



**T.C.**  
**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

# **MEME KANSERİNDE SIRT1 İLİŞKİLİ miRNA'LARIN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Muhsin ELÇİ**  
**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Göktürk MARALCAN**  
**İkinci tez danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Alper AYTEKİN**

**NİSAN 2016**



T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİNDE SIRT1 İLİŞKİLİ miRNA'LARIN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Muhsin ELÇİ**  
**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Göktürk MARALCAN**  
**İkinci tez danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Alper AYTEKİN**



**T.C.**  
**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

MEME KANSERİNDE SIRT1 İLİŞKİLİ  
miRNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

DR. MUHSİN ELÇİ

03.05.2016

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof.Dr. Levent ELBEY  
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. M. Avni GÖKALP  
Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Prof. Dr. Göktürk MARALCAN  
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. M. Avni GÖKALP

2. Prof. Dr. Göktürk MARALCAN

3. Yrd. Doç. Dr. Başar AKSOY

Yedek Liste

1. Yrd. Doç. Dr. Alper AYTEKİN
2. Yrd. Doç. Dr. Latif YILMAZ

## I. ÖNSÖZ

Bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıları ve tez çalışmam sırasında sabır, özveri ve bilimsel desteğini esirgemeyen başta tez danışmanım olmak üzere tüm hoclarıma, ihtisas sürem boyunca güzel bir uyum içinde çalıştığım tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, tüm klinik hemşire ve personellerine teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez aşamasında da bana her türlü manevi desteği veren ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Ayfer'e, ayrıca hayatımın ayrılmaz bir parçası haline gelen biricik kızım Berçem'e ve oğlum Aram'a, evlatları olmaktan onur duyduğum, hiçbir karşılık beklemeden maddi ve manevi desteklerini her zaman arkamda hissettiğim anne ve babama ayrı ayrı sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Muhsin Elçi

Gaziantep 2016

## II. İÇİNDEKİLER

|                                                  |      |
|--------------------------------------------------|------|
| I. ÖNSÖZ .....                                   | I    |
| II. ÖZET .....                                   | II   |
| III. ABSTRACT .....                              | IV   |
| IV. İÇİNDEKİLER .....                            | V    |
| V. KISALTMALAR .....                             | VII  |
| VI. TABLO LİSTESİ .....                          | VIII |
| VII. ŞEKİL LİSTESİ .....                         | IX   |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                           | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                          | 3    |
| 2.1. MEME KANSERİ .....                          | 3    |
| 2.1.1. Meme kanserinin epidemiyolojisi .....     | 3    |
| 2.1.2. Meme kanserinde etiyoloji .....           | 4    |
| 2.1.2.1. Genetik ve aile öyküsü .....            | 4    |
| 2.1.2.2. Reprodüktif nedenler .....              | 5    |
| 2.1.2.3. Hormonal faktörler .....                | 6    |
| 2.1.2.4. Çevresel faktörler .....                | 6    |
| 2.1.2.4.1. Sigara .....                          | 6    |
| 2.1.2.4.2. Besin faktörü .....                   | 7    |
| 2.1.2.4.3. Vücut ağırlığı .....                  | 7    |
| 2.1.2.4.4. Alkol .....                           | 7    |
| 2.1.2.4.5. Radyasyon .....                       | 7    |
| 2.2. KANSER VE MOLEKÜLER TEMELİ .....            | 8    |
| 2.2.1. Meme kanserinde etkili onkogenler .....   | 8    |
| 2.2.2. Sırt ailesi .....                         | 9    |
| 2.2.2.1. Memeli sirtüinleri .....                | 10   |
| 2.2.2.1.1. Memeli sirtüinlerinin işlevleri ..... | 11   |
| 2.2.2.2. SIRT1 ve ilişkili micro RNA'lar .....   | 13   |

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                               | 16 |
| 3.1. Dokudan miRNA izolasyonu .....                    | 16 |
| 3.2. miRNA'DAN cDNA eldesi .....                       | 17 |
| 3.3. SRT-PCR (real time-PCR, gerçek zamanlı-PCR) ..... | 18 |
| 4. BULGULAR .....                                      | 20 |
| 4.1. miRNA-132 için bulgular .....                     | 20 |
| 4.2. miRNA-34a için bulgular .....                     | 22 |
| 4.3. miRNA-9 için bulgular .....                       | 23 |
| 5. TARTIŞMA .....                                      | 25 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                             | 26 |
| 7. KAYNAKLAR .....                                     | 28 |
| 8. ÖZGEÇMİŞ .....                                      | 40 |

### III. ÖZET

#### **Meme kanserinde SIRT1 ilişkili miRNA'ların araştırılması**

Muhsin ELÇİ, Uzmanlık Tezi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Tez yöneticisi: Prof. Dr. Göktürk MARALCAN

Yardımcı tez yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Alper AYTEKİN

Nisan 2016 – 55 Sayfa

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitelerden biri olup yine kadınlarda kansere bağlı ölümlerde de en sık nedenlerden biridir. Bu hastalığın tedavisinde son yıllarda yeni yaklaşımlar ve yöntemler geliştirilmesine rağmen, hastalığın insidansındaki sürekli artıştan dolayı, meme kanseri halen çok önemli bir sağlık problemidir.

Meme kanseri, etyolojisinde birçok etkenin rol aldığı multifaktöryel bir hastalıktır. Etiyolojide genetik faktörler ve aile öyküsü çok önemli bir yer tutmaktadır.

SIRT1, meme kanseri ile ilişkili olduğu düşünülen ve regülasyonunun meme kanserinin tedavisinde bir yol olabileceğine inanılan bir enzim ailesidir. SIRT1'in regülasyonu bazı molekülleri direkt uygulanması ile veya SIRT1 ile ilişkili olan mikro RNA'ların kullanılması ile olabilir.

Mikro RNA'lardan miRNA-9, miRNA-34a ve miRNA-132 meme kanserine etkisi olduğu düşünülen SIRT1 ilişkili mikro RNA'lardandır. Literatürdeki kısıtlı çalışmalarda bu mikro RNA'ların meme kanseri dokularında, normal dokulara göre daha düşük oranda bulunduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada etik kurul onayı ile 66 hastadan alınan 132 dokuda, bu üç mikro RNA'nın düzeylerini araştırdı. Her üç RNA için de, normal ve kanser dokuları arasında anlamlı bir düzey farkı saptanmadı.

SIRT1 ve ilişkili mikro RNA'lar ile ilgili literatürdeki çelişkili sonuçlar göz önüne alındığında bu konuda ek çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** SIRT1, meme kanseri, miRNA-9, miRNA-34a, miRNA-132, mikro RNA

#### IV. ABSTRACT

##### **Investigation of SIRT1 related miRNA's in breast cancer**

Muhsin ELÇİ, Recidency Thesis, General Surgery Department

Supervisors: Prof. Dr. Göktürk MARALCAN

Assist. Prof. Dr. Alper AYTEKİN

April 2016 – 55 Pages

Breast cancer is one of the most common malignancy for women and one of the most common causes of cancer related deaths for women.

Although there are new treatment approaches, it is still an important health problem because of its increasing incidence. Breast cancer is a multifactorial disease that many factors are playing roles in its etiology. Genetic factors and family history play major roles in its etiology.

SIRT1 is an enzyme family related to breast cancer that it is believed that its regulation may bring new possibilities for treatment of breast cancer.

SIRT1 can be regulated with direct application of some molecules or with help of SIRT1 related micro RNAs.

miRNA-9, miRNA-34a and miRNA-132 are some of this miRNAs that are believed to be related to SIRT1 regulation.

A few studies in literature shows that this micro RNA's levels are decreased in tumor tissues compared to normal tissues of the same patients.

In this study, with approval of ethical committee, this 3 miRNA's levels in 132 breast tissues which were collected intraoperatively from 66 patients. All patients were female and operated in 2015-2016. Mean age was 50,8. For all of three micro RNAs, there was no statistically significant difference between tumor and normal tissues.

Regarding to previous studies about SIRT1 and related micro RNAs which are sometimes contradictory, we think that more studies are needed about this micro RNAs to illuminate their relations with SIRT1.

Keywords: SIRT1, breast cancer, miRNA-9, miRNA-34a, miRNA-132, micro RNA

## V. KISALTMALAR

|                  |   |                                                         |
|------------------|---|---------------------------------------------------------|
| APC              | : | Adenomatous polyposis coli                              |
| BCL-2            | : | B-cell lymphoma 2                                       |
| CYP19            | : | Cytochrome P450 aromatase                               |
| DBC              | : | Deleted in breast cancer                                |
| DNA              | : | Deoksiribo Nükleik asit                                 |
| İDK              | : | İnvaziv duktal karsinom                                 |
| İLK              | : | İnvaziv lobüler karsinom                                |
| ER               | : | Östrojen reseptörü                                      |
| FXR              | : | Farnesoid X receptor                                    |
| HDAC             | : | Histon deasetilaz enzim grubu                           |
| HER-2            | : | Human epidermal growth factor receptor 2                |
| M.Ö              | : | Milattan önce                                           |
| miRNA            | : | Mikro RNA                                               |
| NAD <sup>+</sup> | : | Nikotinamid Adenin Dinükleotit                          |
| PCB              | : | Polychlorinate biphenyl                                 |
| PR               | : | Progesteron reseptörü                                   |
| RT-PCR           | : | Reverse transcription polymerase chain reaction         |
| ROS              | : | Reactive oxygen species                                 |
| SIRT1            | : | Silent mating-type information regulation 2 homologue 1 |

## VI. TABLO LİSTESİ

|                                                                                                                          |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Tablo 1 SIRT ailesi genlerinin rol aldığı biyolojik olaylar ve ilişkiye girdiği proteinler .....                         | 11    |
| Tablo 2 cDNA için bileşenler ve miktarları .....                                                                         | 15    |
| Tablo 3 qRT-PCR için kullanılan bileşenlerin oranları .....                                                              | 16    |
| Tablo 4 qRT-PCR Tepkime Koşulları .....                                                                                  | 17    |
| Tablo 5 Hastalar hakkındaki istatistiksel bilgiler .....                                                                 | 18    |
| Tablo 6 Hasta bilgileri .....                                                                                            | 19-20 |
| Tablo 7 Normal ve tümör dokusundadaki miRNA-132 düzeylerinin U6'ya göre düzeltilmiş değerlerinin karşılaştırılması ..... | 21    |
| Tablo 8 Normal ve tümör dokusundadaki miRNA-34a düzeylerinin U6'ya göre düzeltilmiş değerlerinin karşılaştırılması ..... | 23    |
| Tablo 9 Normal ve tümör dokusundadaki miRNA-9 düzeylerinin U6'ya göre düzeltilmiş değerlerinin karşılaştırılması .....   | 24    |

## VII. ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1 I., II. ve III. Sınıf histon deasetilaz enzimleri .....                                 | 10 |
| Şekil 2 Her bir hasta için tümörlü ve normal meme dokularında ölçülen miRNA-132 düzeyleri ..... | 22 |
| Şekil 3 Her bir hasta için tümörlü ve normal meme dokularında ölçülen miRNA-34a düzeyleri ..... | 23 |
| Şekil 4 Her bir hasta için tümörlü ve normal meme dokularında ölçülen miRNA-9 düzeyleri .....   | 25 |
| Şekil 5 SIRT1'in miRNAlar ile regülasyonu .....                                                 | 27 |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Yeryüzünde her yıl 1 milyonun üzerinde yeni olgu meme kanseri tanısı almakta olup (1), kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık ikinci nedeni de yine meme kanseridir. (2) Meme kanseri tedavisindeki gelişmeler hastalığın morbiditesinde azalmaya neden olmakla birlikte mortalitede belirgin bir azalma sağlayamamıştır.

Meme kanseri diğer bir çok kanser gibi genetik ve çevresel faktörlerin de etkili olduğu karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu faktörler genetik, hormonal, sosyobiyolojik ve psikolojik olarak sınıflandırılabilir.

Kadın bireylerin yaşamlarında bu denli önemli bir yeri olan bu hastalığın tedavisinde yeni gelişmelerin ve belki cerrahi dışı veya öncesi tedavilerin mümkün kılınabilmesi için bu hastalığın tüm genetik yolağının ortaya konulması önemli bir aşamadır. Bu amaçla araştırılmaya değer süreçlerden biri de class III histon deasetilaz ailesinin (HDAC) bir üyesi olan SIRT1 (Silent mating-type information regulation 2 homologue 1) enziminin ve bu enzimin regülasyonunda görevli olan miRNA'ların etkilerinin ortaya konulmasıdır. SIRT1'in genom stabilitesi, metabolizma, hücre yaşamı, nörojenezis gibi birçok fizyolojik süreçte anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir.

SIRT1'in deasetilaz fonksiyonunun memelilerde yaşam süresinde uzama ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu özelliğinden dolayı bu proteinin bir çok kanserin gelişiminde tümör promoteri olarak görev aldığı düşünülmüştür.

Meme kanserli hastaların tümörlü ve normal dokuları üzerinde 2007-2008 yılları arasında yapılan bir karşılaştırma çalışmasında SIRT1 ile Ki67 arasında kuvvetli bir korelasyon olduğu ve sirtinol ile SIRT1'in inhibisyonunda, kanser dokusunda ömür uzatıcı bcl-2 (B-cell lymphoma 2) proteinleri düzeyinde dramatik düşüş olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar SIRT1'in inhibisyonunun meme kanserinin kemoterapisinde bir strateji olarak

kullanılabileceğini düşündürmüştür. RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) sonuçları SIRT1 miRNA'ları düzeylerinin normal dokulara oranla tümör dokularında daha yüksek bir oranda ifade edildiği saptanmıştır. (92.59%, n=27) (3) SIRT1'in regülasyonunda görev aldığı bilinen üç miRNA'yı incelemek üzere bu çalışma için seçildi. Bunlar miRNA-34a, miRNA-9 ve miRNA-132 miRNA'ları idi.

Bu çalışmada meme kanserli olan ve tedavi amacı ile mastektomi uygulanan hastalarda kanser dokuları ve memenin normal dokularında SIRT1 ilişkili miRNA'ların düzeylerinin araştırılmasını hedeflendi.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Meme kanseri

#### 2.1.1. Meme kanserinin epidemiyolojisi

Tarihte ilk defa M.Ö 2500-3000 yıllarına ait bir yazıtta meme kanserinden bahsedildiği düşünülmektedir. Bahsedilen hasta erkek bir hasta olmasına karşın tüm klinik verileri meme kanseri ile uyumlu imiş ve hastalık için hekim “bunun hiçbir tedavisi yoktur” ifadesini kullanmış (5). Ne yazık ki bu hastalık halen kadınlarda önemli bir sağlık problemi olarak devam etmektedir ancak günümüzde çeşitli tedavi yaklaşımları mevcuttur.

Meme kanseri 50 yaşına kadar yaş ile birlikte sıklığı artmakta iken daha sonra bu artış oranı azalır. Meme kanseri görülme sıklığı 1999-2007 yılları arasında yıllık %1.8 oranında artmıştır (6). Meme kanserindeki bu artış, tarama yöntemlerinin daha sık ve düzenli kullanılmasına bağlı olarak tanı konma oranının artması ve ileri yaşlarda görülen bu hastalığın toplumlarda ortalama yaşam sürelerinin uzamasıyla birlikte artış göstermesi şeklinde de açıklanabilir (7).

Otuzlu yaşlardan önce sık görülmeyen meme kanseri (total kanser vakalarının %2'sinden az), daha sonraki reproduktif yıllarda hızlı bir tırmanış gösterir, menopoza dönemindeki hafif bir azalmanın ardından menopoza sonrası yıllarda yavaş bir eğimle sürekli devam eden artış ortaya çıkar (8).

Amerikada yenidoğan bir kız çocuğunda meme kanserinin gelişim riski %12 olarak hesaplanmıştır. Kadınların kansersiz olarak geçirdiği her yıl, sonraki dönemde meme kanseri gelişim riskini azaltmaktadır. Bu nedenle 50 yaşındaki bir kadında meme kanserine yakalanma riski %11 , 70 yaşında bir kadında ise %7'dir (9). Amerika'da 1970'te bir kadının meme kanserine yakalanma riski 1/13 iken, 1980'de 1/11 ve 2004'te 1/8 olarak hesaplanmıştır.

Ülkeler arasında da önemli farklar bulunmaktadır. Meme kanserine bağlı en yüksek mortalite 100 binde 29.6 olarak Malta ve Kıbrıs'ta iken en düşük oran 100 binde 2.0 oranı ile Haiti'dedir. Amerika'da bu oran 19'dur. Sanayinin daha gelişmiş olduğu yerlerde meme kanseri oranlarının arttığı görülmektedir (10).

### **2.1.2. Meme kanserinde etyoloji**

Meme kanserinin nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Meme kanseri diğer birçok kanser gibi genetik ve çevresel faktörlerin de etkili olduğu karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu faktörler genetik, hormonal, sosyobiyolojik ve psikolojik olarak sınıflandırılabilir. Predispozan faktörlere, aile öyküsü, BRCA1-2 mutasyonları, yaş, kadın cinsiyet, erken menarş ve geç menapoz, atipik duktal ve lobüler hiperplazi gibi maligniteye dönüşme potansiyeli taşıyan lezyonlar, radyasyona maruz kalma örnek olarak verilebilir. Yeni çalışmalar en önemli belirleyici faktörün genetik imza olabileceğini göstermektedir.

#### **2.1.2.1. Genetik ve aile öyküsü**

Birçok çalışmada, aile öyküsü ile meme kanseri riski arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmalar riskleri şu şekilde özetlemiştir: 1- Birinci derece akrabasında (anneler, kız kardeşler ve kızlar) meme kanseri olanlarda 2-3 kat artmış risk vardır 2- Uzak akrabalarında (kuzenler, teyzeler, büyük anneler) meme kanseri olanlarda risk hızla düşer 3- Birinci derecede akrabalarında bilateral meme kanseri ya da premenapozal kanseri olanlarda risk çok fazla artar. Çok sayıda etkilenmiş üyesi

olan ailelerde, özellikle bilateral ve erken başlangıcı olan kanserlerde, birinci derecede akrabalarda mutlak risk %50'ye varmaktadır (11).

Genetik faktörler, meme kanserlerinin tahminen %5-10'undan sorumludur. Bu faktörler, 30 yaşından genç kadınlarda %25 oranında etkindir (11).

BRCA 1 ve 2 tümör supresör gen sınıfındadırlar. Her iki gen için de hastalığın oluşması için her iki alelin mutasyona uğraması gerekmektedir. Bu genlerin transkripsiyon, hücre siklusu ve DNA hasarı onarımı yollarında rol aldıkları düşünülmektedir (12).

BRCA 1 geni 17q kromozomu üzerinde yerleşmiş olup otozomal dominant geçiş özelliğindedir. BRCA 1 geni keşfedildikten sonra ailesel meme kanseri sendromlarının %40'ında mutasyonu saptandı. BRCA 1 ile ilişkili kanserlerin histopatolojisi BRCA 2 ile ilişkili kanserlere göre daha kötüdür (11). Bu genlerin mutasyonunu taşıyan kadın hastalarda ömür boyu meme kanseri gelişim riski %85'tir (12).

BRCA 1 ilişkili meme kanserleri genellikle invaziv duktal karsinomdurlar, diferansiasyonları azdır, hormon reseptörleri negatiftir ve çoğu zaman üçlü negatiflik mevcuttur (ER, PR ve HER-2 negatif), over kanseri gibi bazı kanserler ile birliktelikleri fazladır ve bilateral olma oranı sporadik vakalara göre daha yüksektir (12).

BRCA 2 geni 13q kromozomu üzerinde yer alır. Fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır. BRCA 1 gibi DNA hasarı onarımında ve hücre siklusunda rol aldığı düşünülmektedir. BRCA 2'nin şimdiye kadar 250 farklı mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon taşıyan hastalarda hastalık gelişim riski %85 olarak hesaplanmıştır (12).

#### **2.1.2.2. Reprodüktif nedenler**

Östrojen maruziyetini arttıran faktörler meme kanseri gelişme riskini arttırmaktadır. Erken menarş, geç menapoz, nulliparite gibi faktörler bu nedenden dolayı meme kanseri riskini arttırmaktadırlar. Menstruasyon sayısını azalttığından dolayı spor ve uzun süreli laktasyon periyodu, riski azaltmaktadır. (13)

### 2.1.2.3. Hormonal faktörler

Artmış östrojen maruziyeti meme kanserinin artışı ile ilişkilendirilmiştir, aynı zamanda maruziyetin azaltılması halinde bu riskte azalma olduğu düşünülmektedir (13).

Yapılan çalışmalarda postmenapozal östrojen replasman tedavisinin 4 yıldan fazla kullanılmasının meme kanseri riskini 3-4 kat arttırdığı gösterilmiştir. Chlebowski ve ark. çalışmalarında östrojen + progesteron terapisinin de riski arttırdığını gösterdiler (58).

Böcek zehiri, boyalar, kirleticiler ve gıda koruyucularını içeren, östrojen ile benzer etkileri olan kseno-östrojenlerin meme kanserinin etyolojisinde önemli bir role sahip olabileceği gösterilmiştir. Örnek olarak; PCB'nin (Polychlorinate biphenyl) katekol metabolizması ile karsinojenik östrojen metabolitlerini inhibe edip östrojen metabolizmasını değiştirdiği gösterilmiştir (14).

### 2.1.2.4. Çevresel faktörler

#### 2.1.2.4.1. Sigara

Sigara ve meme kanserine yatkınlık üzerine yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Meme kanserinin gelişme riskinin sigara içiciliği ile ilişkisinin zayıf olduğu bilinmektedir. Erken yaşlarda sigaraya başlayanlarda, fazla miktarda kullananlarda ve pasif içicilerde sigaranın zararlı etkileri gözlenmiştir (15). Öte yandan tütün dumanında bulunan bazı ajanlar antiöstrojenik etkilere sahiptirler. Örneğin; nikotinin CYP19 (Cytochrome P450 aromataze) enzimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle sigara kullananlarda menopoz kullanmayanlara göre daha erken gerçekleşmektedir (16).

#### **2.1.2.4.2. Besin faktörü**

Günlük alınan besinler çok sayıda doğal karsinojenler ve antikarsinojenler içerir. Bu maddelerin bir çoğu DNA hasarında rol oynayan oksijen radikalleri oluşumuna neden olur. Uzun süre yüksek yağ içeren diyetle beslenmek, serum östrojen seviyelerini arttırması nedeni ile kanser gelişimi ile ilişkilidir (13).

#### **2.1.2.4.3. Vücut ağırlığı**

Obezite ile meme kanseri arasında pozitif bir ilişki mevcuttur. Postmenapozal kadınlarda östrojenin ana kaynağı adipoz dokudaki androstenedionun östrojene çevrilmesidir. Obezite uzun süreli östrojen maruziyetine neden olmaktadır (13).

#### **2.1.2.4.4. Alkol**

Alkol meme kanseri oluşması riskini arttıran unsurlardan biri olarak belirtilmiştir. Alkolik kadınlarda yapılan çalışmada meme kanserine yakalanma riskinin %15 oranında arttığı gösterilmiştir (17).

Alkolün karsinojenik etkisinin mekanizması tam anlaşılmamıştır. Alkolün kullanımı kandaki estradiol seviyelerini yükseltmektedir (13). Bir diğer yaklaşım ise alkol ile indüklenen ROS'un (Reactive oxygen species) oluşması ve bundan ötürü detoksifikasyon enzimlerinin protein ekspresyonlarındaki azalmaları kapsamaktadır (18).

#### **2.1.2.4.5. Radyasyon**

Radyasyon maruziyetinin meme kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hodgkin lenfoma nedeni ile radyoterapi alan genç

kadınlarda meme kanseri riskinin 75 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Yine Japonya’da ikinci dünya savaşındaki nükleer saldırılardan kurtulnlarda meme kanseri gelişim oranı çok yüksek saptanmıştır. Meme dokusunun gelişim sürecinde olduğu adölesan dönemde radyasyona maruz kalınması bu riski daha da arttırmaktadır (13).

## **2.2. Kanser ve moleküler temeli**

Meme kanseri ve diğer tüm maligniteler, hücre büyümesi ve gelişimine etki eden önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok aşamalı bir süreç sonucu ortaya çıkar. Birçok genetik değişim sadece kanser dokusu hücrelerinde gözlenirken, daha az sıklıkla da germ hücrelerindeki genetik değişimler ile ortaya çıkan malignensiler kalıtsal özelliktedirler. DNA’daki bu kalıtsal veya kalıtsal olmayan değişimler, belli hücresel genlerin belirli özel değişimleri ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar onkogenler olarak adlandırılırlar.

Onkogenler normal fonksiyonlara sahip bir gen grubundan (protoonkogenlerden) gelişirler. Protoonkogenler hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan bazı proteinleri kodlarlar. Bir mutasyon sonucu protoonkogenin yapısı değişirse, hasar, genin dolayısı ile gen ürününün yapısının değişmesine neden olur, hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar ve kanser ortaya çıkar. Kanser oluşumunda, onkogenlerden başka önemli diğer bir gen grubu da tümör baskılayıcı genlerdir. Bu gen grupları karsinogeneizde zıt etkilidir. Onkogenler maligniteye neden olurken tümör baskılayıcı genler ise tümör oluşumunu engellerler. Eğer tümör baskılayıcı genlerde hasar olursa hücre büyümesi ve bölünmesinin kontrolü ortadan kalkacağı için malignensi gelişir (19, 20).

### **2.2.1. Meme kanserinde etkili onkogenler**

Onkogenler, aktivasyonları ile kanser gelişimine neden olan genlerdir. Onkogenlerin aktivasyonu, kodladıkları proteinlerin düzeylerinin aşırı yükselmesi şeklinde gerçekleşebilir. Meme kanserinde rol alan HER-2 (Human epidermal growth

factor receptor 2) buna örnek olarak verilebilir ki primer meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinde tespit edilmektedir. Bir diğer mekanizma ise nokta mutasyonlarla oluşan onkoproteinlerdir. Buna örnek olarak da kolon, pankreas ve akciğer kanserinde görülen RAS onkogeni verilebilir. Bir diğer mekanizma ise kromozomal translokasyondur (21).

Meme kanserinde hem normal hem de kanserli meme dokularında çoğunlukla saptanan bazı özel onkogenler ras, myc, c-erbB-2 (veya HER2/neu) ve p53 olarak sıralanabilir (22).

### 2.2.2. SIRT ailesi

Sirtüinler (SIRT) (silent mating type information regulation 2 homolog) metabolizma ve yaşlanma da dahil olmak üzere birçok hayati hücresel işlevleri kontrol edebilen NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide-adenine dinucleotide) bağımlı enzimlerdir (23-25). İlk sirtüin geni 1979 yılında Klar ve arkadaşları tarafından *Saccharomyces Cerevisiae* mayasında bulunmuş ve MAR1 ismi verilmiştir (26). Sirtüin ismi ise bu protein ailesine ilk kez SIRT1 ile SIRT 5 arasındaki 5 SIRT insan homologunu tanımlayan Roy Frye tarafından 1999 yılında verilmiştir (27).

Sirtüin grubu, Histon 3 deasetilazı (HDAC-III) olarak sınıflandırılmışlardır (28). Histon deasetilazlar (HDAC), histonların amino kuyruklarında bulunan lizin amino asitlerinden ve histon olmayan proteinlerden asetil gruplarını eksiltten enzimlerdir (29). Histonların deasetilasyonu kromatin faaliyetinin durmasına ve bu sayede gen ifadesinin baskılanmasına neden olur.

| Class | Isoform | Yeast counterpart | Size | Co-factor        | Location | Expression | Catalytic domain  |
|-------|---------|-------------------|------|------------------|----------|------------|-------------------|
| (I)   | HDAC1   | RPD3              | 58   | Zn <sup>++</sup> | N        | Ubiquitous | 482 aa            |
|       | HDAC2   |                   | 59   |                  | N        |            | 488 aa            |
|       | HDAC3   |                   | 50   |                  | N, C     |            | 428 aa            |
|       | HDAC8   |                   | 44   |                  | N        |            | 377 aa            |
| (IIa) | HDAC4   | HDA1              | 120  | Zn <sup>++</sup> | N, C     | Specific   | 1084 aa           |
|       | HDAC5   |                   | 130  |                  | N, C     |            | 1122 aa           |
|       | HDAC7   |                   | 110  |                  | N, C     |            | 952 aa            |
|       | HDAC9   |                   | 160  |                  | N, C     |            | 1011 aa           |
| (IIb) | HDAC6   | HDA2              | 160  | Zn <sup>++</sup> | N, C     | Specific   | 1215 aa           |
|       | HDAC10  |                   | 70   |                  | N, C     |            | (Inactive) 669 aa |
| (III) | SIRT1   | Sir2              | 120  | NAD <sup>+</sup> | N        | Variable   | 747 aa            |
|       | SIRT2   |                   | 45   |                  | C        |            | 389 aa            |
|       | SIRT3   |                   | 28   |                  | M        |            | 399 aa            |
|       | SIRT4   |                   | 35   |                  | M        |            | 314 aa            |
|       | SIRT5   |                   | 36   |                  | M        |            | 310 aa            |
|       | SIRT6   |                   | 39   |                  | N        |            | 355 aa            |
|       | SIRT7   |                   | 48   |                  | N        |            | 400 aa            |
| (IV)  | HDAC11  | RPD3/HDA1         | 39   | Zn <sup>++</sup> | N        | Ubiquitous | 347 aa            |

TRENDS in Microbiology

Şekil 1: I., II. ve III. Sınıf histon deasetilaz enzimleri (30)

### 2.2.2.1. Memeli sirtüinleri

Memelilerde sirtüin ailesi, keşfedilen yedi sirtüinden (SIRT 1-7) oluşmaktadır (Şekil 1). Bu 7 memeli sirtüin'inin hücre içi dağılımları farklıdır; SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 ağırlıklı olarak çekirdekte, SIRT2 sitoplazmada SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 ise çoğunlukla mitokondride yer almaktadır (Tablo 1) (31).

Memeli sirtüinleri, çok farklı hücresel işlevleri etkileyebilmektedirler (32). Örnek olarak; hücre metabolizması, yaşlanma, kanser ve hücre yaşamı da dahil olmak üzere birçok işlevin düzenlenmesi sıralanabilir (Tablo1). SIRT1 ayrıca diyabet gibi hastalıkların metabolizmasında da etkilidir (33).

**Tablo 1:** SIRT ailesi genlerinin rol aldığı biyolojik olaylar ve ilişkiye girdiği proteinler.

(34)

|              | <b>YERLEŞİM<br/>YERİ</b> | <b>ETKİLEŞİMLERİ</b>         | <b>BİYOLOJİK<br/>ROLÜ</b>              | <b>EKSİKLİĞİNDE<br/>GÖZLENENLER</b>                |
|--------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>SIRT1</b> | Hücre<br>çekirdeği       | FOXO, PGC-1a,<br>NF-kB, Ku70 | Metabolizma,<br>stres                  | Gelişimsel<br>kusurlar                             |
| <b>SIRT2</b> | Sitozol                  | Tubulin, H4,<br>FOXO         | Hücre döngüsü                          | Normal                                             |
| <b>SIRT3</b> | Mitokondri               | AceCS2, GDH                  | Termogenez                             | Normal                                             |
| <b>SIRT4</b> | Mitokondri               | GDH, IDE, ANT                | İnsülin<br>salınımı                    | Normal                                             |
| <b>SIRT5</b> | Mitokondri               | CPS1                         | Üre döngüsü                            | Normal                                             |
| <b>SIRT6</b> | Hücre<br>çekirdeği       | Histon H3, NF-kB             | Baz çıkarım<br>onarımı,<br>metabolizma | Erken yaşlanma                                     |
| <b>SIRT7</b> | Hücre<br>çekirdeği       | Pol 1                        | rDNA<br>transkripsiyonu                | Yaşam süresinin<br>kısılması, kalp<br>bozuklukları |

#### 2.2.2.1.1. Memeli sirtüinlerinin işlevleri

SIRT ailesinin etki ettiği en önemli mekanizmaların başında gen ifadesinin düzenlenmesi gelir (34). Histonların deasetilasyonu kromatinin yoğunlaşmasını (heterokromatin) ve bu sayede gen ifadesinin baskılanmasını sağlar (35).

Yedi memeli sirtüininden, hücre yaşamı ve apoptik yolların da dahil olduğu geniş çaplı hücresel süreçler içerisinde bir düzineden fazla bilinen ara ürünü ile SIRT1, en yaygın olarak çalışılan sirtüin çeşididir (36).

Genel olarak östrojen reseptörü negatif olan meme kanserleri daha agresif olup kemoterapiye daha dirençlidirler (3). Saptanan bulgular, sirtinol ile SIRT1

inhibisyonunun hem östrojen pozitif hem de östrojen negatif meme kanserlerinde proliferasyonu etkin bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir.

Bununla beraber SIRT1'in bir tümör promoteri mi yoksa bir tümör supresörü mü olduğu da tartışılmıştır. Buna neden olarak;

- 1- İnsan kanser dokularında yüksek düzeylerde saptanması
- 2- Tümör supresörleri ve onkoproteinler üzerindeki aktivitesi
- 3- Hücre büyümesinin engellenmesi, hücre ölümü ve DNA onarımı üzerindeki etkisi
- 4- Ömür süresi ve kanser riski üzerindeki etkileri gösterilmektedir (37).

SIRT1'in insanda prostat kanseri (38), akut miyeloid lösemi (39) ve primer kolon kanserinde (40) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. SIRT1'in bu tür kanser dokularında yüksek oluşundan yola çıkılarak da onun tümör promoteri olduğu iddia edilmiştir (41). Tabi bu, SIRT1'in bu dokularda kanserin bir nedeni değil de bir sonucu olarak yüksek bulunma düşüncesini de ortaya çıkarmaktadır.

Bir diğer çalışmada da SIRT1'in glioblastoma, safra kesesi kanseri, prostat kanseri ve over kanseri gibi bazı kanser dokularında, normal dokulara oranla daha düşük oranlarda bulunabildiği gösterilmiştir (42). Yine bu çalışmada 44 meme kanserinde yapılan analizde, kanserli dokularda normal dokulara göre daha düşük SIRT1 ekspresyonu saptanmıştır (42).

SIRT1'in spesifik bir inhibitörle inhibe edilmesinin p53'ün hiperasetilasyonuna ve p53 ilişkili transkripsiyonun artmasına neden olduğu 2008'de yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (43).

Firestein ve ark. yaptıkları çalışmada APC+ (Adenomatous polyposis coli) ratlarda SIRT1'in overekspresyonunun kolon kanseri formasyonunda artma değil azalma ile sonuçlandığını gösterdiler. (44)

Wang ve ark. ise yaptıkları analizde BRCA-1 ilişkili meme kanserlerinde BRCA-1 ilişkisiz meme kanserlerine göre daha düşük SIRT1 düzeylerinin olduğunu gösterdiler (45). Çalışmanın devamında ise BRCA1'in SIRT1 promoterine bağlanarak onu hem protein hem de mRNA düzeyinde pozitif olarak regüle ettiğini ve BRCA1 kusurunun SIRT1 düzeylerinde düşüşle beraber BRCA1 mutant hücrelerde kanser transformasyonuna neden olabileceğini ifade ettiler.

Ayrıca bu çalışmada, BRCA1 mutant hücrelerde SIRT1 düzeyinin düzeltilerek fare nodlarına implantasyonunda, in-vitro olarak bu hücrelerin proliferasyonunda azalma ve in vivo olarak da bu hücrelerde tümör transformasyonunun inhibe olduğu gösterildi. Ek olarak SIRT1'i aktive eden resveratrolün uygulanması da apoptozisi uyararak tümör formasyonunu engellemektedir. Bu da SIRT1'in sadece BRCA ilişkili bir tümör supresörü olmadığını aynı zamanda resveratrol gibi bir SIRT1 aktivatörünün BRCA1 ilişkili meme kanserlerinde mükemmel bir hedeflenmiş tedavi olabileceğini de gösterdi (45).

#### 2.2.2.2 SIRT1 ve ilişkili mikro RNA'lar

miRNA'lar, kodlama yapmayan yaklaşık 23 nt RNA'lardır ki etkilerini translasyonu baskılayarak veya hedef mRNA'ları unstable hale getirerek gösterirler (46). miRNA'lar; proliferasyon, differansiasyon, apoptozis gibi birçok önemli süreçte aktif rol oynarlar. Yapılan birçok çalışmada çeşitli mikro RNA'ların SIRT1 ile ilişkisi araştırılmıştır. Şu ana dek on altıdan fazla mikro RNA'nın meme kanseri ile ilişkili olduğu düşünülmüş ve bunu destekleyen çalışmalar yapılmıştır. Bu miRNA'lar, miRNA-449a, miRNA-449, miRNA-22, miRNA-200a, miRNA-34a, miRNA-143/145, miRNA-217, miRNA-195, miRNA-199a, miRNA-132, miRNA-181c, miRNA-9, miRNA-93, miRNA-181a/b, miRNA-204, miRNA-199b, miRNA-15a, miRNA-100 olarak sayılabilir (59).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Dokudan miRNA izolasyonu

Taze dokudan total RNA (miRNA içeren) izole etmek için miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı.

Kitin çalışma prosedürü şu şekilde işlemiştir:

1. Taze dokular yeterli miktarda lam üzerinde kesilerek uygun tüplere alındı.
2. Elde edilen doku parçaları -80°C 15-20 dakika boyunca muhafaza edilip, üzerine 400 µl QIAzol Lysis Reagent ve metal boncuk eklenip, doku parçalayıcı kullanılarak 15- 30 dk boyunca parçalandı.
3. Üç dakika boyunca 4°C’de 12.000 g’de santrifüj yapıp üst faz yeni bir tüpe alındı.
4. Tüpteki miktarın 1 katı (yaklaşık 400µl) 70% etanol eklenip, pipet ile iyice karıştırıldı.
5. En fazla 700 µl örnek 2 ml toplama tüpü içerisindeki RNeasy® Mini kolona yüklendi ve oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000 g’de santifuj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı atılıp, kalan örnek olduğunda işlem tekrarlandı.
6. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 700 µl Buffer RW1 çözeltisi eklenip, oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000 g’de santifuj uygulandı. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.
7. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona bu sefer 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklenip, yine oda sıcaklığında 15 sn boyunca

8000 g’de santrifüj uygulandı. (Not: Kullanmadan önce Buffer RWT ve RPE çözeltilerine %96-100 etanol eklendi.) Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.

8. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona tekrar 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklenip, oda sıcaklığında 2 dk boyunca 8000 g’de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.
9. Toplama tüpüne (1,5 ml) alınan RNeasy Mini kolona 30–50 µl RNase içermeyen su eklenip, oda sıcaklığında 1 dk boyunca 8000g’de santrifüj uygulandı. Toplama tüpündeki birikinti total RNA’yı (miRNA dahil) içermiş oldu. Elde edilen RNA’lar -80 °C’de saklamak üzere kaldırıldı.

### 3.2. miRNA’dan cDNA eldesi

1. cDNA (kalıp, complementary DNA)’lar, Qiagen miScript Reverse Transcription (RT) Kit II (Hilden, Almanya) kullanılarak sentezlendi.
2. Tablo 2’ye göre RT toplam karışımı buz üzerinde hazırlanıp, RNA’nın miktarı 20 µl hacim içerisinde 200ng/µl olacak şekilde ayarlandı.
3. RNA, RT karışımı içeren her bir tüpe eklendi. Kısa bir santrifüj edilip, buz üzerine tekrar bırakıldı.

Tablo 2: cDNA için bileşenler ve miktarları

| Bileşenler                         | Tepkime Hacmi                   |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 5x miScript HiSpec tamponu         | 2 µl                            |
| 10x miScript Nükleik asit karışımı | 1 µl                            |
| miScript Reverse Transcriptase Mix | 1 µl                            |
| RNaz içermeyen su                  | Değişken (ör: 6-x eklenir.)     |
| Kalıp RNA                          | Değişken (ör: x hacmi bulunur.) |
| <b>Toplam Hacim</b>                | <b>10 µl</b>                    |

37°C’de 60 dk, 95°C’de 5 dk olan tepkime koşullarına göre RT-PCR yapıldı. Sonrasında cDNA miktarları 50 ng/μl olacak şekilde ayarlanıp, qRT-PCR için kullanıma hazır hale getirildi. cDNA’ların kullanım ömrünü uzatmak için -80 C’de muhafaza edildi.

### 3.3. qRT-PCR (real time-pcr, gerçek zamanlı-pcr)

qRT-PCR için tepkime bileşenleri Qiagen miScript SYBR Green PCR kiti kullanılarak hazırlandı. Tablo 3’te bileşenler tepkime hacimlerine göre kullanıldı.

Tablo 3: qRT-PCR için kullanılan bileşenlerin oranları

| Bileşenler                                       | Hacim          |
|--------------------------------------------------|----------------|
| 2x QuantiTect SYBR Green PCR Toplam Karışım      | 6.25 μl        |
| 10x miScript Universal Primer                    | 1.25 μl        |
| 10x miScript Primer Assay (ilgili miRNA primeri) | 1.25 μl        |
| RNaz içermeyen su                                | 3,125 μl       |
| Kalıp cDNA (50ng/ul’den alındı. Sonuç 5 ng/μl)   | 0,63 μl        |
| <b>Toplam hacim</b>                              | <b>12.5 μl</b> |

Buz üzerinde tepkime bileşenleri hazırlandı ve uygun tüplere cDNA’lar ile dağıtılıp, qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) cihazına yüklendi. Tablo 4’te ki qRT-PCR tepkime koşullarına göre tespit işlemleri gerçekleştirildi.

**Tablo 4:** qRT-PCR Tepkime Koşulları

| Sıcaklık (°C) | Zaman(dk) |   |          |
|---------------|-----------|---|----------|
| 95            | 15        |   |          |
| 94            | 15        | } | 40 döngü |
| 55            | 30        |   |          |
| 70            | 30        |   |          |



#### 4. BULGULAR

Çalışmaya 2012-2016 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde meme kanseri nedeni ile opere edilen toplam 66 hasta dâhil edildi. (Tablo 5 ve Tablo 6) Operasyon esnasında bu hastaların kanser dokularından ve normal meme dokularından örnekler alınarak azot tanklarında muhafaza edilerek kayıt altına alındı. Toplam 132 doku örneği çalışmada kullanıldı.

Tablo 5: Hastalar hakkındaki istatistiksel bilgiler

|                        | Kadın                      | Erkek                       |              |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------|
| Cinsiyet               | 66                         | -                           |              |
|                        |                            |                             |              |
|                        | Kadın                      | Erkek                       | Tüm hastalar |
| Ortalama yaş           | 50.8                       | -                           | 50.8         |
|                        |                            |                             |              |
|                        | İnvaziv duktal<br>karsinom | İnvaziv lobuler<br>karsinom | Diğer        |
| Histopatolojik<br>tanı | 56 (%84,8)                 | 7 (%10,6)                   | 3 (%4,5)     |
|                        |                            |                             |              |
|                        | Östrojen (+)               | Progesteron (+)             | c-erb b2 (+) |
| Reseptör               | 50 (%75,7)                 | 49 (%74,2)                  | 24 (%36,3)   |
|                        |                            |                             |              |
|                        | Evre-1                     | Evre-2                      | Evre-3       |
| Hastalık evresi        | 5 (%7,5)                   | 31 (46,9)                   | 30 (45,4)    |

Tablo 6: Hasta bilgileri

|          | <b>Yaş</b> | <b>Histopatolojik tanı</b> | <b>Evre</b> | <b>ER</b> | <b>PR</b> | <b>C-ERB-B2</b> |
|----------|------------|----------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------------|
| hasta-1  | 63         | Metaplastik karsinom       | 3           | N         | N         | N               |
| hasta-2  | 57         | Duktal invaziv karsinom    | 1           | P         | N         | N               |
| hasta-3  | 36         | Duktal invaziv karsinom    | 2A          | P         | N         | N               |
| hasta-4  | 44         | Duktal invaziv karsinom    | 2A          | P         | N         | N               |
| hasta-5  | 44         | Duktal invaziv karsinom    | 2A          | P         | N         | N               |
| hasta-6  | 44         | Duktal invaziv karsinom    | 2A          | P         | N         | N               |
| hasta-7  | 48         | Duktal invaziv karsinom    | 2           | N         | P         | N               |
| hasta-8  | 50         | Duktal invaziv karsinom    | 2B          | P         | P         | N               |
| hasta-9  | 62         | Duktal invaziv karsinom    | 2           | P         | P         | N               |
| hasta-10 | 57         | Duktal invaziv karsinom    | 2A          | P         | P         | N               |
| hasta-11 | 62         | Duktal invaziv karsinom    | 2           | P         | P         | N               |
| hasta-12 | 62         | Duktal invaziv karsinom    | 2           | P         | P         | N               |
| hasta-13 | 55         | Duktal invaziv karsinom    | 3A          | P         | P         | N               |
| hasta-14 | 66         | Duktal invaziv karsinom    | 2B          | P         | P         | N               |
| hasta-15 | 35         | Duktal invaziv karsinom    | 2B          | P         | P         | N               |
| hasta-16 | 47         | Duktal invaziv karsinom    | 2           | P         | P         | N               |
| hasta-17 | 59         | Duktal invaziv karsinom    | 1           | P         | P         | N               |
| hasta-18 | 44         | Duktal invaziv karsinom    | 2           | P         | P         | N               |
| hasta-19 | 42         | Duktal invaziv karsinom    | 3A          | P         | P         | N               |
| hasta-20 | 42         | Duktal invaziv karsinom    | 3A          | P         | P         | N               |
| hasta-21 | 65         | Duktal invaziv karsinom    | 2B          | P         | P         | N               |
| hasta-22 | 59         | Duktal invaziv karsinom    | 3           | P         | P         | N               |
| hasta-23 | 49         | Duktal invaziv karsinom    | 2B          | P         | P         | N               |
| hasta-24 | 57         | Duktal invaziv karsinom    | 3           | P         | P         | N               |
| hasta-25 | 42         | Duktal invaziv karsinom    | 2           | P         | P         | N               |
| hasta-26 | 44         | Duktal invaziv karsinom    | 3B          | P         | P         | N               |
| hasta-27 | 44         | Duktal invaziv karsinom    | 3B          | P         | P         | N               |
| hasta-28 | 44         | Duktal invaziv karsinom    | 3B          | P         | P         | N               |
| hasta-29 | 44         | Duktal invaziv karsinom    | 2           | P         | P         | N               |
| hasta-30 | 44         | Duktal invaziv karsinom    | 2           | P         | P         | N               |
| hasta-31 | 38         | Duktal invaziv karsinom    | 3           | P         | P         | N               |
| hasta-32 | 42         | Duktal invaziv karsinom    | 3           | P         | P         | N               |
| hasta-33 | 42         | Mikst (İDK + İLK)          | 2           | P         | P         | N               |
| hasta-34 | 69         | Lobuler invaziv karsinom   | 2           | P         | P         | N               |
| hasta-35 | 70         | Lobuler invaziv karsinom   | 2B          | P         | P         | N               |
| hasta-36 | 67         | Lobuler invaziv karsinom   | 3           | P         | P         | N               |
| hasta-37 | 56         | Lobuler invaziv karsinom   | 4           | P         | P         | N               |
| hasta-38 | 56         | Lobuler invaziv karsinom   | 4           | P         | P         | N               |
| hasta-39 | 42         | Lobuler invaziv karsinom   | 3           | P         | P         | N               |
| hasta-40 | 61         | Mikst (İDK + İLK)          | 3           | P         | P         | N               |
| hasta-41 | 78         | Duktal invaziv karsinom    | 1           | P         | P         | N               |

Tablo 6: Hasta bilgileri (devam)

|          |    |                          |    |   |   |   |
|----------|----|--------------------------|----|---|---|---|
| hasta-42 | 44 | Duktal invaziv karsinom  | 3C | N | N | P |
| hasta-43 | 44 | Duktal invaziv karsinom  | 3C | N | N | P |
| hasta-44 | 38 | Duktal invaziv karsinom  | 3B | N | N | P |
| hasta-45 | 48 | Duktal invaziv karsinom  | 3  | N | N | P |
| hasta-46 | 49 | Duktal invaziv karsinom  | 3B | N | N | P |
| hasta-47 | 48 | Duktal invaziv karsinom  | 3  | N | N | P |
| hasta-48 | 51 | Duktal invaziv karsinom  | 2A | N | N | P |
| hasta-49 | 48 | Duktal invaziv karsinom  | 3  | N | N | P |
| hasta-50 | 47 | Duktal invaziv karsinom  | 2A | P | N | P |
| hasta-51 | 35 | Duktal invaziv karsinom  | 3  | P | N | P |
| hasta-52 | 52 | Duktal invaziv karsinom  | 4  | N | P | P |
| hasta-53 | 45 | Duktal invaziv karsinom  | 2  | N | P | P |
| hasta-54 | 45 | Duktal invaziv karsinom  | 2  | N | P | P |
| hasta-55 | 60 | Duktal invaziv karsinom  | 3  | N | P | P |
| hasta-56 | 60 | Duktal invaziv karsinom  | 3  | N | P | P |
| hasta-57 | 84 | Duktal invaziv karsinom  | 3  | N | P | P |
| hasta-58 | 45 | Duktal invaziv karsinom  | 2  | P | P | P |
| hasta-59 | 44 | Duktal invaziv karsinom  | 2B | P | P | P |
| hasta-60 | 57 | Duktal invaziv karsinom  | 3A | P | P | P |
| hasta-61 | 52 | Duktal invaziv karsinom  | 1  | P | P | P |
| hasta-62 | 52 | Duktal invaziv karsinom  | 1  | P | P | P |
| hasta-63 | 62 | Duktal invaziv karsinom  | 2  | P | P | P |
| hasta-64 | 34 | Duktal invaziv karsinom  | 2b | P | P | P |
| hasta-65 | 34 | Duktal invaziv karsinom  | 2b | P | P | P |
| hasta-66 | 46 | Lobuler invaziv karsinom | 3C | P | P | P |

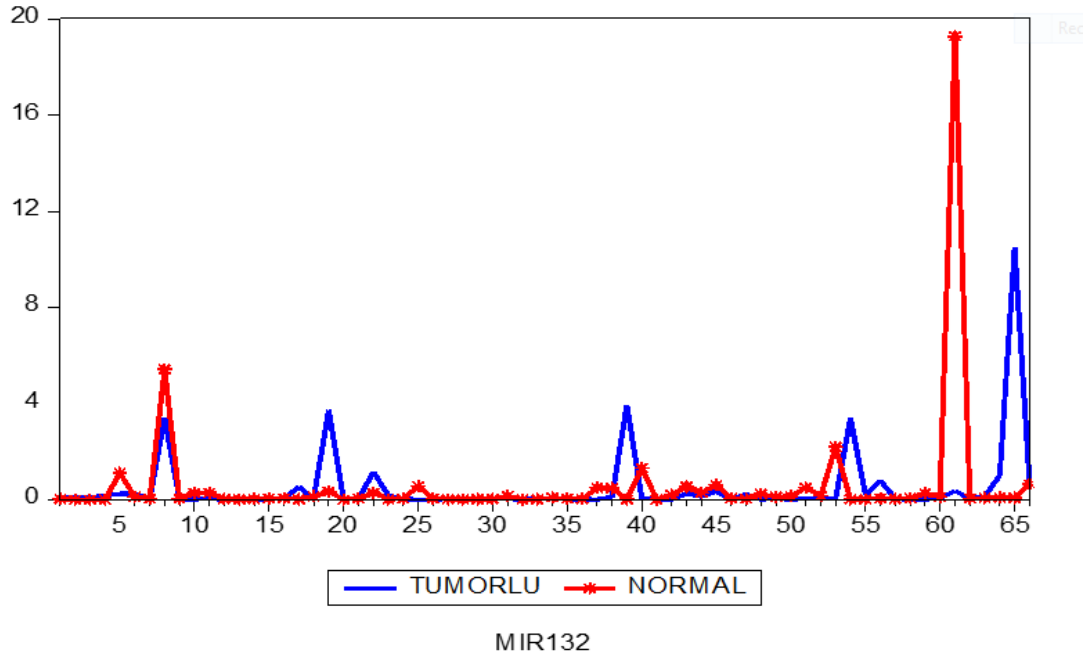
#### 4.1. miRNA-132 için bulgular

miRNA-132 için 66 hastadan alınan 132 doku örneğinde düzey analizi yapıldı. 66 hastanın 33'ünde tümör dokusunda miRNA-132 düzeyi normal dokuya göre azalmış, 11 hastada değişmemiş ve 22 hastada ise artmış olarak saptandı. Saptanan düzeyler, U6 (housekeeping gen) düzeyine oranlanarak normalize edildi. Normalizasyon için U6 kullanıldı. Normal ve tümörlü doku gruplarında  $2^{-\Delta C_t}$  metodu ile miRNA-132 ifade düzeyleri U6 ifade düzeyi ile kıyaslanarak bu genler için rölatif katsayı (fold change) değeri elde edildi. Her iki grup için normalizasyon yapıldıktan sonra veriler Student's T Testi ile analiz edildi.

Yapılan analizde meme kanserli 66 hastada miRNA-132 düzeyleri açısından meme kanserli dokular ile normal meme dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ( $p=0.42$ ) (Tablo 7 ve Şekil 2)

Tablo 7: Normal ve tümör dokusundaki miRNA-132 düzeylerinin U6'ya göre düzeltilmiş değerlerinin karşılaştırılması.

| <b>NORMALİZE EDİLMİŞ miRNA-132 DÜZEYLERİ İLE YAPILAN T-TESTİ ANALİZ SONUÇLARI.</b> |                     |                     |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|
|                                                                                    | <i>Normal Doku</i>  | <i>Tümör Dokusu</i> |
| Ortalama                                                                           | 0.498871773         | 0.568772895         |
| Varyans                                                                            | 2.310752339         | 6.014650874         |
| Gözlem                                                                             | 66                  | 66                  |
| Öngörülen Ortalama Farkı                                                           | 0                   |                     |
| df                                                                                 | 109                 |                     |
| <b>t Stat</b>                                                                      | <b>-0.196812861</b> |                     |
| <b>P(T&lt;=t) tek-uçlu</b>                                                         | <b>0.422170247</b>  |                     |



Şekil 2: Her bir hasta için tümörlü ve normal meme dokularında ölçülen miRNA-132 düzeyleri.

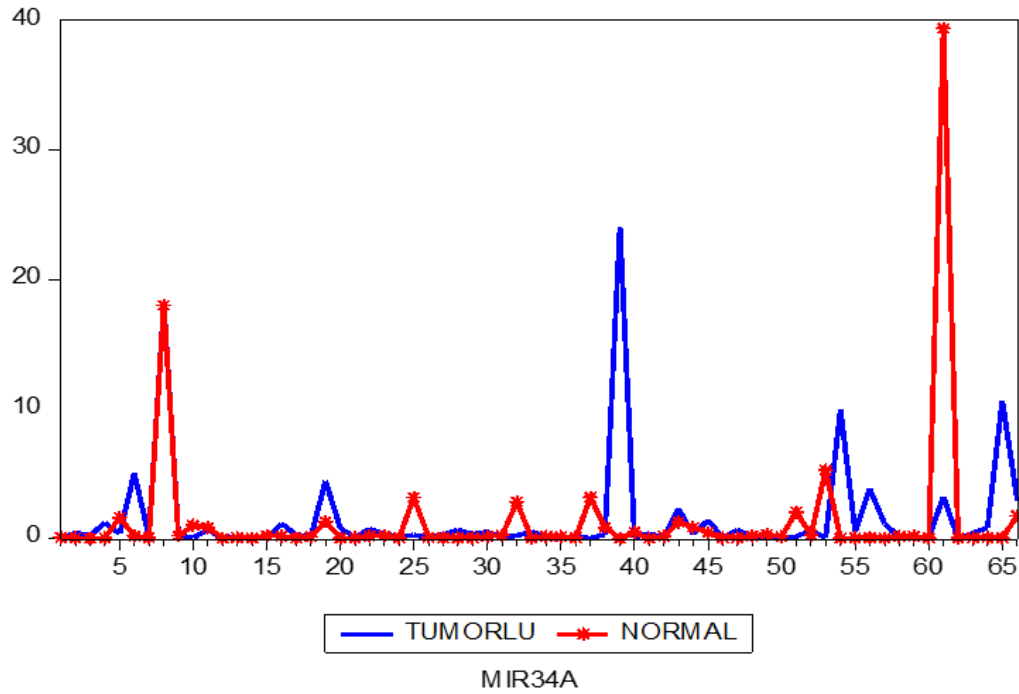
#### 4.2. miRNA-34A için bulgular

miRNA-34a için 66 hastadan alınan 132 doku örneğinde düzey analizi yapıldı. Bu 66 hastanın 20'sinde tümör dokusunda miRNA-34a düzeyi normal dokuya göre azalmış, 16 hastada değişmemiş ve 30 hastada ise artmış olarak saptandı. Saptanan düzeyler, U6 düzeyine oranlanarak normalize edildi. Normalizasyon için U6 kullanıldı. Normal ve tümörlü doku gruplarında  $2^{-\Delta Ct}$  metodu ile miRNA-34a ifade düzeyleri U6 ifade düzeyi ile kıyaslanarak bu genler için rölatif katsayı (fold change) değeri elde edildi. Her iki grup için normalizasyon yapıldıktan sonra veriler Student's T Testi ile analiz edildi.

Yapılan analizde meme kanserli 66 hastada miRNA-34a düzeyleri açısından meme kanserli dokular ile normal meme dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ( $p=0.39$ ) (Tablo 8 ve Şekil 3)

Tablo 8: Normal ve tümör dokusundaki miRNA-34a düzeylerinin U6'ya göre düzeltilmiş değerlerinin karşılaştırılması.

| <b>NORMALİZE EDİLMİŞ miRNA-34A DÜZEYLERİ İLE YAPILAN T-TESTİ ANALİZ SONUÇLARI.</b> |                    |                     |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|
|                                                                                    | <i>Normal Doku</i> | <i>Tümör Dokusu</i> |
| Ortalama                                                                           | 1.564416519        | 1.35568886          |
| Varyans                                                                            | 16.26777161        | 28.13214371         |
| Gözlem                                                                             | 66                 | 66                  |
| Öngörülen Ortalama Farkı                                                           | 0                  |                     |
| df                                                                                 | 121                |                     |
| <b>t Stat</b>                                                                      | <b>0.254484243</b> |                     |
| <b>P(T&lt;=t) tek-uçlu</b>                                                         | <b>0.399776731</b> |                     |



Şekil 3: Her bir hasta için tümörlü ve normal meme dokularında ölçülen miRNA-34a düzeyleri.

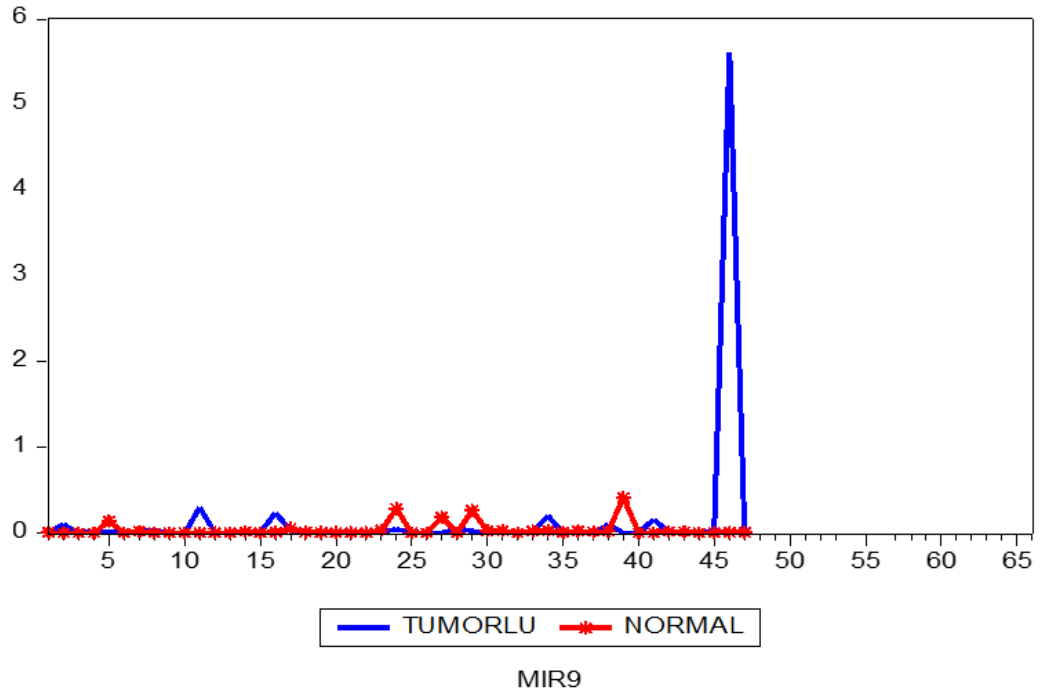
### 4.3. miRNA-9 için bulgular

miRNA-9 için 47 hastadan alınan 94 doku örneğinde düzey analizi yapıldı. (teknik nedenlerden dolayı 19 hasta bu grubun analizine alınamadı) 47 hastanın 24'ünde tümör dokusunda miRNA-9 düzeyi normal dokuya göre azalmış, 4 hastada değişmemiş ve 19 hastada ise artmış olarak saptandı. Saptanan düzeyler, U6 düzeyine oranlanarak normalize edildi. Normalizasyon için U6 kullanıldı.  $2^{-\Delta Ct}$  metodu kullanılarak normal ve tümörlü doku gruplarında miRNA-9 ifade düzeyleri U6 ifade düzeyi ile kıyaslanarak bu genler için rölatif katsayı değeri elde edildi. Her iki grup için normalizasyon yapıldıktan sonra veriler Student's T Testi ile analiz edildi.

Yapılan analizde meme kanserli 47 hastada miRNA-9 düzeyleri açısından meme kanserli dokular ile normal meme dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ( $p=0.17$ ) (Tablo 9 ve Şekil 4)

Tablo 9: Normal ve tümör dokusundaki miRNA-9 düzeylerinin U6'ya göre düzeltilmiş değerlerinin karşılaştırılması.

| <b>NORMALİZE EDİLMİŞ miRNA-9 DÜZEYLERİ İLE YAPILAN T-TESTİ ANALİZ SONUÇLARI.</b> |                    |                     |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|
|                                                                                  | <b>NORMAL DOKU</b> | <b>TÜMÖR DOKUSU</b> |
| Ortalama                                                                         | 0.150194972        | 0.036329229         |
| Varyans                                                                          | 0.668264404        | 0.007031406         |
| Gözlem                                                                           | 47                 | 47                  |
| Öngörülen Ortalama Farkı                                                         | 0                  |                     |
| df                                                                               | 47                 |                     |
| <b>t Stat</b>                                                                    | <b>0.949937406</b> |                     |
| <b>P(T&lt;=t) tek-uçlu</b>                                                       | <b>0.173501725</b> |                     |



Şekil 4: Her bir hasta için tümörlü ve normal meme dokularında ölçülen miRNA-9a düzeyleri.

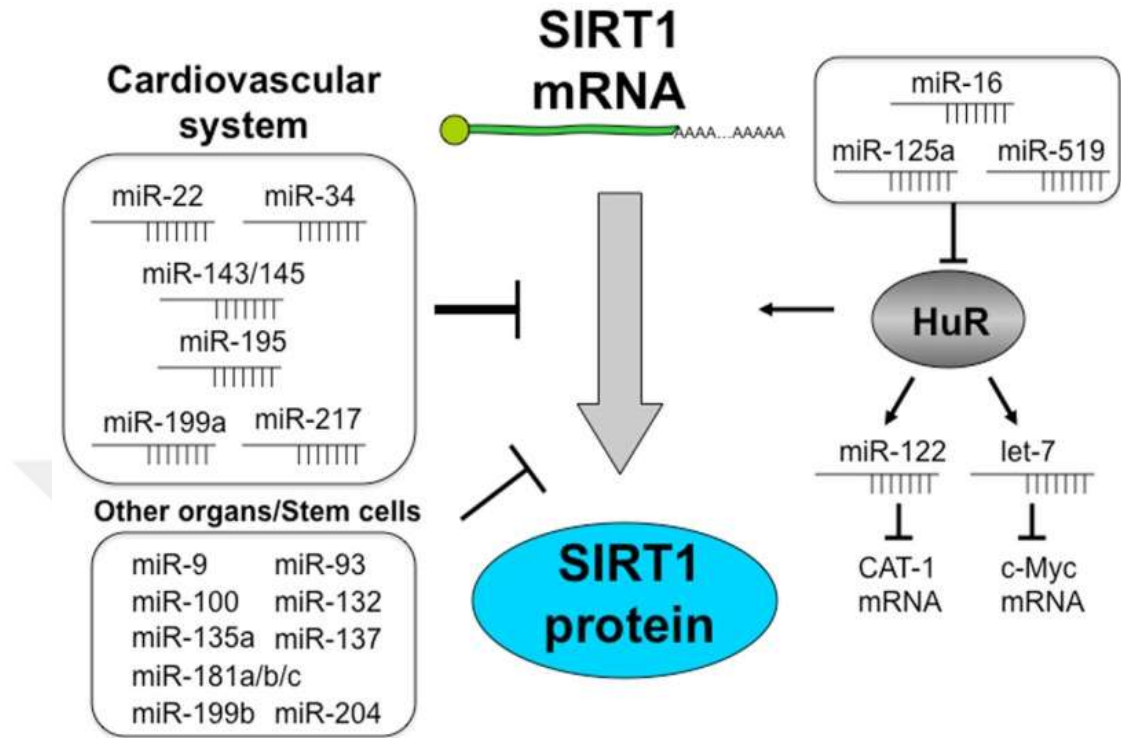
## 5. TARTIŞMA

Günümüzde özellikle kadın hasta grubunda çok önemli bir sağlık problemi olan ve halen ciddi mortalitelere yol açan meme kanserinin tedavisinde genetik çalışmaların yeni bir yol açabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla sıklıkla araştırılan enzimlerden biri sirtuin ailesinin üyelerinden biri olan SIRT1'dir. SIRT1'in dokudaki artmış veya azalmış düzeyleri ile birçok kanser türü arasında ilişkiler kurulmuş ve sınırlı sayıda terapötik girişimler denenmiştir.

SIRT1 araştırmalarının en önemli noktalarından birini şüphesiz SIRT1'in regülasyonu oluşturmaktadır. Dokulardaki SIRT1 düzeyini arttırmak veya azaltmak isteyen araştırmacılar bu etkiyi bazen bazı moleküllerin direkt uygulanması ile oluşturmuşlar bazen de SIRT1'i regüle eden, onunla ilişkili olduğu düşünülen mikro RNA'ların yardımı ile yapmışlardır.

Şimdiye dek SIRT1'i regüle eden birçok endojen ve eksojen faktör tanımlandı. Örneğin DBC geni tarafından kodlanan protein, SIRT1'in doğal bir inhibitörüdür. Resveratrol ise, SIRT1'i düzenleyerek hücre ömrünü uzattığı keşfedilen ilk küçük moleküldür. Resveratrol'ün keşfinden sonra benzer moleküllerin bulunması için çalışmalar yapıldı ve örnek olarak SIRT1 üzerinden insülin sensitivitesini arttırdığı bulunan SIRT1720 bulundu.

SIRT1'in regülasyonunun sağlanması amacı ile yapılan araştırmalarda şu ana kadar 16'dan fazla miRNA'nın SIRT1 regülasyonunda görev aldığı gösterilmiştir. Bu miRNA'lar, miRNA-449a, miRNA-449, miRNA-22, miRNA-200a, miRNA-34a, miRNA-143/145, miRNA-217, miRNA-195, miRNA-199a, miRNA-132, miRNA-181c, miRNA-9, miRNA-93, miRNA-181a/b, miRNA-204, miRNA-199b, miRNA-15a, miRNA-100 olarak sayılabilir. Tüm bunlar içerisinde en çok miRNA-34a üzerinde çalışılmıştır. (33) (Şekil 5)



Şekil 5: SIRT1'in miRNA'lar ile regülasyonu. miRNA'ların SIRT1'in ekspresyonunu ve fonksiyonlarını direkt olarak veya HuR üzerinden düzenlediğini gösteriyor. miRNA-22, miRNA-34, miRNA-143/145, miRNA-195, miRNA-199a ve miRNA-217 vasküler dokuda önemli miktarda bulunmaktadır ve SIRT1 proteinini kontrol etmektedir. SIRT1 16'ten fazla miRNA tarafından düzenlenmektedir (47).

Literatürde SIRT1'in regülasyonunda görev alan mikro RNA'lar ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, mikro RNA'ların çeşitliliği ve birçok farklı dokuda bulunup bu dokularda önemli roller üstlenmeleri, bu çalışmaların belirli bir alana odaklanmasını engellemiştir. Bu nedenle bu çalışmada analiz edilen miRNA-9, miRNA-34a ve miRNA-132 mikro RNA'larının meme kanseri dokularındaki düzeyleri ile ilgili oldukça az sayıda çalışma mevcuttu.

Bu çalışmada SIRT1 ile ilişkili olduğu düşünülen üç mikro RNA üzerinde çalışıldı: miRNA-132, miRNA-34a ve miRNA-9. Çalışmada meme kanseri ilişkisini sorgulanan miRNA'lardan miRNA-34a'nın, karaciğer yağ metabolizmasında, b-hücre ergositozunda ve hücre apoptozisinde rol aldığı gösterilmiştir. miRNA-132'nin stress

kaynaklı kemokin üretiminde görev alırken miRNA-9'un ise insülin salınımında rol aldığı gösterilmiştir (47).

miRNA34a'nın birçok organın kanser dokusunda düşük düzeylerde bulunduğu gösterilmiştir (48). Bir diğer çalışmada endotel hücrelerinde bu mikro RNA'nın ekspresyonunun oldukça arttığı ve SIRT'i hedefleyerek onun düzeyini azalttığı gösterilmiştir (56). Prostat kanserli dokularda yapılan bir analizde de yine bu miRNA'nın azalmış düzeyleri gösterilmiştir (57). Hepatosellüler kanser hastalarında yapılan bir araştırmada miRNA-34a'nın FXR reseptörleri (Farnesoid X receptor) ile inhibe edilebildiği ve bunun sonucunda SIRT1'in pozitif regülasyonunun sağlanabildiği gösterildi. Sadece bir çalışmada miRNA-34a'nın meme kanserli dokularda, normalden daha düşük seviyelerde bulunduğu gösterilmiştir ve bunun düzeltilmesinin meme kanserinde radyoterapiye cevabı artırabileceği önerilmiştir (49).

miRNA-9'un birçok kanser dokusunda düşük düzeylerde saptanmasına rağmen onu bir tümör supresörü ya da kanserojen bir miRNA olarak sınıflamak henüz mümkün değildir. Beyin tümörlerinde artmış (50); metastazı olan meme kanserinde, hepatocellüler kanserde, gastrik karsinomda, over kanserinde ve malign melanomda ise düşük olarak saptanmıştır (51). Diğer yandan miRNA'nın epigenetik inaktivasyonu da meme kanseri, kolorektal kanser ve böbrek hücreli karsinomda saptanmıştır (52). Meme kanseri ile miRNA-9 ilişkisi üzerine yapılmış spesifik bir çalışmada da yine tümör dokularında, normal dokulara göre daha düşük miRNA-9 düzeyleri saptanmıştır (53).

miRNA-132'nin pankreas kanserinde artmış düzeyleri gösterilmiştir. Meme kanseri ile ilgili yapılan incelemelerde ise bu mikro RNA, in-situ meme kanseri dokularında düşük olarak saptanmış ve onun bir tümör supresör olarak davrandığı şeklinde yorumlanmıştır (54). Yine bir başka çalışmada da benzer şekilde miRNA-132 düzeyi meme kanserli dokularda azalmış olarak saptanmıştır (55).

Bu sınırlı sayıdaki çalışmalar; her üç mikro RNA'nın da düzeylerinin meme kanseri dokularında, normal meme dokusuna göre daha düşük düzeylerde saptandığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada ise her üç mikro RNA için de normal meme dokusu ve meme kanseri dokuları arasında bu mikro RNA'ların düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

SIRT1 enzimi ile ilgili çelişkili ve eksik bilgilerin var olması, literatür ile uyumlu olmayan bir sonucun bizi şaşırtmamasına neden oldu. SIRT1 ve onu regüle eden mikro

RNA'ların mekanizmalarının net bir şekilde aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılacak çalışmalarda mikro RNA düzeyleri ile eş zamanlı olarak SIRT1'in kendi ifade düzeylerinin de tespit edilmesi bu konuda aydınlatıcı olabilir. SIRT1'in düşük düzeylerine karşın bu mikro RNA'ların normal seviyelerde oluşu veya SIRT1'in yüksek seviyelerine karşın bu mikro RNA'ların seviyelerinin normal olarak kalması SIRT1 ile bu mikro RNA'lar arasındaki ilişki için daha aydınlatıcı veriler sağlayabilir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hemen tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanserinin de etyolojisinde genetiğin yadsınamaz bir belirleyiciliği vardır. Bu yönde yapılan çalışmalar neticesinde meme kanserine neden olan çok sayıda gen mutasyonu ortaya konulmuştur. Bundan sonraki aşamada çalışmalar artık etyoloji ve mekanizmanın ortaya konulması ile beraber genlerin ifadelerinin düzenlenmesi ile yeni tedavilerin geliştirilmesine de yönelmiştir. Bu amaçla üzerinde çokça çalışılan alanlardan biri de Histon 3 deasetilaz'lardan olan SIRT1 enzimidir.

SIRT1 ile meme kanseri arasında birçok çalışmada ilişki bulunmuştur. SIRT1'in çeşitli moleküllerle regüle edilmesi ile tedavi edici yaklaşımlar da denenmiştir. Hayvan dokuları üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda kanser dokularında regresyon izlendiği de rapor edilmektedir, ancak çalışmalar henüz insan deneyleri için yeterli kanıt düzeyine ulaşmamıştır.

SIRT1'in direkt regülasyonuna alternatif olarak, SIRT1'in onunla ilişkili miRNA'lar üzerinden regüle edilmesi de denenebilecek bir yöntemdir. Yapılan kısıtlı çalışmalarda bu amaçla meme kanseri ile ilişkisi olduğu düşünülen miRNA-9, miRNA-34a ve miRNA-132 mikro RNA'larının meme kanseri dokusundaki düzeyleri incelenmiş ve normal dokulara göre düşük olduğu saptanmıştır.

Bu amaçla bu tez çalışmasında, belirtilen 3 mikro RNA'nın merkezimizde opere edilen meme kanseri hastalarında, kanser ve normal meme dokusundaki düzeylerinin farkı araştırıldı. Bu mikro RNA'ların meme kanseri dokularında düşük düzeylerde saptandığını belirten çalışmalar olmasına rağmen bizim çalışmamızda 66 meme kanseri hastasında meme kanseri ve normal dokular arasında, miRNA-9, miRNA-34a ve miRNA-132 mikro RNA'larının düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Araştırmalar arasındaki bu farklılıklar, bu konuda daha fazla çalışma yapılmasının gerekliliğini gl bir şekilde belirtmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Globocan 2012. Fast Stats. Most frequent cancers: both sexes. Available from [http://globocan.iarc.fr/old/bar\\_sex\\_site\\_prev.asp?selection=3152&title=Breast&statistic=3&populations=6&window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&submit=%C2%A0Execute%C2%A0](http://globocan.iarc.fr/old/bar_sex_site_prev.asp?selection=3152&title=Breast&statistic=3&populations=6&window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&submit=%C2%A0Execute%C2%A0)
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2016; 66:7.
3. Kuo SJ1, Lin HY, Chien SY, Chen DR. SIRT1 suppresses breast cancer growth through downregulation of the Bcl-2 protein. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23673452>
4. Sabiston textbook of surgery, The Biological Basis of Modern Surgical Practice. D. Beauchamp, B.M. Evers, Kenneth L. Mattox (17. edition). 2010:895
5. Schwartz's Principles of Surgery. F.Charles, D.K.Andersen, T.R.Billiar David, L.Dunn, J.G.Hunter (10. Edition) 2015:497
6. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. J Natl Cancer Inst 2011; 103:714.

7. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 2007; 356: 1670-4
  
8. Hoveer R. Breast cancer: geographic, migrant, and time-trend patterns In: Fortner JSP, Eds. *Accomplishments in cancer research*. New York: LippincottRaven, 1996; 11: 154-64
  
9. Schwartz's Principles of Surgery. F.Charles, D.K.Andersen, T.R.Billiar David, L.Dunn, J.G.Hunter (10. Edition) 2015:512
  
10. Schwartz's Principles of Surgery. F.Charles, D.K.Andersen, T.R.Billiar David, L.Dunn, J.G.Hunter (10. Edition) 2015:517
  
11. Sabiston textbook of surgery, The Biological Basis of Modern Surgical Practice. D. Beauchamp, B.M. Evers, Kenneth L. Mattox (17. edition). 2010:884
  
12. Schwartz's Principles of Surgery. F.Charles, D.K.Andersen, T.R.Billiar David, L.Dunn, J.G.Hunter (10. Edition) 2015:515
  
13. Schwartz's Principles of Surgery. F.Charles, D.K.Andersen, T.R.Billiar David, L.Dunn, J.G.Hunter (10. Edition) 2015:511
  
14. Garner CE, Burka LT, Etheridge AE, Matthews HB. Catechol metabolites of polychlorinated biphenyls inhibit the catechol-O methyltransferase-mediated metabolism of catechol estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 162: 115-12
  
15. Palmer J.R, Rosenberg L. Cigarette smoking and the risk of breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 145–156

16. Baron J.A, Vecchia C, Levi La F. The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women, *Am. J. Obstet. Gynecol* 1990; 162: 502–514
  
17. H. Kuper W, Ye, Weiderpass E, Ekblom A, Trichopoulos D, Nyren O, Adami H.O, Alcohol and breast cancer risk: the alcoholism paradox, *Br. J. Cancer* 2000 83: 949–951
  
18. Wright R.M, McManaman J.L, Repine J.E. Alcohol induced breast cancer: a proposed mechanism, *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26: 348–354
  
19. Lipman ME, Oncogenes and Supressor Genes In: Harris JR Disease of the Breast Eds., Morrow M, Lippman ME, Hellman S., Lippincott-Raven Publishers, Philadephia 1996:221-235
  
20. Gelmann EP. Oncogenes in human breast Cancer. In: The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases. Vol I. Ed:Bland KI, Copeland EM. WB saunders Company, USA, 1998:499-517.
  
21. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005;37(4):391-400.
  
22. Klijn M, Berns J, Schmits M, Foekens A. The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: A review on 5232 patients. *Endocr Rev* 1992; 13: 3-17

23. Kaeberlein M, McVey M., Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 1999;13(19):2570-2580.
24. Shore D, Squire M, Nasmyth KA. Characterization of two genes required for the position–effect control of yeast mating-type genes. *EMBO J.* 1984;(3):2817–2823.
25. Klentze M. Aging and Genes. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2008;28:52-61
26. Brittney Jung-Hynes, Russel J. Reiter, and Nihal Ahmad. Sirtuins, Melatonin and Circadian Rhythms: Building a Bridge between Aging and Cancer. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2948667/>
27. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007; 404 (1):1-13.
28. Vaquero A, Sternglanz R, Reinberg D. NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene.* 2007;26(37):5505-20.
29. Bora G: Histon deasetilaz inhibitör aktivitesinin florometrik yöntemle gösterilmesi. Yüksek lisans tezi. Hacettepe Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Ankara 2006.
30. Kotaro Shirakawa, Leonard Chavez, Shweta Hakre, Vincenzo Calvanese, Eric Verdine. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23517573>

31. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* 2007;404:1–13.
32. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, Cabo R, Sinclair DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004;3005:390–392
33. Lee J, Kemper JK. Controlling SIRT1 expression by microRNAs in health and metabolic disease. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689156/>
34. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273:793-798.
35. Dokmanovic M, Marks AP, Prospects: Histone deacetylase inhibitors, *J. Cell. Biochem.* 2005;96:293-304.
36. Bae NS, Swanson MJ, Vassilev A, Howard BH. Human histone deacetylase SIRT2 interacts with the homeobox transcription factor HOXA10. *J Biochem (Tokyo).* 2004;135(6):695-700.
37. Chu-Xia Deng. SIRT1, Is It a Tumor Promoter or Tumor Suppressor?. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631220/>
38. Huffman DM, Grizzle WE, Bamman MM. et al. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67:6612–6618.
39. Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R. et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes

selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*.2005;19:1751–1759.

40. Stunkel W, Peh BK, Tan YC. et al. Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol J*.2007;2:1360–1368.
41. Lim CS. SIRT1: Tumor promoter or tumor suppressor? *Med Hypotheses*. 2006;67:341–344.
42. Wang RH, Sengupta K, Li C. et al. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*. 2008;14:312–323.
43. Lain S, Hollick JJ, Campbell J. et al. Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. *Cancer Cell*. 2008;13:454–463.
44. Firestein R, Blander G, Michan S. et al. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS ONE*. 2008;3:e2020.
45. Wang RH, Zheng Y, Kim HS. et al. Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Mol Cell*. 2008;32:11–20.
46. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23; 116(2):281-97
47. Munekazu Yamakuchi. MicroRNA Regulation of SIRT1. *Front Physiol*. 2012; 3: 68. *AGING*, August2010, Vol. 2. No 8

48. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA: Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2007, 67: 2456-2468.
49. Kato M, Paranjape T, Müller RU, Ullrich R, Nallur S, Gillespie E, Keane K, Esquela-Kerscher A, Weidhaas JB, Slack FJ: The miRNA-34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in *C. elegans* and in vitro in human breast cancer cells. *Oncogene* 2009, 28: 2419-2424
50. Nass D., Rosenwald S., Meiri E., Gilad S., Tabibian-Keissar H., Schlosberg A., Kuker H., Sion-Vardy N., Tobar A., Kharenko O., Sitbon E., Lithwick Yanai G., Elyakim E., Cholak H., Gibori H., Spector Y., Bentwich Z., Barshack I., Rosenfeld N.(2009) MiRNA-92b and miRNA-9/9\* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors. *Brain Pathol.* 19, 375–383
51. Tan H. X., Wang Q., Chen L. Z., Huang X. H., Chen J. S., Fu X. H., Cao L. Q., Chen X. L., Li W., Zhang L. J. (2010) MicroRNA-9 reduces cell invasion and E-cadherin secretion in SK-Hep-1 cell. *Med. Oncol* 27, 654–660
52. Hildebrandt M. A., Gu J., Lin J., Ye Y., Tan W., Tamboli P., Wood C. G., Wu X. (2010) Hsa-miRNA-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* 29, 5724–5728
53. S. Duygu Selcuklu, Mark T. A. Donoghue, Kristina Rehmet,<sup>1</sup> Matheus de Souza Gomes,<sup>1</sup> Antoine Fort, Prasad Kovvuru, Mohan K. Muniyappa. MicroRNA-9 Inhibition of Cell Proliferation and Identification of Novel miRNA-9 Targets by Transcriptome Profiling in Breast Cancer Cells. Available from: <http://www.jbc.org/content/287/35/29516.full>

54. Shuai Lia, Huimin Mengb, Feng Zhoub, Lili Zhaia, Lina Zhangb, Feng Gua, Yu Fana, Ronggang Langa, Li Fua. MicroRNA-132 is frequently down-regulated in ductal carcinoma in situ (DCIS) of breast and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0344033812003305>
  
55. Zhan-Guo Zhang , Wei-Xun Chen , Yan-Hui Wu , Hui-Fang Liang , Bi-Xiang Zhang. MiRNA-132 prohibits proliferation, invasion, migration, and metastasis in breast cancer by targeting HN1. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X1401847>
  
56. Ito T1, Yagi S, Yamakuchi M. MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627091>
  
57. Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. Effects of miRNA-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18834855>
  
58. Rowan T. Chlebowski, MD, PhD; Susan L. Hendrix, DO; Robert D. Langer et.al. Influence of Estrogen Plus Progestin on Breast Cancer and Mammography in Healthy Postmenopausal Women. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=196804>
  
59. microRNA Target Prediction. [Cited 2016 April 16] Available from: <http://www.exiqon.com/microrna-target-prediction>

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Muhsin Elçi 1986 yılında Mersin’de doğdu. İlköğretimini Mersin’de tamamladıktan sonra 2004 yılında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde üniversite öğrenimine başladı. Mezun olduktan sonra 2011 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde Genel Cerrahi Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi doktor olarak çalışmaya başladı. Burada görev yaptığı süre boyunca “Karaciğer kist hidatiğinde 2008-2013 arası sonuçlarımızın ve cerrahi yöntemlerin değerlendirilmesi” isimli çalışması 19. Ulusal Cerrahi Kongresi’nde sözlü sunum oldu, “Multifocal Insulinoma in Pancreas and Effect of Intraoperative Ultrasonography” isimli katkı sağladığı makale Case Reports in Surgery dergisinde yayınlandı. “Periampuller bölge tümörlerinde sekiz yıllık pankreatikoduodenektomi deneyimimiz” isimli katkı sağladığı çalışma 2013 Cerrahi Kongresi’nde sözlü sunum olarak kabul edildi ve sunuldu. Katılım sertifikası aldığı toplantılar: 2015 Türk hepato-Pankreatiko-Bilier Cerrahi Derneği Gaziantep Bölgesel Toplantısı, Gaziantep Tıp Fakültesi 1. Ulusal Tıp Araştırma Görevlileri Kongresi ve 2012 Türkiye Organ Nakli Kuruluşları Koordinasyon Derneği 9. Kongresi. Muhsin ELÇİ halen Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi A.D’da araştırma görevlisi doktor olarak çalışmaktadır.

