAGACCCCATCTATACCAACACCTATTCTGATTTTTCGGTACCCCTGAAG
TTTATATTCTTATCCTACCAGGCTTCGGAATAATCTCCCATATTGTAACCTACTACTCCGAAAAAAGA
ACCATTGAGTACATAGGTATGGTCTGAGCTATGATATCAATTGGCTTCCTAGGGTTTATCGTGTGAGC
ACACCATATATTTACAGTAGGAATAGACGTAGACACACGAGCATATTTACCTCCGCTACCATAATCAT
CGCTATCCCCACCGGCGTCAAAGTATTTAGCTGACTCGCCACACTCCACGGAAGCAATATGAAATGATC
TGCTGCAGTGCTCTGAGCCCTAGGATTCTTTCTTTTACCCTAGGTGGCCTGACTGGCATTGTATTA
GCAAACCTCATGACTAGACATCGTACTACACGACACTACGTTGTAGCCCACTTCCACTTCTCTTA
TCAATAGGAGCTGTATTTGCCATCATAGGAGGCTTCATTCACTGATTTCCTCCTATTCTCAGGCTACACCC
TAGACCAAACCTACGCCAAAATCCATTTCACTATCATATTTCATCGGCGTAAATCTAACTTTCTTCCACA
ACACTTTCTCGGCCTATCCGGAATGCCCCGACGTTACTCGGACTACCCCGATGCATACACCACATGAAA
CATCCTATCATCTGTAGGCTCATTCAATTTCTTAACAGCAGTAATATTAATAATTTTCATGATTTGAGAA
GCCTTCGCTTCGAAGCGAAAAAGTCTAATAGTAGAAGAACCCTCCATAAACCTGGAGTGACTATATGG
ATGCCCCCACCCTACACACATTCGAAGAACCCTGATACATAAAATCTAGACAAAAAAGGAAGGAAT
CGAACCCCAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCTGACCTCCATGACTTTTTTCAAAAAGGTATTAGAAA
AACCATTTTATAACTTTGTCAAAGTTAAATTATAGGCTAAATCCTATATATCTTAATGGCACATGCAGC
GCAAGTAGGTCTACAAGACGCTACTTCCCTATCATAGAAGAGCTTATCACCTTTTCATGATCACGCCCT

CATAATCATTTTCCTTATCTGCTTCCTAGTCCTGTATGCCCTTTTCCTAACACTCACAAACAAAACCTAACT
 AATACTAACATCTCAGACGCTCAGGAAATAGAAACCGTCTGAACTATCCTGCCCGCCATCATCCTAGTC
 CTCATCGCCCTCCCATCCCTACGCATCCTTTACATAACAGACGAGGTCAACGATCCCTCCCTTACCATCA
 AATCAATTGGCCACCAATGGTACTGAACCTACGAGTACACCGACTACGGCGGACTAATCTTCAACTCCT
 ACATACTTCCCCCATTTATTCCTAGAACCCAGGCGACCTGCGACTCCTTGACGTTGACAATCGAGTAGTAC
 TCCCGATTGAAGCCCCCATTCGTATAATAATTACATCACAAAGACGTCTTGCACTCATGAGCTGTCCCCA
 CATTAGGCTTAAAAACAGATGCAATTCCCGGACGTCTAAACCAAACCACTTTACCCGCTACACGACCGG
 GGGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACACAGTTTCATGCCCATCGTCCTAGAAT
 TAATTCCTTAAAAATCTTTGAAATAGGGCCCGTATTTACCCTATAGCACCCCTCTACCCCTCTAGAG
 CCCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAACTTTTAAAGTTAAAGATTAAAGAGAACCAACACCTCTTTACAG
 TGAAATGCCCAACTAAATACTACCGTATGGCCACCATTAATTACCCCATACTCCTTACACTATTCTCTC
 ATCACCAACTAAAAATATTAACACAAACTACCACCTACCTCCCTCACCAAGCCCATAAAAATAAA
 AAATTATAACAAACCTGAGAACCAAAATGAACGAAATCTGTTGCTTCATTTCATTCGCCCCACAATC
 CTAGGCTTACCCGCGCAGTACTGATCATTCTATTTCCCTCTATTGATCCCCCACTTCAATTCTTCA
 TCAACAACCGACTAATCACCAACCAACAATGACTAATCAAACCTCAAACAAATGATAACCATA
 CACAACACTAAAGGACGAACCTGATCTCTTATACTAGTATCCTTAATCATTTTTATTGCCACAACCTAAC
 TCCTCGGACTCCTGCCTCACTCATTTACACCAACCACCAACTATCTATAAACCTAGCCATGGCCATCCC
 CTTATGAGCGGGCACAGTGATTATAGGCTTTTCGCTCTAAGATTAAAAATGCCCTAGCCCACTTCTTACC
 ACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCCATACTAGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACC
 AATAGCCCTGGCCGTACGCCTAACCGCTAACATTTACTGACGGCCACCTACTCATGCACCTAATTTGGA
 CGCCACCTAGCAATATCAACCATTAACCTTCCCTTCACTATCATCTTCACAATTTCAATTCTTACTG
 ACTATCCTAGAAATCGCTGTGCTTAAATCCAAGCCTACGTTTTACACTTCTAGTAAGCCTCTACCTGC
 ACGACAACACATAATGACCCACCAATCACATGCCTATCATATAGTAAAACCCAGCCCATGACCCCTAAC
 AGGGGGCCTCTCAGCCCTCCTAATGACCTCCGGCCTAGCCATGTGATTTCACTTCCACTCCATAACGCTC
 CTCATACTAGGCCTACTAACCAACACACTAACCATATACCAATGATGGCGCGATGTAACACGAGAAAG
 CACATACCAAGGCCACCACACACCACCTGTCCAAAAGGCCTTCGATACGGGATAATCCTATTTATTAC
 CTCAGAAGTTTTTTCTTCGAGGATTTTTCTGAGCCTTTTACCCTCCAGCCTAGCCCTACCCCTAAC
 TAGGAGGGCACTGGCCCCAACAGGCATACCCCGCTAAATCCCTAGAAAGTCCCACTCTTAAACACAT
 CCGTATTACTCGCATCAGGAGTATCAATCACCTGAGCTCACCATAGTCTAATAGAAAAACAACCGAAACC
 AAATAATTCAAGCACTGCTTATTACAATTTTACTGGGTCTCTATTTTACCCTCCTACAAGCCTCAGAGTA
 CTTCGAGTCTCCCTTACCATTTCGACGGCATCTACGGCTCAACATTTTTGTAGCCACAGGCTTCCAC
 GGACTTCACGTCATTATTGGCTCAACTTTCCTCACTATCTGCTTCATCCGCCAACTAATATTTCACTTTAC
 ATCCAAACATCACTTTGGCTTCGAAGCCGCGCCTGATACTGGCATTTTTGTAGATGTGGTTTGACTATTT
 CTGTATGTCTCCATCTATTGATGAGGGTCTTACTCTTTTAGTATAAATAGTACCGTTAACTTCCAATTA
 CTAGTTTTGACAATTTCAAAAAAGAGTAATAAACTTCGCCTTAATTTTAATAATCAACACCCCTCTAG
 CCTTACTATAATAATTATTACATTTTGACTAACCACTAACCGCTACATAGAAAAATCCACCCCTTA
 CGAGTGGCGCTTCGACCCTATATCCCCGCGCGTCCCTTTCTCCATAAAATTTCTTCTTAGTAGCTATT
 ACCTTCTTATTATTGATCTAGAAATTGCCCTCCTTTTACCCTACCATGAGCCCTACAAACAACCTAAC
 TGCCACTAATAGTTATGTCATCCCTCTTATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCTATGAGTGACT
 ACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTATATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTGACTCATTAA
 ATTATGATAATCATATTTACCAAATGCCCTCATTTACATAAATATTATACTAGCATTTACCATCTCACT
 TCTAGGAATACTAGTATATCGCTCACACCTCATATCCTCCTACTATGCCTAGAAAGGAATAACTATC
 GCTGTTCAATTATAGTACTCTCATAACCCTAACACCACTCCCTCTTAGCCAATATTGTGCTATTGGC
 ATACTAGTCTTTGCCGCTGCGAAGCAGCGGTGGGCCTAGCCCTACTAGTCTCAATCTCCAACACATAT
 GGCCTAGACTACGTACATAACCTAAACCTACTCCAATGCTAAAACCTAATCGTCCCAACAATTATATTAC
 TACCCTGACATGACTTTCCAAAAACACATAATTTGAATCAACACAACCAACCCACAGCCTAATTATTA
 GCATCATCCCTCTACTATTTTTTAACCAATCAACAACAACCTATTTAGCTGTTCCCCAACCTTTTCTCTC
 GACCCCTAACAAACCCCTCCTAATACTAACTACCTGACTCCTACCCCTCACAAATCATGGCAAGCCAA
 CGCCACTTATCCAGTGAACCACTATCAGAAAAAACTCTACCTCTCTATACTAATCTCCCTACAAATCC
 CCTAATTATAACATTACAGCCACAGAACTAATCTTTATATCTTCTTGAACCAACCACTTATCTCC
 CACTTTGGCTATCATCACCCGATGAGGCAACCAGCCAGAACGCTGAACGCAAGGCACATACTTCTATT
 CTACACCCTAGTAGGCTCCCTTCCCTACTCATCGCACTAATTTACACTCACAAACCCCTAGGCTCACTA
 AACATTCTACTACTACTCTCACTGCCAAGAATATCAAACCTCTGAGCCAACAACCTAATATGACTA
 GCTTACACAATAGCTTTTATAGTAAAGATACCTCTTTACGGACTCCACTTATGACTCCCTAAAGCCCATG
 TCGAAGCCCCCATCGCTGGGTCAATAGTACTTGCCGCACTCTTAAAACTAGGCGGCTATGGTATAA
 TAGCCTCACACTATTCTCAACCCCTGACAAACACATAGCCTACCCCTTCTTGTACTATCCCTATG
 AGGCATAATTATAACAAGCTCCATCTGCTACGACAAACAGACCTAAATCGCTCACTTGCATCTCTTC
 AATCAGCCACATAGCCCTCGTAGTAACAGCCATTCTCATCCAAACCCCTGAAGCTTACCGGCGCAGT
 CATTCTCATAATCGCCACGGGCTTACATCCTCATTACTATTCTGCCTAGCAAACTCAAACCTACGAACGC
 ACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAAGGACTTCAAACCTCTACTCCCACTAATAGCTTTTGTAGTAC
 TTCTAGCAAGCCTCGCTAACCTCGCCTTACCCCTCACTATTAACCTACTGGGAGAACTCTCTGTGCTAGT
 AACACGTTCTCTGATCAAATATCACTCTCCTACTTACAGGACTCAACATACTAGTCACAGCCCTATAC
 TCCCTCTACATAATTTACCACAACACAATGGGGCTCACTACCCACCACTAACAACATAAAACCCCTCA
 TTCACACGAGAAAAACCCCTCATGTTACATACCTATCCCCCTTCTCCTCTATCCCTCAACCCCGACA
 TCATTACCGGGTTTTCTCTGTGAAATATAGTTTAAACCAAACATCAGATTGTGAATCTGACAACAGAG
 GCTTACGACCCCTTATTTACCGAGAAAGCTCACAGAAGCTGCTAACTCATGCCCCCATGTCTAACAAACA

FORMLAR

HASTA OLGU FORMU

Doktor Adı:**Hastanın;****Adı ve Soyadı :****Doğum Yeri ve Tarihi :****Cinsiyet :****Meslek :****Örneğin Alındığı tarih :**

Tanı ve tarihi :**Hastalığın Süresi :****Hastalığın Evresi :****Metastaz var/yok :****Daha önce herhangi bir kanser tanısı konuldu mu? :****Hepatit B taşıyıcısı :****Hepatit C taşıyıcısı :****Siroz :****Sigar kullanımı :****Alkol kullanımı :****Mide ve Pankreas problemi :****Aile öyküsü :**

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1333

Tarih : 22.11.2016

Konu : Prof. Dr. Sadrettin PENÇE hk.

Sayın Prof. Dr. Sadrettin PENÇE
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

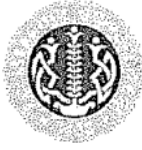
İlgi: Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünün 02/11/2016 gün ve 395686 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve MSc. Burhanettin YALÇINKAYA' nın yürüteceği 2016/1297 dosya numaralı "Hepatoselüler karsinoma hastalığının tanısında ve izlenmesinde kullanılabilecek biyo-belirteç taranması" başlıklı çalışma kurulumuzun 11/11/2016 gün ve 19 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 312

Konu: Prof. Dr. Sadrettin PENÇE hk.

Tarih : 28.02.2018

Sayın Prof. Dr. Sadrettin PENÇE
Nöroloji Anabilim Dalı

İlgi : Moleküler Tıp Anabilim Dalının 09/02/2018 gün ve 55118 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve MSc. Burhanettin YALÇINKAYA' nın yürüteceği 2016/1297 dosya numaralı "Hepatoselüler karsinoma hastalığının tanısında ve izlenmesinde kullanılabilecek biyo-belirteç taraması" başlıklı çalışma kurumumuzun 11/11/2016 gün ve 19 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuştu.

İlgi değişiklik isteminiz, Değişiklik Bilgi Formu, Çalışmaya ek merkez olarak Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi' nin eklenmesi hakkında, kurumumuzun 23/02/2018 tarih ve 04 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yagiz ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

turnitin

HEPATOSİTÖLER KARSİNOMA HASTALIĞININ TANISINDA VE İZLENMESİNDE KULLANILABİLECEK BİYO-BELİRTEÇ TARANMASI

1 / 1

Eşlemlere Genel Bakış

%5

5

1 www.turkishimmuno... %1 >
Internet Kaynak

2 www.pubfacts.com %<1 >
Internet Kaynak

3 dengipark.gov.tr %<1 >
Internet Kaynak

4 papertity.org %<1 >
Internet Kaynak

5 Sedighah Fazel Arai, H... %<1 >
Yazın

6 University of Cape Tow... %<1 >
Öğrenci Yaşam Sistemi

7 www.arkaloglu.net %<1 >
Internet Kaynak

8 Karadeniz Teknik Üni... %<1 >
Öğrenci Yaşam Sistemi

9 e-nb.info %<1 >
Internet Kaynak

10 www.appendixone-publi... %<1 >
Internet Kaynak

11 Istanbul University' ne... %<1 >
Öğrenci Yaşam Sistemi

12 mldisplayer.biz.tr %<1 >
Internet Kaynak

13 bulut.farmasya.tr %<1 >
Internet Kaynak

Sayfa: 1 / 77 Kelime Sayısı: 18606

Text-only Report High Resolution

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Burhanettin	Soyadı	YALÇINKAYA
Doğ.Yeri		Doğ.Tar.	
Uyruğu		TC Kim No	
Email		Tel	0544 742 33 38

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Projeleri

- AB Çerçeve**, “Novel Materials And Methods for The Detection, Traceable Monitoring and Evaluation of Antimicrobial Resistance” Araştırmacı, EMRP, 2016-2019.
- KRF-Kore**, “Türkiye-Güney Kore İşbirliği İle Gen Metilasyon Ölçümleri İçin Uluslararası Standart Sistem Geliştirilmesi” Araştırmacı, TÜBİTAK, 2015- 2018.
- Endüstri**, “Akaryakıtlar İçin Ulusal Marker Sisteminin Geliştirilmesi ve Sürekli Güncellenmesi” Araştırmacı, EPDK, 2011-2018
- BAP**, “Et Tür Tayini Referans Malzemesi Üretimi Projesi” Yürütücü, TÜBİTAK UME, 2015-2017.
- AB Çerçeve**, “Traceability for biologically relevant molecules and entities” Araştırmacı, EMRP, 2013-2016.
- AB Çerçeve**, “Metrology For Monitoring Infectious Diseases, Antimicrobial Resistance, and Harmful Micro-Organisms” Araştırmacı, EMRP, 2012-2015.
- BAP**, “Medikal Metroloji Fizibilite Projesi”, Araştırmacı, TÜBİTAK UME, 2012-2013

Yayınları

- Yalcinkaya, B.**, Yumbul, E., Mozioglu, E., & Akgoz, M. (2017). Comparison of DNA extraction methods for meat analysis. Food Chemistry, 221, 1253–1257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.032>
- Asicioglu, M., Yalcinkaya, B., Akgoz, M. "Measurement of Genetically Modified (GM) Genes in Different Corn Products", Journal of Chemical Metrology, 11:2 (2017) : 55-60
- Devonshire, A. S., O’Sullivan, D. M., Honeyborne, I., Jones, G., Karczmarczyk, M., Pavšič, J., ... **Yalcinkaya B.**, J. F. (2016). The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis. BMC Infectious Diseases, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1696-7>
- Hatipoglu, S. D., **Yalcinkaya, B.**, Akgoz, M., Ozturk, T., Goren, A. C., & Topcu, G. (2017). Screening of Hallucinogenic Compounds and Genomic Characterisation of 40 Anatolian Salvia Species. Phytochemical Analysis, (December 2016). <https://doi.org/10.1002/pca.2703>

Tebliğleri

- Yalcinkaya, B.**, Aydin E., Akgoz M., Pençe S. A simple silica based method for cell free DNA isolation from blood plasma International İVEK Biotechnology Congress 26-28 November 2018 İstanbul
- Yalcinkaya, B.**, Pençe S., Optimization of primers and probes that can be used in the diagnosis of mitochondrial disease International İVEK Biotechnology Congress İstanbul
- Un, I., Coskun, K., **Yalcinkaya, B.** "Profiling and Determination of Extracted DNA Solution Impurities by qNMR ", 1. Euroasia Biochemical Approaches & Technologies Congress , Antalya (27-30/10/2018) : 105 p.
- Yalcinkaya, B.**, Senal, M., Akgoz, M. “Determination of nucleic acid purity by HPLC analysis” FEBS JOURNAL 283, 207-207
- Hatipoglu, S.D., **Yalcinkaya, B.**, Akgoz, M., Ozturk, T., Topcu, G., Goren, A.C. "Determination of Psychoactive Substances in Ten Salvia Species from Turkey ", 2nd International Congress of Forensic Toxicology, Ankara (26-29/05/2016)
- Karaboce, B., Gulmez, Y., Akgoz, M., Kaykisizli, H., **Yalcinkaya, B.**, Dorosinskiy, L. "Medical Metrology Studies at TUBITAK UME ", EDP Sciences (17th International Congress of Metrology), 06011:- (2015) : 1-4
- Akyurek, S., Mozioglu, E., **Yalcinkaya, B.**, Akgoz, M. "Metrological Approach for DNA

Methylation and Personalized Medicine", Advances In Predictive & Personalized Medicine, İstanbul (02-03/04/2015) :

Yalcinkaya, B., Akyurek, S., Mozioglu, E., Akgoz, M. "Personalized Medicine and Biometrology", Advances In Predictive & Personalized Medicine, İstanbul (02-03/04/2015)

Hatipoglu, S. D., Akgoz M., **Yalcinkaya, B.**, Goren, A. C., Hallucinogen Effects And Forensic Analysis of Plants , 2. Pharmaceutical Chemistry, Production, Technology And Standardization Congress, 2014

Ödülleri

Mansiyon (Poster)

Yayın Teşvik

Eşik Üstü

En iyi Poster

Euroasia Biochemical Approaches & Technologies Congress (2018)

TÜBİTAK 2018

TÜBİTAK 2017

2. Pharmaceutical Chemistry, Production, Technology And Standardization Congress (2014)