

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİNDE miR-484'ÜN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Reyhan TAHTASAKAL**

**Danışman
Doç. Dr. Elif Funda ŞENER**

Doktora Tezi

**Temmuz 2022
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİNDE miR-484'ÜN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)**

**Hazırlayan
Reyhan TAHTASAKAL**

**Danışman
Doç. Dr. Elif Funda ŞENER**

**Bu araştırma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından TDK-2019-10918 nolu proje tarafından
desteklenmiştir. (Yök 100/2000 Moleküler onkoloji doktora
programı kapsamında burs almıştır)**

**Temmuz 2022
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Reyhan TAHTASAKAL

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“**Meme kanserinde miR-484’ün rolünün araştırılması**” adlı **doktora** tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Reyhan TAHTASAKAL

Danışman

Doç. Dr. Elif Funda ŞENER

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

KABUL VE ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Elif Funda ŞENER danışmanlığında **Reyhan TAHTASAKAL** tarafından hazırlanan “Meme kanserinde miR-484’ün rolünün araştırılması” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

...../...../.....

Jüri

İmza

Doç. Dr. Elif Funda ŞENER

Prof. Dr. Zühal HAMURCU

Prof. Dr. Mevlüde İNANÇ

Prof.Dr. Nilgün GÜRBÜZ

Dr. Öğretim Üyesi Didem KARAKAŞ ZEYBEK

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve

sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin hazırlanmasında bana destek veren, bilgi ve birikimiyle bana yardımcı olan ve çalışmalarımı yönlendiren tez danışmanım sayın Doç. Dr. Elif Funda ŞENER'e,

Tezimin var oluşunda büyük katkısı olan, engin bilgilerinden yararlandığım, tüm içtenliğiyle beni yönlendiren, sayın hocam Prof. Dr. Zühal HAMURCU'ya

Tezimin planlanmasından bitişine kadar her aşamada yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Mevlüde İNANÇ ve Doç. Dr. Abdullah Bahadır ÖZ'e ayrıca doku toplamamda çok yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı doktorlarından Uzman Dr. Mustafa BALLI ve Uzman Dr. Merve HAMURCU'ya

YÖK 100/2000 doktora programı Moleküler Onkoloji alanında doktora eğitimime başlamama vesile olan ve eğitimim boyunca burs veren YÖK 100/2000 proje yetkilileri ve kurumuna, bursiyeri olduğum BİDEB 2211A destek programı için TÜBİTAK'a ve TDK-2019-10918 nolu proje kodu ile tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

Tez çalışmalarımda yardımcı olan ekip arkadaşlarım Halime DANA, Şeyda Nur PİRENCİOĞLU, Emre TUĞHAN'a, ayrıca labaratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Araştırma görevlisi Venhar ÇINAR'a

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, her daim bana güvenip hep yanımda olan canım annem, babam ve kardeşlerime,

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen, zor zamanlarımı kolaylaştıran biricik eşim Mehmet TAHTASAKAL'a ve tabii ki bu sürecin gizli kahramanı canım oğlum Ali Asaf TAHTASAKAL'a tüm içten duygularıyla teşekkür ederim.

REYHAN TAHTASAKAL

TEMMUZ 2022, KAYSERİ

MEME KANSERİNDE miR-484'ÜN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Reyhan TAHTASAKAL

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Temmuz 2022

Danışman: Doç. Dr. Elif Funda ŞENER

ÖZET

Kanser, küresel olarak yaygın görülen ve yüksek mortalite oranına sahip en önemli sağlık sorunlarından biridir. Meme kanseri ise kadınlar arasında en sık görülen kanser olup, her yıl yaklaşık olarak 2,1 milyon kadını etkilemektedir ve kadınlar arasındaki ölümlerin en sık nedenlerindendir.

Hücrelerin apoptoza girme kabiliyetini bozan genetik veya epigenetik değişiklikler kanserin gelişmesine yol açmaktadır. Apoptozun bastırılması, hem kanserin başlamasında hem de ilerlemesinde kritik bir olaydır. Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak apoptozdan kaçış özelliği göstermektedir. Apoptozda intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere 2 yolak vardır. Bcl-2 intrinsik yolda görevli bir proteindir. Kaspazlar ise her 2 yolda da rol oynamaktadır. Bcl-2 proteinindeki dengesizlikler, kaspaz fonksiyonundaki azalmalar hücrelerin apoptozdan kaçarak kontrolsüz çoğalmasındaki etkenlerdendir.

miRNA'ların kanser hücrelerinde proliferasyon, invazyon, metastaz, apoptoz ve ilaç dirençliliği gibi birçok hücrel aktiviteyi düzenlediği bildirilmiştir. Kanser hücrelerinde bu yolların düzenlenmesinde rol alan miRNA'lardan birisi de miR-484 olarak gösterilmiştir. Ancak meme kanseri ve miR-484'ün ilişkisi tam olarak bilinmemektedir. Sunulan tez çalışmasında meme kanserli hastaların dokularında miR-484'ün olası rolü, miR-484'ün meme kanser hücrelerinde apoptoz yolağı ile ilişkisi ve miR-484'ün meme kanser hastalarında bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlandı. Bunun için 42 hastadan tümörlü ve sağlıklı doku örnekleri toplandı. Örnekler, histolojik derecelerine ve moleküler alt tiplerine göre sınıflandırıldı. Moleküler alt tiplerde ve farklı histolojik derecelerde miR-484 ekspresyon seviyesi analiz edildi. Sağlıklı dokulara göre tümörlü dokularda miR-484 ekspresyon seviyesi yüksek bulundu. Ayrıca evre ve agresiflik düzeyi arttıkça da miR-484 ekspresyon seviyesinin arttığı bulundu. Bu farkların da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Bu sonuçlar meme kanserinde miR-484'ün onkogen olarak davrandığını işaret etti. Ayrıca, anti-apoptotik olarak görev yapan Bcl-2 gen ve protein düzeyinde artış, apoptotik rol oynayan Casp3 ve Casp9'un gen ve protein düzeyinde azalma bulundu. miR-484 ekspresyon seviyesi ile anti-apoptotik Bcl-2

seviyesinin benzerlik göstermesi, miR-484'ün apoptotik yolda görev alan genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde rolü olduğunu ve onkogen olarak rol oynayabileceğini gösterdi. Bu sonuçlar tümörlü doku örneklerinde miR-484'ün ifade düzeyinin yüksek olması ve agresiflikle birlikte ekspresyonunun artışı meme kanserinde miR-484'ün bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri; Apoptoz; Casp3; Casp9; Bcl-2; miR-484



INVESTIGATION OF THE ROLE OF miR-484 IN BREAST CANCER

Reyhan TAHTASAKAL

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Medical Biology

Doctora Thesis, July 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Elif Funda ŞENER

ABSTRACT

Cancer is one of the most important health problems that is prevalent globally and has a high mortality rate. Breast cancer is the most common cancer among women and affects approximately 2,1 million women each year and is the most common cause of death among women.

Genetic or epigenetic changes that impair the cells' ability to undergo apoptosis lead to the development of cancer. Suppression of apoptosis is a critical event in both cancer initiation and progression. Cancer cells, unlike normal cells, show escape from apoptosis. There are two pathways in apoptosis, intrinsic and extrinsic. Bcl-2 is a protein involved in the intrinsic pathway. Caspases play a role in both pathways. Imbalances in Bcl-2 protein and decreases in caspase function are factors in the uncontrolled proliferation of cells by escaping apoptosis.

It has been reported that miRNAs regulate many cellular activities such as proliferation, invasion, metastasis, apoptosis and drug resistance in cancer cells. One of the miRNAs involved in the regulation of these pathways in cancer cells has been shown as miR-484. However, the relationship between breast cancer and miR-484 is not fully known. In the presented thesis, it was aimed to investigate the possible role of miR-484 in tumor and healthy tissues adjacent to tumor tissue from breast cancer patients, the relationship of miR-484 with apoptosis pathway in breast cancer cells, and the usability of miR-484 as a biomarker in breast cancer patients. For this, tumor and healthy tissue samples were collected from 42 patients. Samples were classified according to their histological grade and molecular subtypes.

miR-484 gene and protein expression level in molecular subtypes and different histological grades were analyzed. miR-484 expression level was found to be higher in tumor tissues compared to healthy tissues. It was also found that miR-484 expression level increased as the stage and aggressiveness level increased. These differences were also found to be statistically significant. These results indicated that miR-484 acts as an oncogene in breast cancer. In addition, an increase in anti-apoptotic Bcl-2 gene and protein levels, and a decrease in gene and protein levels of apoptotic Casp3 and Casp9 were found. The similarity between miR-484 expression level and anti-apoptotic Bcl-2 level showed that miR-484 has a role in regulating the expression of genes involved in the apoptotic pathway and may play a role as an

oncogene. In addition, the high expression level of miR-484 in tumor tissue samples and the increased expression with aggressiveness showed that miR-484 can be used as a biomarker in breast cancer.

Keywords: Breast Cancer; Apoptosis; Casp3; Casp9; Bcl-2; miR-484.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Meme Kanseri	4
2.2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	4
2.2.2.Meme Kanseri Etiyolojisi.....	5
2.3. Meme Kanserinin Tipleri	5
2.3.1. Meme Kanserinin Histolojik Alt Tipleri	6
2.3.1.1.Noninvaziv (İn Situ) Meme Kanseri.....	7
2.3.1.1.1.Duktal Karsinom in Situ (DKİS)	7
2.3.1.1.2. Lobüler Karsinom İn Situ (LKİS).....	8
2.3.1.2. İnvaziv Meme Kanseri.....	8
2.3.1.2.1. İnvaziv Duktal Karsinom (İDK)	9
2.3.1.2.2. İnvaziv Lobüler Karsinom (İLK).....	9
2.3.1.2.3. Müsinöz Karsinom.....	9
2.3.1.2.4. Tübüler Karsinom	10
2.3.1.2.5. Medüller Karsinom	10
2.3.1.2.6. Papiller Karsinom	10
2.3.1.2.7. İnvaziv Kribriform Karsinom	10

2.3.1.2.8. Memenin Paget Hastalığı.....	11
2.3.1.2.9. Apokrin Karsinom	11
2.3.1.2.10. Metaplastik Meme Karsinomu (MMK).....	11
2.3.2. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri.....	11
2.3.2.1. Luminal A.....	12
2.3.2.2.Luminal B	13
2.3.2.3. Her 2 Zengin	13
2.3.2.4.Triple Negatif.....	14
2.4. Meme Kanserinde Evreleme	14
2.5. Meme Kanseri Tanı Yöntemleri.....	16
2.5.1. Mammografi	16
2.5.2. Meme Ultrasonografi.....	17
2.5.3. Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRG)	17
2.5.4. Positron Emisyon Tomografisi (PET)	17
2.5.5. Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi (SPECT).....	18
2.6. Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri	18
2.7. MikroRNA (miRNA'lar).....	20
2.7.1. miRNA biogenezi	21
2.7.2. miRNA ve Kanser	22
2.7.3. miRNA ve Meme Kanseri	23
2.7.4. miR-484.....	26
2.8. Apoptoz	27
2.8.1. Kaspazlar	29
2.8.1.1. Kaspaz 9.....	29
2.8.1.2. Kaspaz 3.....	29
2.8.1.3. BCL-2 (B Hücresi Lenfoma 2)	30
2.8.2. Apoptoz ve Kanser	30
3.GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Gereçler	32
3.2. YÖNTEM.....	35
3.2.1. Hasta Seçimi	36

3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması	37
3.2.3. Dokulardan RNA İzolasyonu	37
3.2.4. mRNA Ekspresyon Analizi	38
3.2.4.1. RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) eldesi	38
3.2.4.2. mRNA Ekspresyonu	39
3.2.5. miRNA Ekspresyon Analizi	40
3.2.5.1. RNA örneklerinden cDNA Eldesi	40
3.2.5.2. miRNA Ekspresyonu	41
3.2.5.3. Protein İzolasyonu ve Western Blot	42
3.2.6. İstatistik Analiz	44
4.BULGULAR	45
4.1. Ekspresyon Sonuçları	46
4.1.1. miR-484 Ekspresyon Profili	46
4.1.1.1. Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda miR-484 Ekspresyon Profili	46
4.1.1.2. Malign ve Benign Tanısı Almış Hastalarda Tümörlü ve Tümörlü Dokuya Komşu Sağlıklı Meme Dokusu Örneklerinde miR-484 Ekspresyon Bulguları	48
4.1.1.3. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplerinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokular Arasında miR-484 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması	48
4.1.1.4. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplerinde Tümörlü Dokular Aarasında miR-484 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması	49
4.1.1.5. Meme Kanserinde Malign ve Benign Tümörlü Dokularda miR-484 Ekspresyon Bulguları	52
4.1.1.6. Meme Kanserinde Tümörlü Dokuların Histolojik Derecelerinde miR-484 Ekspresyon Bulguları	53
4.1.1.7. Meme Kanserinde Yaş ve miR-484 Ekspresyon Seviyesi Arasındaki İlişki	55

4.1.2. Gen Ekspresyonu Bulguları.....	56
4.1.2.1. Meme Kanseri Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda <i>Bcl-2, Casp3, Casp9</i> Gen Ekspresyon Profili	56
4.1.2.1. Meme Kanseri Luminal A Moleküler Alt Tipinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda <i>Bcl-2, Casp3</i> ve <i>Casp9</i> Genlerinin Ekspresyon Profili.....	57
4.1.2.2. Meme Kanseri Luminal B Moleküler Alt Tipinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda <i>Bcl-2, Casp3</i> ve <i>Casp9</i> Genlerinin Ekspresyon Profili.....	58
4.1.2.3. Meme Kanseri Her2+ Moleküler Alt Tipinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda <i>Bcl-2, Casp3</i> ve <i>Casp9</i> Genlerinin Ekspresyon Profili.....	59
4.1.2.4. Meme Kanseri Triple Negatif Moleküler Alt Tipinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda <i>Bcl-2, Casp3</i> ve <i>Casp9</i> Genlerinin Ekspresyon Profili.....	60
4.1.2.5. Fibroadenom Alt Tipinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda <i>Bcl-2, Casp3</i> ve <i>Casp9</i> Genlerinin Ekspresyon Profili.....	61
4.1.3. miR-484 ile <i>Bcl-2, Casp3</i> ve <i>Casp9</i> Genleri Arasındaki Korelasyon Bulguları.....	62
4.1.4. <i>Bcl-2, Casp3, Casp9</i> Proteinlerinin Ekspresyon Seviyeleri	63
4.1.4.1. Meme Kanseri Moleküler Alt Tiplerde Tümörlü Dokularda <i>Bcl-2, Casp3</i> ve <i>Casp9</i> Protein Ekspresyon Bulguları	65
4.1.5. miR-484 ile İlişkili Sinyal Yolakları	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	70
6. KAYNAKLAR	77
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

AJJ	: Amerikan ortak kanser konseyi
BRCA1	: BReast CAncer 1
BRCA2	: BReast CAncer 2
Car t cell	: Kimerik antijen reseptör taşıyan taşıyan T hücreleri
CNS	: Merkezi sinir sistemi
DKİS	: Duktal karsinom in situ
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ECM	: Hücre dışı matriks
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
ER	: Endoplazmik retikulum
ER	: Östrojen reseptör
ERBB2(Her 2+)	: İnsan epidermal büyüme reseptör 2
GLOBOCAN	: Küresel Kanser Gözlem Verisi
HR	: Hormon Reseptör
İDK	: İnvaziv duktal karsinom
İKK	: İnvaziv kribriform karsinom
İLK	: İnvaziv lobüler karsinom
Ki-67	: Hücre proliferasyon düzenleyici
LKİS	: Lobüler karsinom in situ
M	: Metastaz
miRNA	: mikro RNA
MMK	: Metaplastik meme karsinom
MRG	: Manyetik rezonans görüntüsü

N	: Lenf nodu tutulma
Onko-miR	: Onkogenik mikroRNA
P53	: Tümör potein 53
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PR	: Progesteron reseptör
PTEN	: Protein tirozin fosfotaz ve tensin homologu
RISC	: RNA
SPECT	: Tek foton emisyon tomografisi/bilgisayarlı tomografi
T	: Tümörün boyutu
TME	: Tümör mikro ortamı
TRAIL	: TNF ilişkili apoptoz indükleyici Ligand
Ts-miR	: Tümör Supressör mikroRNA
μ l	: mikrolitre

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	TNM sınıflamasına göre Meme Kanseri evrelendirme.....	16
Tablo 2.	Onko-miR ve Ts-miR'ler arasındaki temel farklılıklar.....	23
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan cihazlar.	32
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.	33
Tablo 5.	Meme kanseri hastalarının özellikleri.	36
Tablo 6.	Klinik, histolojik ve patolojik verilere göre meme kanserli hastaların gruplandırılması.	45
Tablo 7.	Tümörlü ve sağlıklı meme doku örneklerinde miR-484 ekspresyon profili.....	47
Tablo 8.	Meme kanseri hastalarının histolojik derecelerine göre miR-484 profili. ...	53
Tablo 9.	Meme kanseri protein ekspresyonu çalışılan hasta listesi.	63
Tablo 10.	miR-484 için KEGG Yolak Analizi.....	68
Tablo 11.	miR-484 için GO Yolak Analizi.....	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Kanser hücrelerinin temel özellikleri	3
Şekil 2.	Meme kanseri alt tiplerinin sınıflandırılması.	6
Şekil 3.	Meme kanseri moleküler alt tipleri	12
Şekil 4.	Meme kanserinde tedavi yöntemleri.	18
Şekil 5.	miRNA Biyosentezi	22
Şekil 6.	Apoptoz intrinsik ve ekstrinsik yolak.....	27
Şekil 7.	Kanser ve hücre ölümünden kaçış yolları	31
Şekil 8.	Çalışma grubunun oluşturulması ve çalışmada izlenen basamakların özetlenmesi.....	35
Şekil 9.	Tüm hastaların tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı doku örneklerinde miR-484 ekspresyon bulguları.	48
Şekil 10.	Meme kanserinin moleküler alt tiplerinde tümörlü ve sağlıklı dokular arasında miR-484 ekspresyon bulguları.....	49
Şekil 11.	Tümörlü dokuda moleküler alt tiplerde miR-484 ekspresyon profilinin karşılaştırılması.	51
Şekil 12.	Meme Kanserinde (Kötü Huylu) Malign ve (İyi Huylu) Benign tümörlü dokularda miR-484 ekspresyon bulgularının karşılaştırılması.....	52
Şekil 13.	Tümörlü dokularda histolojik derecelerine göre miR-484 ekspresyon bulguları..	54
Şekil 14.	Meme kanserinde yaş ve miR-484 ekspresyon seviyesi arasındaki korelasyon	55
Şekil 15.	Meme kanseri tümörlü ve sağlıklı dokularda <i>Bcl-2</i> , <i>Casp3</i> ve <i>Casp9</i> gen ekspresyon bulguları	56
Şekil 16.	Meme kanseri Luminal A moleküler alt tipinde tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokularda.....	57
Şekil 17.	Meme Kanseri Luminal B moleküler alt tipinde tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokularda <i>Bcl-2</i> , <i>Casp3</i> ve <i>Casp9</i> genlerinin ekspresyon seviyesi ve birbirleriyle karşılaştırılması	58

Şekil 18.	Meme Kanseri Her 2+ moleküler alt tipinde tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokularda <i>Bcl-2</i> , <i>Casp3</i> ve <i>Casp9</i> genlerinin ekspresyon seviyesi ve birbirleriyle karşılaştırılması.....	59
Şekil 19.	Meme Kanseri Triple Negatif moleküler alt tipinde tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokularda <i>Bcl-2</i> , <i>Casp3</i> ve <i>Casp9</i> genlerinin ekspresyon seviyesi ve birbirleriyle karşılaştırılması.....	60
Şekil 20.	Meme Kanseri Fibroadenom grubunda tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokularda <i>Bcl-2</i> , <i>Casp3</i> ve <i>Casp9</i> genlerinin ekspresyon seviyesi ve birbirleriyle karşılaştırılması	61
Şekil 21.	miR-484 ile <i>Bcl-2</i> , <i>Casp3</i> , <i>Casp9</i> genleri arasındaki korelasyon bulguları .	62
Şekil 22.	Meme Kanseri Luminal A,Luminal B,Her2+,Triple negatif Moleküler alt tiplerinde ve fibroadenom grubumuzda <i>Bcl-2</i> , <i>Casp3</i> , <i>Casp9</i> ve beta aktin protein membran görüntüleri.....	64
Şekil 23.	Meme kanseri moleküler alt tiplerde tümörlü dokularda <i>Bcl-2</i> , <i>Casp3</i> ve <i>Casp9</i> protein ekspresyon bulguları ve gen ekspresyon bulgularıyla karşılaştırılması..	67
Şekil 24.	miR-484 KEGG Haet Map.....	68

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 3 evreye ayrılmıştır. Evre I ve Evre II “düşük evre” Evre III ise “yüksek evreli” kabul edilmiştir. Ayrıca tümörün histopatolojik özelliklerine göre meme kanseri Luminal A, Luminal B, Her2+, Triple negatif olmak üzere moleküler alt tiplere ayrılmıştır (Nascimento ve Otoni, 2020).

Meme kanserinin multifaktöriyel bir hastalık olması, heterojen olması ve kötü prognoz sergilemesi hastalarda tedaviyi zorlaştırmaktadır. Meme kanseri hastalarında cerrahi tedaviler, radyoterapi gibi lokal tedaviler ve kemoterapi, hormonal tedavi, hedefe yönelik tedaviler gibi geleneksel tedavi yöntemleri tercih edilmektedir. Ancak meme kanseri tedavisi için daha etkili tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Bou-Dargham ve ark., 2021).

mikroRNA’lar (miRNA) kanser hücrelerinde proliferasyon, invazyon, metastaz ve apoptoz gibi birçok hücrel aktiviteyi düzenlenmesinde görev alırlar. Kanser hücrelerinde bu yolların düzenlenmesinde rol alan miRNA’lardan biri de miR-484 olarak gösterilmiştir. miR-484’ün, bazı kanserlerde yüksek oranda eksprese edildiği ve onkogenik roller sergilediği (Li ve ark., 2017; Yang ve ark., 2016; Vecchione ve ark., 2013; Wang ve ark., 2019), buna karşılık bazı kanserlerde ise ekspresyonunun düşük olup tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Zare ve ark., 2018; Hu ve ark., 2017; Lu & Lu, 2015).

Kanser, apoptoz yokluğunun malign hücrelerin hayatta kalmasıyla sonuçlandığı durumlardan biridir. Apoptozun düzenlenmesinde intrinsik ve ekstrinsik çeşitli yollar rol oynamaktadır.

Bu yüzden sunulan tez çalışmasında, literatür verilerinden hareketle miR-484’ün meme kanserinin gelişiminde rolünün olabileceği, ayrıca miR-484’ün

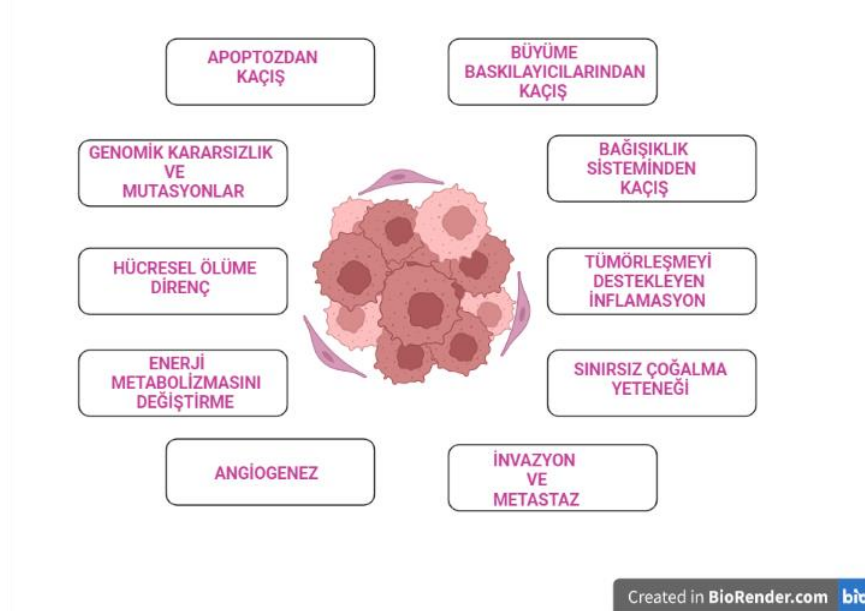
ekspresyonunun farklı kanserlerde farklı roller üstlenmesinden dolayı da iyi huylu-kötü huylu tümörde, meme kanserinin moleküler alt tiplerinde ve düşük-yüksek evre meme kanserindeki rolünün belirlenmesi amaçlandı.

Ayrıca sunulan tez çalışmasında, çeşitli meme kanser alt tiplerinde miR-484 ve apoptoz arasındaki olası ilişkiyi belirlemek için apoptozda görevli olan proteinlerden Bcl-2, Casp3 ve Casp9 ekspresyon seviyelerinin araştırılması amaçlandı. Böylece, meme kanserinin agresiflik kazanmasında miR-484'ün bir rolünün olup olmadığının açığa çıkartılması, Bcl-2, Casp3 ve Casp9 genlerini hedefleyip hedeflemediği belirlenmeye çalışıldı. Bunun için çalışmamızda meme kanseri tanısı almış 42 hastanın tümörlü ve sağlıklı doku örneklerinde miR-484'ün ekspresyon seviyesi, Bcl-2, Casp3 ve Casp9 gen ve protein ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR ve western blot ile analiz edildi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser normal hücrelerin düzenli büyüme ve çoğalmalarını sağlayan mekanizmalardan kaçarak kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla karakterize olan hastalık grubudur. Anormal çoğalmalarını primer tümörün bulunduğu yerden farklı bir yerde de göstermektedirler. Kanserler; kökenlerine, tümör kitlesinde bulunan hücrelerin heterojenitesine ve mutasyon durumuna göre farklı seviyede çeşitlilik gösterirler. Büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadan büyüebilme, sınırsız bölünme potansiyeli, apoptoz ve bağışıklık sisteminden kaçma, angiogenez, invazyon ve metastaz, genetik mutasyonlar, enerji metabolizmasını değiştirme gibi kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırt eden özellikleri vardır (Hanahan ve Weinberg, 2011; Senga ve Grose, 2021) (Şekil 1).



Şekil 1. Kanser hücrelerinin temel özellikleri (Biorender).

2.2. Meme Kanseri

Kanallar, lobüller veya aradaki doku gibi memenin farklı kısımlarında meydana gelen meme kanseri türleri vardır. Meme kanserinin tipi, etkilenen spesifik hücreler tarafından belirlenir. Meme kanserleri, hangi hücre orijininin tutulduğuna bağlı olarak, karsinomlar ve sarkomlar olmak üzere iki geniş sınıfa ayrılabilir. Karsinomlar, memenin lobülleri kaplayan hücrelerden ve süt yapmaktan sorumlu terminal kanallardan oluşan epitelyal bileşeninden kaynaklanan meme kanserleridir. Sarkomlar, memenin miyofibroblastları ve kan damarı hücrelerini içeren stromal bileşenlerinden kaynaklanan daha nadir bir meme kanseri formudur (primer meme kanserinin %1'i). Bu gruplar her zaman yeterli kategoriler değildir, çünkü bazı durumlarda tek bir meme tümörü farklı hücre tiplerinin birleşimi olabilir.

Çoğu meme kanseri karsinomdur. Büyük karsinomlar grubu içinde, birincil tümör bölgelerine göre invazivliklerine göre tanımlanan birçok farklı meme kanseri türü vardır. Her birinin farklı prognozları ve tedavi etkileri olduğu için çeşitli alt tipleri doğru bir şekilde ayırt edebilmek önemlidir (Feng ve ark., 2018).

2.2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

2020 Globocan verilerine göre dünyada 19,3 milyon kanser vakası vardır ve son 1 yıl içerisinde yaklaşık 10 milyon kanser ölümü meydana gelmiştir. Kanser dünyada en fazla morbidite ve mortalite nedenidir. Akciğer kanseri, tahmini 1.8 milyon ölümle (%18) kanser nedeni ölümlerin önde geleni olmaya devam ederken, bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8.3), mide (%7,7) ve meme kanseri (%6,9) izlemektedir. Meme kanseri en sık teşhis edilen kanser türüdür. Tüm kanser vakalarının %11,7 si, yaklaşık olarak 2,3 milyon kadardır. Bunu sırayla akciğer (%11,4), kolorektal (%10,0), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri izlemektedir (Sung ve ark., 2021).

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen kanser türüdür (Liang ve ark., 2020). Kadınlarda teşhis edilen kanserlerin %30'u meme kanseridir (Siegel ve ark.,2020). Erken teşhis ve tedavi yöntemlerindeki gelişmeler sağ kalımı artırmaktadır (Liang ve ark., 2020).

2.2.2.Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri birçok faktörden etkilenen kompleks bir hastalıktır. Genetik ve genetik olmayan faktörlerin meme kanseri gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir. *BRCA1*, *BRCA2* genindeki kalıcı mutasyonlar meme kanserinin %2,5'ünü oluşturmaktadır (Britt ark., 2020). *PTEN*, *ATM*, *p53* gen mutasyonları da riski artıran diğer genetik faktörler arasındadır. Cinsiyet, yaş, aile geçmişi, kalıtsal yatkınlık, menarşın erken olması, menopozun gecikmesi, ilk gebelik yaşının büyük olması ve düşük parite gibi üreme faktörleri meme kanseri riskini artırmaktadır. Ayrıca östrojen hormonu, yaşam tarzı, sigara ve alkol tüketimi, diyet, obezite gibi faktörlerde maligniteyi artırıcı etmenler arasındadır (Sun ve ark., 2017).

Risk Faktörleri;

Cinsiyet; Kadınların meme kanseri olma riski daha fazladır.

Yaş; Artan yaşla birlikte kansere yakalanma olasılığı da artar.

Aile Geçmişi; 1. derece akrabalarında meme kanseri bulunanlarda hastalığa yakalanma riski 2-3 kat artmıştır.

Erken Menarş; meme kanseri riskini artırır. Her 1 yıllık gecikme ise hastalığa yakalanma riskini %5 azaltır.

Geç Menopoz; meme kanseri riskini artırır. Her 1 yıllık gecikme, hastalığa yakalanma riskini %3 artırır.

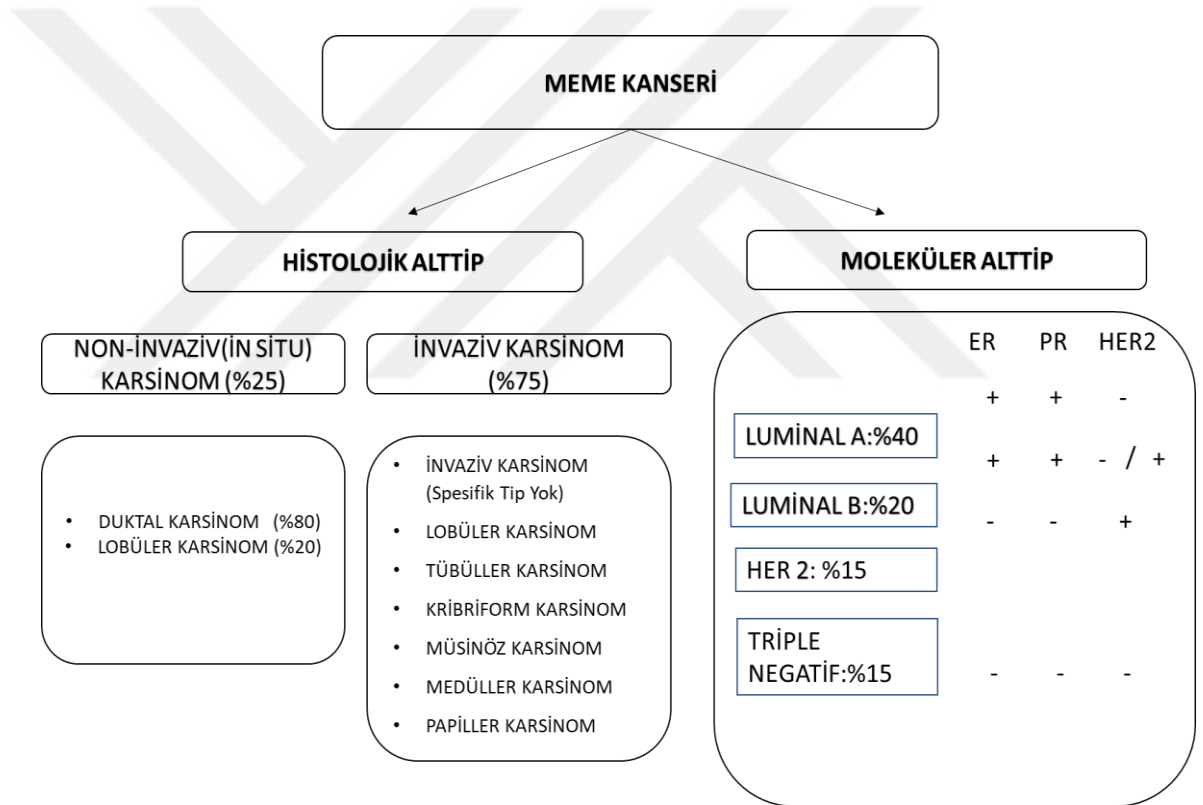
Doğum; Yaşamın daha ileriki yıllarında yapılan doğumlar kansere yakalanma riskini artırdığı gibi, her ek doğumda meme kanseri riskini %10 azaltmaktadır. Alkol tüketimi, diyet, obezite gibi faktörlerde maligniteyi artırıcı etmenler arasındadır (Sun ve ark., 2017).

2.3. Meme Kanserin Tipleri

Meme kanserleri değişken morfolojik ve biyolojik özelliklere sahiptir. Dolayısıyla farklı klinik davranış gösterir ve tedaviye farklı yanıt verir. Meme kanserinin sınıflandırılması hastalığın teşhisinin doğru koyulmasını ve tümörün davranışının nasıl olacağının tahmin edilmesini sağlar (Tsang ve Tse, 2020).

Meme kanserinin morfolojik çalışması için, tümörün memenin epitelyal bileşeniyle sınırlı olup olmadığını veya çevredeki stromayı istila edip etmediğini anlamalıyız ve bu tümörün meme kanallarında mı yoksa loblarda mı ortaya çıktığı ancak histopatolojik uygulamada tümörün hücre içindeki kesin konumundan ziyade alt sınıflamalarına ek olarak hücre tipi özellikleri, hücre sayısı, salgı tipi ve yerleşimi, immünohistokimyasal profil ve mimari özellikler tümörün çeşidinin ne olduğunu belirler (Nascimento ve Otoni, 2020).

Meme kanseri temel olarak histolojik ve moleküler alt tip olmak üzere 2 ana gruba ayrılmaktadır(Şekil 2).



Şekil 2. Meme Kanseri alt tiplerinin sınıflandırılması (Deshmukh ve ark., 2019).

2.3.1. Meme Kanserinin Histolojik Alt Tipleri

Histolojik olarak meme kanseri bazal membranla ilişkisine göre sınıflandırıldığında non invaziv (%25) ve invaziv (%75) olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır (Deshmukh ve ark., 2019).

2.3.1.1.Noninvaziv (İn Situ) Meme Kanseri

Meme Kanseri in situ; duktal karsinom in situ (DKİS) ve lobüler karsinom in situ (LKİS) olmak üzere 2 gruba ayrılır. İkisi arasındaki temel fark terminal kanal ve alveol tutulumunun kapsamı ve derecesidir (Alkabban ve Ferguson, 2022).

2.3.1.1.1.Duktal Karsinom in Situ (DKİS)

DKİS, aynı zamanda intraduktal karsinom olarak da adlandırılır, bazal membran içinde sınırlı anormal epitel hücrelerinin proliferasyonu ile karakterize, invaziv olmayan bir meme kanseridir. Bazal membran tabakasının bozulması, tanıyı DKİS'den invaziv meme kanserine dönüşmesini sağlar. DKİS, miyoepitelyal hücre bazal membranı ile sınırlı meme duktal-lobüler ünitesindeki epitel hücrelerinin klonal proliferasyonudur. Bu miyoepitelyal hücre tabakasına hapsedilmesi onu invaziv meme karsinomundan ayırır. İnvaziv meme kanseri için bir öncü olarak kabul edilir. Histolojik olarak DKİS, mimari özelliklere, nükleer dereceye ve/veya nekroz varlığına göre sınıflandırılır. DKİS, düşük, orta veya yüksek olarak belirlenen üç nükleer derece olarak sınıflandırılır. Düşük nükleer dereceli DKİS, tek tip boyut ve şekle sahip küçük hücreler ve göze çarpmayan nükleollerle karakterizedir. Yüksek nükleer dereceli DKİS, pleomorfik çekirdekli, belirgin nükleollü ve sık mitozlu büyük hücrelerden oluşur. Özellikler, düşük veya yüksek nükleer dereceli DKİS kriterlerini karşılamadığında orta nükleer dereceli DKİS dikkate alınır. Orta nükleer dereceli DKİS, nükleer boyut ve şekilde hafif ila orta derecede değişikliklere ve değişken miktarda mitoz ve belirgin nükleollere sahiptir.

Yüksek nükleer dereceli DKİS'nin invaziv meme kanserine dönüşme olasılığı daha yüksektir. Duktal karsinoma in situ en yaygın olarak ele gelen bir kitle olmadan ortaya çıkar ve en yaygın olarak tarama mamogramlarında bulunur. DKİS derecelendirmeye (grade) göre (düşük, orta, yüksek), histopatolojik yapısına göre (solid, papiller, mikropapiller ya da kribriiform), nekroz içerip içermemesine göre (komedo ve nonkomedo) sınıflandırılır (Tomlinson-Hansen ve ark., 2022).

Evre 0 meme kanseri (DKİS), meme kanallarının astarıyla sınırlı neoplastik meme hücreleri tarafından tanımlanır ve meme kanserinin invaziv olmayan bir aşaması

olarak kabul edilir. Bu nedenle uzak metastaz veya ölüm riski yoktur. %90'ından fazlası rutin tarama ile teşhis edilir (Haji ve Hurvitz, 2021).

2.3.1.1.2. Lobüler Karsinom In Situ (LKİS)

İn situ meme kanserinin diğer bir tipi de Lobüler Karsinom in situ (LKİS)'dur. LKİS'nin ilk tanımı 80 yıl öncesinde Foote ve Stewart tarafından yayınlanmıştır (Schnitt ve ark., 2020).

LKİS, yuvarlak ve oval şekilli, göze çarpmayan sitoplazmalı, polarize olmayan hücrelerin monomorfik, düzensiz bir proliferasyonudur. Hücre sınırları belirsizdir. Mitotik aktivite yoktur (Wen ve ark.,2018). En son DSÖ sınıflamasında, klasik LKİS, tip A ve/veya B epitel hücrelerinin proliferasyonu ile karakterize lezyonlarını tanımlamak için kullanılan terimdir. Tip A hücreler, tek tip hiperkromatik çekirdeklere sahip küçük hücrelerdir, B tipi hücreler ise boyut ve şekil olarak hafif değişkenlik gösteren ve küçük nükleollere sahip biraz daha büyük veziküler çekirdeklere sahiptir (Schnitt ve ark., 2020). LKİS; klasik lobüler karsinom in situ, Polimorfik lobüler karsinom in situ ve florid karsinom in situ olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. LKİS'in morfolojik alt tipleridir (Kuba ve ark., 2021). LKİS 45-50 yaş aralığında olan kadınlarda daha sık görülmektedir. Ortalama ortaya çıkma yaşı 49'dur. Çoğu kadının asemptomatik olduğu ve vakaların çoğunda rastgele muayene sonucunda ortaya çıkmaktadır. LKİS, invaziv meme karsinomunun hem bir risk faktörü hem de zorunlu olmayan bir öncüsü olarak kabul edilmektedir. İki taraflı ortaya çıkma eğilimindedir. LKİS; DKİS'den daha az yaygındır. Her ikisinde de genellikle hormon reseptörü pozitif ve Her2 negatiftir (Wen ve ark.,2018; Sokolova ve Lakhani, 2021).

2.3.1.2. İnvaziv Meme Kanseri

İnvaziv meme kanseri'nin en bilinen tipleri invaziv duktal karsinom (İDK) ve invaziv lobüler karsinom (İLK)'dur.

İDK, meme kanserinin en yaygın şeklidir. İnvaziv kanserlerin yaklaşık %50-70'ni oluşturmaktadır. İLK ise yaklaşık %10'u kadardır.

Bir de yeterli morfolojik özellik göstermeyen meme kanserinin alt tipleri vardır. Müsinöz karsinom, tübüler karsinom, medüller karsinom, papiller karsinom, kribriform karsinom, memenin paget hastalığı, apokrin karsinom ve metaplastik karsinom en yaygın görülen alt tiplerdendir (Alkabban ve Ferguson, 2022).

2.3.1.2.1. İnvaziv Duktal Karsinom (İDK)

İDK'ler 'spesifik tip yok' olarak sınıflandırılabilir çünkü bu tümörler karakteristik bir histolojik tip olarak belirlenmek için yeterli morfolojik özellikler göstermezler; ayrıca yeterli ayırt edici özellikler ve belirli hücrel ve moleküler davranış gösteriyorlarsa “özel tip” olarak kabul edilebilirler. İDK 'spesifik tip yok' olarak da bilinen en yaygın invaziv karsinomdur ve tüm invaziv meme karsinomlarının yaklaşık %50 ila %70'ini oluşturur (Alkabban ve Ferguson, 2022).

2.3.1.2.2. İnvaziv Lobüler Karsinom (İLK)

İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. İDK'dan sonra en sık görülen meme kanseri türüdür. Fibröz bir stroma içinde tek sıralı lineer bir modelde tek tek dağılmış veya organize edilmiş birbirleriyle yapışık olmayan hücrelerden oluşur. Hormon replasman tedavisi ve gelişmiş tanı tekniklerinin yaygın kullanımı nedeniyle son yıllarda özellikle menopoz sonrası bayanlarda İLK sayısında artış görülmektedir. İLK genellikle LKİS ile ilişkilidir (Wilson ve ark.,2021; Limaïem ve Ahmad, 2022).

2.3.1.2.3. Müsinöz Karsinom

Memenin müsinöz karsinomu, tüm meme karsinomlarının yaklaşık %2'sini oluşturan nispeten nadir bir meme kanseri alt tipidir. En son DSÖ meme tümörleri sınıflandırmasına göre, müsinöz karsinom, özel bir meme kanseri türü olarak sınıflandırılır. Tümörün hücreliliğine bağlı olarak müsinöz karsinomlar saf tip müsinöz karsinom ve karışık tip müsinöz karsinom olmak üzere 2 tiptedir. Saf tip, tümörün %90'ından fazlasında hücre dışı müsin üretimine sahip tümör dokusundan oluşurken, karışık form ayrıca müsin içermeyen bir duktal epitelyal bileşen içerir.

Müsinöz meme kanseri, düşük nüks oranı ve düşük lenf nodu metastazı insidansı ile olumlu bir prognoza sahiptir. Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR)

insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (ERBB2 eski adıyla Her2) ifadesinin olmaması ile karakterizedir (Limaem ve Ahmad, 2022).

2.3.1.2.4. Tübüler Karsinom

Memenin tübüler karsinomu, invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %1 ila 2'sini oluşturan belirgin, daha az agresif, düşük dereceli nadir görülen bir meme karsinomudur. Uzak metastaz yapma eğiliminin düşük olması nedeniyle olumlu bir prognoz taşır. Her yaş grubunda görülebilmesine rağmen ortalama başlangıç yaşı 54-60 arasındır. Postmenopozal kadınlarda görülme olasılığı yüksektir (Limaem ve Mlika, 2021). ER ve PR'nin yaygın ekspresyonuna sahiptir ve Her2 ekspresyonundan yoksundur (Jenkins ve ark., 2021)

2.3.1.2.5. Medüller Karsinom

Aksillar lenf düğümlerinde düşük tutulum oranlarıyla ilişkili invaziv karsinom tipidir. Daha iyi klinik sonuç verir. Tüm vakaların yaklaşık %3-5'inden sorumludur. *BRCA* geninde mutasyon görülmektedir. Genellikle 30-40'lı yaşlarda hastaları etkiler (Nascimento ve Otoni, 2020). Hastaların çoğunda tek taraflıdır. Ancak aile öyküsü varsa çift taraflıdır. ER, PR ve Her2 ifadesinin üçününde negatifliği ile karakterizdir. Triple negatif meme kanseri olarak sınıflandırılır (Jenkins ve ark., 2021).

2.3.1.2.6. Papiller Karsinom

Bu Meme Kanseri türleri genişlemiş kanallardan ve miyoepitelyal hücre içermeyen fibrovasküler çekirdekli papiller yapılar içeren kistlerden oluşur. Papiller meme kanserleri nadirdir. Teşhis edilen tüm meme kanserlerinin yaklaşık %0.5'ini oluşturur. En sık menopoz sonrası kadınlarda görülür. Çoğunlukla meme ucunun altında bulunan anormal meme kitlesi ile birlikte kanlı meme başı akıntısını içerir. ER, PR ekspresyonu pozitifken, Her2 ekspresyonu eksikliği ile karakterizedir (Jenkins ve ark., 2021).

2.3.1.2.7. İnvaziv Kribriform Karsinom

İnvaziv kribriform karsinom (İKK), nadir görülen bir primer meme kanseri türüdür. Tüm meme kanserlerinin %0,4'ünü oluşturmaktadır. İlk defa 1983 yılında ayrı bir histolojik tip olarak Page ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır. İyi prognoza

sahiptir. ER, PR hormon pozitifliği, Her2 ekspresyonu negatifliği ile karakterizedir (Jenkins ve ark., 2021).

2.3.1.2.8. Memenin Paget Hastalığı

Nadir görülen meme hastalıklarındandır. Tüm meme kanserlerinin %1-3'ü kadardır. Hem erkek hem de kadınlar etkilenebilmektedir. Bu hastalık meme başı ve areolada ortaya çıkmaktadır. Kırmızı kaşıntılı döküntü şeklindedir. Genellikle tek taraflıdır ve areola yerine hastalık önce meme başında görülmektedir. Bu da diğer cilt problemlerinden ayrımı sağlamaktadır (Akram ve ark., 2017).

2.3.1.2.9. Apokrin Karsinom

Sınırları kesin olarak belirlenmiş büyük atipik hücrelerin proliferasyonu, bol eozinofilik sitoplazma, büyük çekirdekler ve tümör hücrelerinin %90'ından fazlasında belirgin nükleoller ile karakterize nadir bir meme kanseri türü apokrin karsinomdur. Tüm meme malignitelerinin %4'ünü oluşturur. Apokrin karsinomlar, ER ve PR hormon negatifliği, androjen reseptörü (AR) ve brüt kistik hastalık sıvı protein-15'in (GCDFP-15) pozitifliği ile karakterizedir. Her2 ise pozitif ya da negatif olabilir. Her2 aşırı ekspresyonu apokrin karsinomların %50'sinde görülür. Her2 negatifliği ise apokrin karsinomlarda çok nadir görülen triple negatif apokrin karsinomdur (Ismail ve ark., 2021; Sun ve ark., 2020).

2.3.1.2.10. Metaplastik Meme Karsinomu (MMK)

1973 yılında Huvos ve ark tarafından ilk kez ortaya çıkmıştır. Metaplastik meme karsinom (MMK) nadir görülen meme karsinomudur. Tüm meme karsinomların yaklaşık %0,2-5'i kadarını oluşturur. MMK kötü prognoza sahiptir ve genellikle triple negatiftir. ER, PR ve Her2 hormonları negatiftir (Hasbay ve ark., 2019).

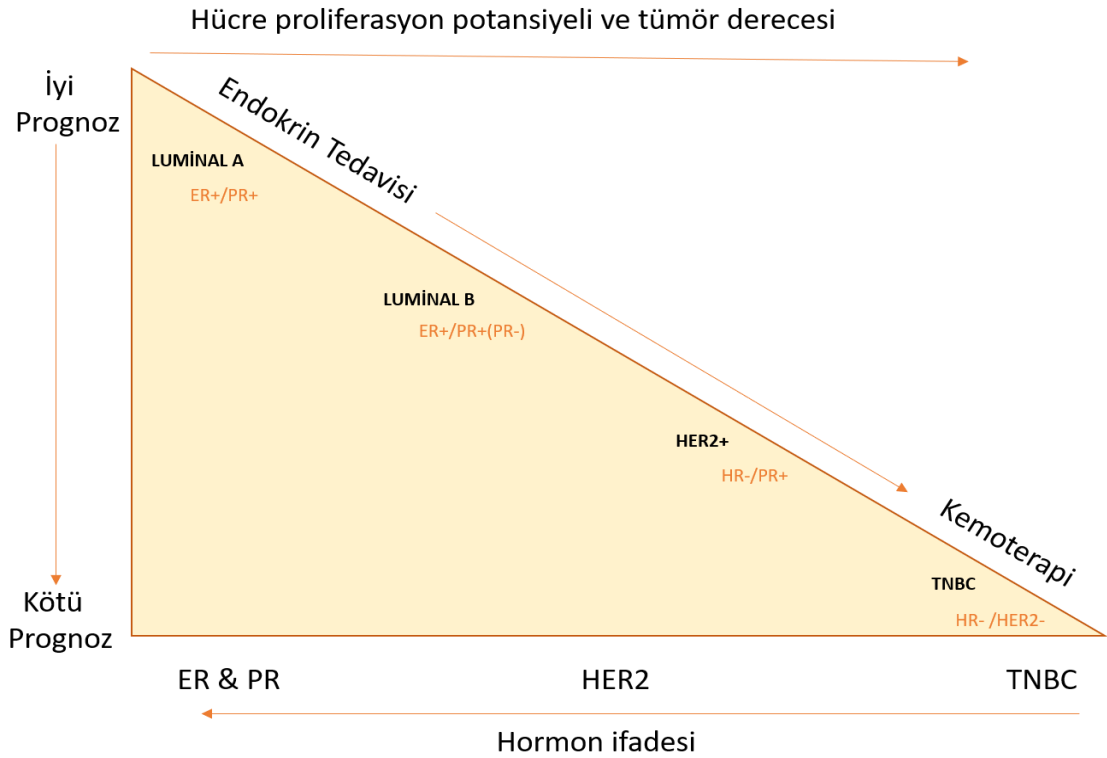
2.3.2. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri

Meme tümörlerindeki heterojenlik ve tümör histolojisi moleküler temelli ve patolojiye dayalı meme kanseri sınıflandırılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur. Meme kanseri hormon reseptörlerinin (HR), ER ve/veya PR, ERBB2 eski adıyla Her2 ve hücre proliferasyon düzenleyicisinin (Ki-67) farklı ifadesine göre moleküler alt tiplere ayrılmaktadır (Richard ve ark., 2021; Nascimento ve Otoni, 2020).

2000 yılında Perou ve arkadaşları bu genlerdeki ekspresyon seviyelerine göre tümörleri dört moleküler alt tipe sınıflandırarak meme kanserinde moleküler profil oluşturmayı önerdi (Şekil 3).

- ❖ Luminal A (ER+ ve/veya PR+ ve Her2- ve düşük Ki-67 seviyesi),
- ❖ Luminal B (ER+ ve/veya PR+ ve /veya Her2+ ve yüksek Ki-67 seviyesi),
- ❖ HER2 ile zenginleştirilmiş (ER- ve PR-/Her2+)
- ❖ TNBC (ER- ve PR- ve Her2 -) (Perou ve ark., 2000; Pellegrino ark., 2021)

Luminal meme kanserleri tüm meme kanserlerinin yaklaşık %70'ini oluşturan tümörlerdir. Luminal A ve Luminal B olmak üzere 2 tipi vardır (Łukasiewicz ve ark., 2021).



Şekil 3. Meme kanseri moleküler alt tipleri (Zubair ve ark., 2021).

2.3.2.1. Luminal A

Luminal A, invaziv meme kanserlerinin %40 ila %50'sini temsil eden en yaygın moleküler alt tiptir. Tüm moleküler alt tipler arasında en iyi prognoza sahiptir. Yavaş

büyüme eğilimindedir. Metastaz, nüks ihtimali azdır. Bu alt tip ER ve/veya PR pozitifdir, Her2 negatif ve Ki-67 seviyeleri düşüktür (Łukasiewicz ve ark., 2021; Feng ve ark., 2018).

2.3.2.2.Luminal B

Luminal A'dan sonra en sık görülen ikinci moleküler alt tiptir. Luminal A'nın aksine Luminal B tümörleri daha kötü prognoza sahiptir, daha yüksek dereceye sahiptirler. ER pozitifler ve PR negatif ve/veya Her2 pozitif olabilirler. Metastaz oranı Luminal A'ya göre fazladır. Ayrıca proliferasyonla ilişkili genlerin yüksek ekspresyonuna sahiptir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

2.3.2.3. Her 2 Zengin

Her2, 1980'lerin ortalarında kanser hücresi büyümesini uyaran bir onkogen olarak tanımlandı. 4 tip reseptör içerir; Her1, Her2, Her3 ve Her4. Bu dört reseptör arasında Her2 reseptörleri, akciğer, meme, yumurtalık ve böbrek kanseri gibi farklı kanser türlerinde aşırı eksprese edilmektedir (Pallerla ve ark., 2021). Her2 pozitif meme kanseri, tüm meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturmaktadır. Erbb2/Her2 geninin amplifikasyonu ve 17q12 lokusundaki ilgili kinaz reseptör proteininin aşırı ekspresyonu ile karakterize edilir. ER+ meme kanseri tiplerine göre daha da agresiftir ve nüks oranı yüksektir (Schettini ve Prat, 2021).

Her2 aşırı ekspresyonu, gelişmiş tümör büyümesi, geleneksel kemoterapiye daha az yanıt ve genel olarak azalmış sağkalım ile ilişkilidir. Her2 pozitif meme kanserinin tek başına kemoterapötik ajanlarla tedavisinde yanıt zayıftır. Her2 reseptörüne karşı anti-tümör özelliklerine sahip monoklonal antikorlar geliştirilmiştir (Pallerla ve ark., 2021). İlk kullanılan monoklonal antikor trastuzumab Her2+ meme kanserinde uygulanan neoadjuvan, adjuvan ve metastatik ortamlarda kemoterapi ile birlikte ortalama sağkalım üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu görülmektedir. Gün geçtikçe de trastuzumab'a ek anti Her2+ ajanlar gelişmekte ve Her2+ tümörün doğal seyri değişerek sağ kalım artmaktadır (Marchiò ve ark., 2021).

2.3.2.4. Triple Negatif

TNBC, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %10-20'sini oluşturan meme kanseri alt tipidir. ER, PR ve Her2 ekspresyonları yoktur. TNBC çok çeşitli genetik, immünofenotipik, morfolojik ve klinik özelliklere sahiptir. Hr + ve Her2 + tümör tiplerine göre TNBC'nin başlangıç yaşı daha erken, metastatik potansiyeli ve nüks olasılığı çok daha yüksek sağkalım oranlarının daha düşük olması gibi kötü klinik sonuçları ile oldukça agresif bir klinik seyri vardır (Garrido-Castro ve ark., 2019; Maqbool ve ark., 2022). TNBC, yeni araştırmalara göre, her biri kendi gen ekspresyon profillerine ve ontolojilerine sahip altı alt tipe ayrılabilir. ER'lerin, PR'lerin, Her2 ekspresyonunun ve standart kemoterapiye direnç öngörücülerinin olmaması, spesifik TNBC ilaç tedavilerinin tasarlanmasını zorlaştırmaktadır (Maqbool ve ark., 2022).

2.4. Meme Kanseri Evreleme

Meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde klinik sonuçları tahmin etmede Amerikan Ortak Kanser Komitesi (American Joint Committee on Cancer-AJCC) evreleme sistemi kullanılmaktadır (Fei ve ark., 2021). İlk defa 1977'de yayınlanmıştır ve düzenli olarak düzeltmelerle güncellenmektedir. 8. baskısı ocak 2018'de yayınlanmıştır (Aldrees ve ark., 2021). AJCC TNM sistemi kanserleri birincil tümörün (T) boyutuna, yaygınlığına, bölgesel lenf düğümlerinin tutulup tutulmamasına (N) ve uzak metastazın (M) varlığına veya yokluğuna göre sınıflandırılır (Aldrees ve ark., 2021). Kanser evrelemesinin temel amaçları; hastanın prognostik sonucunu tahmin etmek, hastalığın yaygınlığını, ciddiyetini belirlemek ve bireysel tedavi planlarını yapmaya yardımcı olmaktır (Fei ve ark., 2021) (Tablo 1).

- **Tümörün Boyutu (T)**

Tx; Tümörün boyutu saptanamamaktadır.

T0; Primer tümör yoktur.

Tis; Karsinoma in situ

DKİS; Duktal karsinoma in situ

LKİS; Lobüler karsinoma in situ

T1; Tümörün boyutu 2cm'den küçüktür.

T2; Tümörün boyutu 2 ile 5 cm arasındadır.

T3; Tümörün boyutu 5 cm'den büyüktür.

T4; Göğüs duvarı veya meme içinde büyüyen her boyuttaki tümör.

- **Lenf Nodu Tutulumu (N)**

Nx; Lenf nodu saptanamamaktadır.

N0; Lenf nodu metastazı yoktur.

N1; 1-3 aksiller lenf nodu tutulumu vardır.

N2; 4-9 aksiller lenf nodu tutulumu vardır.

N3; 10'dan fazla lenf nodu tutulumu vardır.

- **Metastaz (M)**

MX; Uzak metastaz saptanamamaktadır.

M0; Uzak metastaz yoktur.

M1; Uzak metastaz vardır.

Tablo1. TNM sınıflamasına göre Meme Kanseri evrelendirme (Koh ve Kim, 2022).

Evre	Tümör	Nod Durumu	Metastaz
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1A	T1	N0	M0
Evre 1B	T0 T1	N1 N1	M0 M0
Evre 2A	T0 T1 T2	N1 N1 N0	M0 M0 M0
Evre 2B	T2 T3	N1 N0	M0 M0
Evre 3A	T0 T1 T2 T3 T3	N2 N2 N2 N1 N2	M0 M0 M0 M0 M0
Evre 3B	T4 T4 T4	N0 N1 N2	M0 M0 M0
Evre 3C	T (Herhangi)	N3	M0
Evre 4	T (Herhangi)	N (Herhangi)	M1

2.5. Meme Kanseri Tanı Yöntemleri

Meme kanserinde hastaların erken tespiti ve izlenmesi tedaviye erken başlamak için bir avantajdır. Meme kanseri memedeki ağrı, ele gelen bir kitle ve akabinde uygun görüntüleme teknikleriyle teşhis edilmektedir. Görüntüleme teknikleri teşhis, hastalığın gidişatını izlemeye ve tedaviye yanıtı saptamada önemlidir. Farklı durumlarda farklı görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (Hamed ve ark., 2018; Jafari ve ark., 2017).

2.5.1. Mammografi

Meme kanseri taramasında mammografi altın standart olarak kullanılmaktadır. Memede olan kitle ve lezyonları, ciltteki değişimleri, meme başı akıntısını ve kalınlaşmasını inceler. Kitle ve lezyonları tümöre dönüşme aşamasında tespit

etmektedir. DKİS, LKİS ve İDK teşhisinde mamografi en iyisidir. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve ultrasondan üstündür. Ancak İLK'yi saptamak için de biyopsi, mamografiden daha çok tercih edilmektedir. Mammografinin kullanılmasının mortalite de %19'luk bir azalmaya yol açtığı ispatlanmıştır (Jafari ve ark., 2017).

2.5.2. Meme Ultrasonografi

Meme ultrasonografisi, meme dokusunda akustik dalgalarla tümörleri tespit eden, uygun maliyetli ve yaygın olarak bulunabilen bir tarama aracıdır. Meme kanseri riski yüksek olan kişilere, hamile kadınlara ve mamografi yaptıramayacak olan kişilere meme ultrasonografisi önerilmektedir. Mamografiye göre daha az verimli olmasına rağmen kist ve katı kitlelerin saptanmasına yardımcıdır. Meme ultrasonografisi meme kanseri riski yüksek olan kişilerde tespit oranlarını artırır (Wang ve ark., 2017).

2.5.3. Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

MRG, memedeki daha sonra biyopsi alınması gereken kitleleri analiz etmek için mamografideki X ışınlarının aksine manyetik alan kullanan standart bir tekniktir (Zubair ve ark., 2021). MRG, radyo frekans sinyalleri ile güçlü manyetik alan uygulayarak farklı kesitlerde görüntü oluşturmaktadır. Meme ultrasonografisi ve mamografi ile karşılaştırıldığında spesifikliği azdır. Fakat BRCA mutasyonlu ve yüksek meme kanseri riski olan meme kanseri hastalarında küçük boyuttaki tümörleri saptamak için kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2017).

2.5.4. Positron Emisyon Tomografisi (PET)

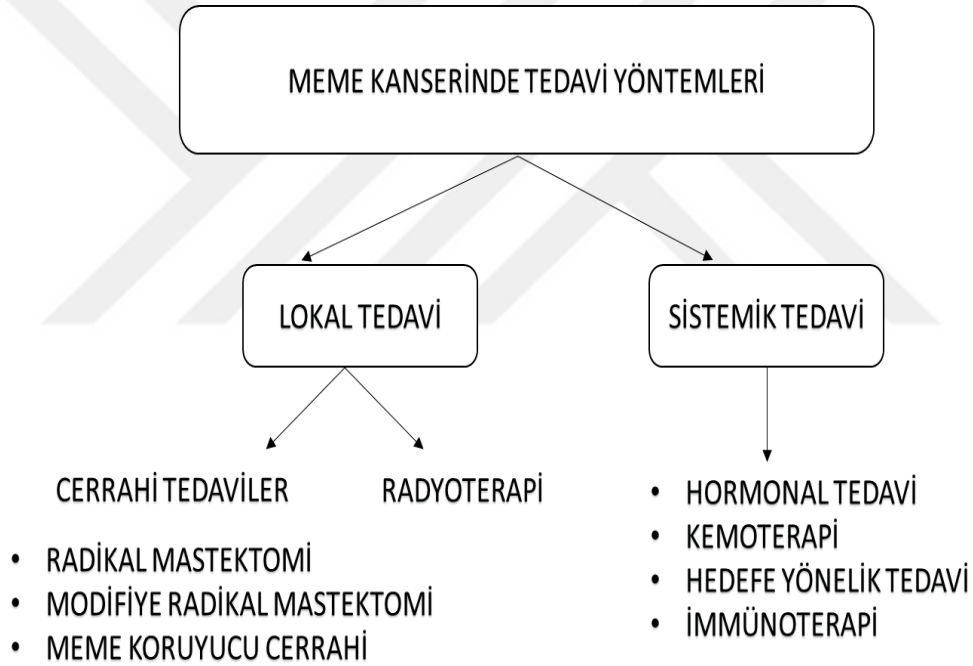
PET ve SPECT, meme kanseri hastalarının tanısında kullanılabilecek diğer görüntüleme teknikleridir. PET tekniği, pozitron yayan radyoaktif izotopları kullanmaktadır. PET 50 yaşından küçük yoğun meme dokusu olan ve MMG ile doğru sonuca varılamayan hastalarda tercih sebebidir (Hamed ve ark., 2018). PET görüntüleme çok hassas ve en önemli görüntüleme yöntemlerinden biridir. Kanser hastalarında spesifik tanı, kesin evreleme ve tedavi yanıtı için çok önemli moleküler görüntüleme çeşididir (Miladinova ve ark., 2019).

2.5.5. Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi (SPECT)

SPECT (Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi) tekniği, gama fotonları yayan izotopları kullanmaktadır. Hastalığın tanısında kullanılabilecek bir diğer görüntüleme yöntemidir. Meme kanserinin kemik metastazını yüksek duyarlılık ve özgüllük ile kolayca teşhis etmektedir. SPECT vücutta oluşan metastazı saptamak için MRG'den üstün bir yöntemdir.

Gelecekte PET/CI ve SPECT/CI yöntemlerinin hibrit kullanılması yüksek teşhis doğruluğu ile hızlı bir şekilde tüm vücut görüntülenmesini daha da kolaylaştıracaktır (Ahmadpour ve Hosseinimehr, 2019).

2.6. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri



Şekil 4. Meme Kanseri tedavî yöntemleri (Bou-Dargham ve ark., 2021).

Meme kanserinde tedaviyi belirlemek için öncelikle tümörün primer veya metastaz olup olmadığını, meme kanserinin alt tipini ve kanserin hangi evrede olduğunu belirlemek gerekmektedir.

Erken evre (I veya II) tümörler için çoğu hastaya (%49) lumpektomi artı radyoterapi; hastaların %34'ü tek başına mastektomi veya kemoterapi/radyoterapi ile birlikte

mastektomiye seçmektedir. Evre III meme kanseri teşhisi konan hastalar (%68) arasında en yaygın tedavi ise adjuvan kemoterapi/radyoterapi ile mastektomidir. Metastatik meme kanserine (IV) gelince, kadınların %56'sı tek başına radyasyon tedavisi/kemoterapi almaktadır.

Hastaların %62'sine tanı konulduğunda meme de tümör bölgesel bir yerdeyken, %31'inde sentinel lenf düğümlerine ve %6'sında ise uzak bölgelere metastaz yapmış durumdadır. Metastatik olmayan meme tümörü olan hastalarda amaç memedeki tümörü ve komşu lenf düğümlerini temizlemek ve tümörün metastazını önlemektir (Bou-Dargham ve ark., 2021).

Metastatik olmayan meme kanserinin lokal tedavisi, cerrahi tedaviler (radikal mastektomi, modifiye radikal mastektomi, meme koruyucu cerrahi) ve radyoterapi ile gerçekleşmektedir. Meme kanseri alt tipi, hastalığın tüm evreleri için olası tedaviyi belirlemek için kullanılır ve uygulanan sistemik tedaviyi belirler. Sistemik tedavi özellikle vücuda yayılma potansiyeli olan metastazların kontrolüne dayanan hastalıksız sağ kalımı iyileştirmek için tercih edilir. HR+ tümörleri için endokrin tedavisini, Her2+ tümörleri için Her2 hedefli ajanları ve TNBC için tek başına kemoterapiyi içerir (Shien ve ark., 2019) (Şekil 4).

Bu tür tedavilere rağmen direncin devam ettiği ve daha etkili tedavi yöntemlerine ihtiyacın olduğu durumlarda ise hedefe yönelik tedavi yöntemleri devreye girmektedir. Bunlar EGFR hedefli terapiler, PARP inhibitörleri, DK4/6 inhibitörleri, anti-Her2 antibodyleri gibi hedefe yönelik tedaviler ve Car-T cell tedavisi gibi immünoterapiler umut ışığı olmaktadır (Bou-Dargham ve ark., 2021).

2.7. MikroRNA (miRNA'lar)

MikroRNA'lar (miRNA'lar), transkripsiyon sonrası hedef mRNA'ların translasyonel baskılanmasını veya parçalanmalarını sağlayarak gen ekspresyonunu düzenleyen ve türler arasında yüksek oranda korunan 19-25 nükleotid uzunluğundaki kodlamayan küçük tek iplikçikli RNA molekülleridir (Lu ve Rothenberg, 2018; Correia de Sousa ve ark., 2019). miRNA'lar ilk olarak 1993 yılında, nematod türü *Caenorhabditis elegans* solucanlarının gelişimsel süreçleri üzerine yapılan genetik çalışmalar sırasında tanımlanmıştır. 2001 yılında kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olarak resmen tanınmıştır. Gelişim, farklılaşma, hücre döngüsü, çoğalma ve apoptoz dahil olmak üzere neredeyse tüm biyolojik yollarda önemli rollere sahiptirler (Conti ve ark., 2020). miRNA'lar doku homeostazının ve hücre sinyalleme sisteminin kontrolünde anahtar rol oynar ve gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde işlev görür (Lima ve ark., 2021). miRNA'lar hedefledikleri genleri tanıma özelliğine sahiptirler.

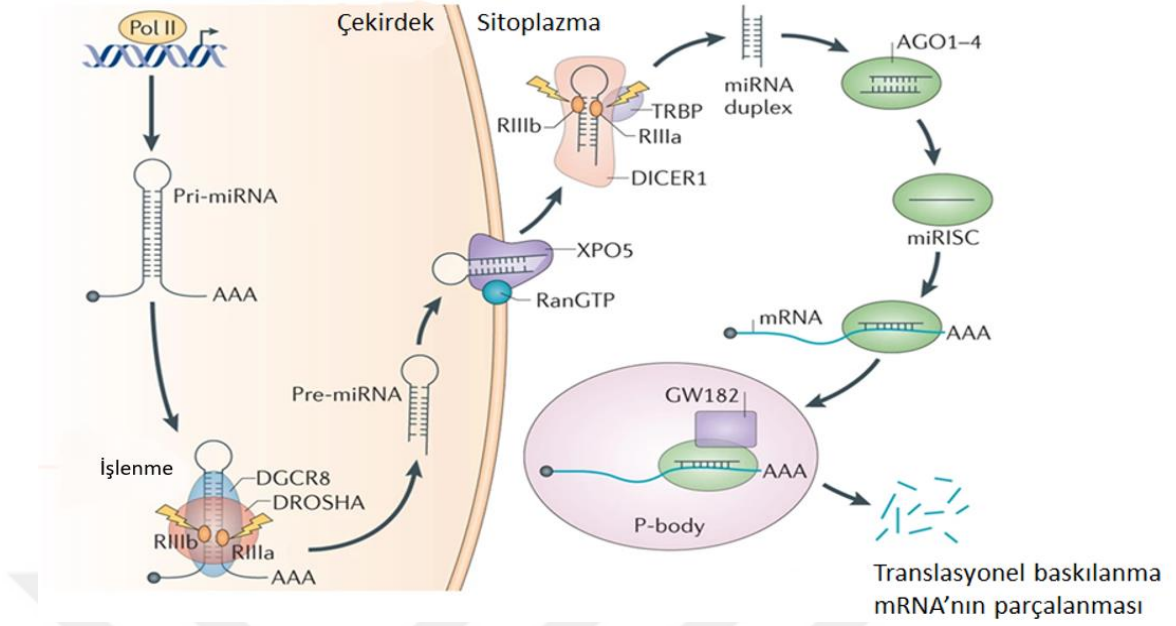
Hedefledikleri genler kendi baz dizileriyle eşleşen genlerdir. Baz eşleşme özelliği sayesinde hedef mRNA'ya bağlanır. Bu da ya mRNA'nın yıkılmasına ya da protein translasyonunun engellenmesine neden olur (Loh ve ark., 2019). Bununla birlikte, miRNA'lar birden fazla mRNA'ya bağlanabilir ve aynı şekilde bir mRNA birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir (Stavast ve Erkeland, 2019). mikroRNA'ların (miRNA) düzensizliği, miyokard enfarktüsü, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, obezite ve kanser dahil olmak üzere birçok insan hastalığı için belirteç olarak kullanılabilmektedir (Hamam ve ark., 2017). TargetScan çalışmalarına göre, miRNA'lar tüm insan genlerinin üçte birini düzenler (Lewis ve ark., 2005) ve anjiyogenez (Goradel ve ark., 2019), metastaz gibi kanserle ilgili gelişmeler de dahil olmak üzere çeşitli süreçlerin temel düzenleyici olarak görev yaparlar.

2.7.1. miRNA biogenezi

miRNA'lar, yüksek düzeyde spesifik etkileşimler ve karmaşık düzenleyici ağlar yoluyla farklı dokularda ve gelişim aşamalarında gen ekspresyonunun anahtar transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olarak işlev görür (Loh ve ark., 2019).

Tanımlanmış miRNA'lar ya intragenik ya da intergeniktir. İntragenik kısım intronlardan ya da ekzondan işlenirken, intragenik kısım kendi promotörleri tarafından düzenlenir ve konakçı gene bağımlı olmayarak kopyalanır.

miRNA biyogenezi miRNA'nın (pri-miRNA) RNA polimeraz II veya RNA polimeraz III tarafından birincil pri-miRNA transkripsiyonu ile çekirdekte başlar. Pri-miRNA'lar, bir RNase III enzimi olan Drosha ve onun yardımcı faktörü bir RNA bağlayıcı protein (DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8) DGCR8'den oluşan mikroşlemci kompleksi tarafından tanınır, pri-miRNA'yı parçalayarak yaklaşık 70-100 nükleotid saç tokası yapısındaki pre-miRNA'ya dönüşür. Bu şekilde oluşturulan pre-miRNA'nın 2 nükleotit 3' çıkıntısı Exportin-5 tarafından tanınır. Exportin-5, pre-miRNA'yı bozulmadan korur ve onu çekirdekten sitoplazmaya taşır. Exportin-5, Ran-GTP ve pre-miRNA üçlü bir kompleks oluşturur ve Ran-GTP'nin Ran-GDP'ye hidrolizi ile üçlü kompleksin konformasyonu değişir ve böylece pre-miRNA sitoplazma içine serbest bırakılır. Sitoplazma içerisine salınan pre-miRNA'nın olgunlaşması DICER olarak bilinen RNaz III enzim tarafından gerçekleşir. Çift iplikli 18-24 nükleotid büyüklüğünde kılavuz ve yolcu ipliğe sahip miRNA dupleksini oluştururlar. Yolcu iplik genelde degrade olur. Kılavuz iplik argonaut (Ago 1-4) proteinleriyle birleşerek RISC (RNA induced-silencing complex) ile kompleks oluşturmaktadır. RISC miRNA ve mRNA'nın eşleşmesini sağlayarak mRNA'nın ya translasyonunun engellenmesine ya da yıkılmasına sebep olur (Salim ve ark., 2022; Rani ve Sengar, 2022) (Şekil 5).



Şekil 5. miRNA biyosentezi (Karabulut ve ark., 2018).

2.7.2. miRNA ve Kanser

miRNA'ların fonksiyonlarındaki ya da ifade düzeyindeki değişimler başta kanser olmak üzere birçok hastalığın gelişiminde rol oynamaktadır. Kanserle ilişkili miRNA'lar hedef aldıkları mRNA'lara bağlı olarak onkogenik miRNA'lar (Onko-miR) ve tümör süpresör miRNA'lar (Ts-miR) olarak 2 gruba ayrılır. Onko-miR'in kanserde anormal derecede yüksek ekspresyonu, hedefindeki mRNA'lara doğrudan bağlanıp tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu aşağı regüle etmesi kanser hücrelerinin büyümesine, hareketliliğine ve metastazına yol açar. Bu da tümörün ilerlemesine katkıda bulunur (Inoue ve Inazawa, 2021). Ts-miR'lerin yüksek ekspresyonu ise hücre büyümesini, apoptozu, immün hücre gelişimini ve diğer kanserlerle ilişkili olayları düzenleyerek tümör oluşumunu baskılamaktadır. Bazı kanserle ilişkili miRNA'lar, dokuya özgü bir şekilde hareket edebilirler, böylece bazı miRNA'lar farklı kanserlerde onkogenik veya tümör baskılayıcı rollere sahip olabilmektedir (Fridrichova ve Zmetakova, 2019). Onko-miR ve tümör baskılayıcı miRNA'ların baskılanması veya uyarılması, kanser hücresinin çoğalmasını, tümör büyümesini, metastaz oluşumunu ve hücrenin hayatta kalması gibi olayların

düzenlenmesini sağlamaktadır (Oliveto ve ark., 2017). Onko-miR ve Ts-miR'lerin farkları Tablo 2'de özetlenmektedir.

Tablo2. Onko-miR ve Ts-miR'ler arasındaki temel farklılıklar

Tümör Supressör miRNA	Onkogenik miRNA
1. Tümör oluşumunu negatif olarak düzenler. 2. Anormal hücre büyümesini inhibe eder. 3. Apoptozu düzenler.	1. Tümör oluşumunu pozitif olarak düzenler. 2. Anormal hücre büyümesini destekler. 3. Apoptozu inhibe eder.

Kanserli hücre ve sağlıklı hücrelerde miRNA'lar farklı şekilde eksprese edilir. Anormal miRNA ekspresyonu genomik miRNA kopya sayıları ve gen konumundaki farklılıklardan (mutasyon, amplifikasyon, delesyon ve translokasyon) kaynaklanır. B hücreli kronik lenfositik lösemide miRNA ekspresyonu ile kanser gelişimi arasındaki ilişki ilk kez tanımlanmıştır. Bu hastalarda 13q14 kromozom bölgesi ve miR-15a /16a küme geninde kayıp olmuştur, bu da bu miRNA'ların muhtemel tümör baskılayıcı olduğunu göstermektedir (Calin ve ark., 2002).

2.7.3. miRNA ve Meme Kanseri

miRNA'lar, hastalığı teşhis etmek veya metastaz ve tedavi hakkında yeni bilgiler vermek için kullanılabilecek tanısal ve prognostik hedefler olarak muazzam bir potansiyele sahiptirler (Nair ve ark., 2021).

Son araştırmalar, çeşitli meme kanserinde dolaşımdaki miRNA'ların seviyeleri ile prognoz arasında korelasyonun olduğunu göstermektedir (Nair ve ark., 2021). miRNA'lar, kanser oluşumunun başlangıç, invazyon ve metastazında apoptoz, otofaji ve epitelyal-mezenkimal geçişin düzenlenmesi, anjiogenez yollarında rol oynayarak meme kanseri gelişiminde yer almaktadır (Mcguire ve ark., 2016). Ayrıca miRNA'ların meme kanseri hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara karşı direncini de etkilediği bulunmuştur (Ghafouri-Fard ve ark., 2021). Başka bir çalışmada da meme

kanserinde miRNA'ların tümör derecesini belirlemeye yardımcı olduğu gösterilmiştir (Cava ve ark., 2014).

Kanser, apoptozunun yokluğunun malign hücrelerin hayatta kalmasıyla sonuçlandığı durumlardan biridir. Apoptozun düzenlenmesinde çeşitli yollar rol oynamaktadır. Bu yolların herhangi bir kısmında defektler meydana gelebilir, bu da hücrelerin malign transformasyonuna, tümör metastazının kolaylaşmasına ve antikanser ajanlara karşı direncin indüklenmesine neden olmaktadır. miR-7-5p, meme kanseri hücrelerinin apoptozunu düzenleyen miRNA'ların bir örneğidir (Loh ve ark., 2019).

Meme kanserinin önemli özelliklerinden biri de hücre proliferasyonudur. Proliferasyondaki düzensizlik memede tümör oluşumunun nedenlerinden biridir. Hücre çoğalması ve baskılanması arasında dengenin korunması hücre döngüsünün düzgün ilerlemesi için şarttır. Hücre döngüsünde siklinlerin, protein kinazların artan ekspresyonu hücre döngüsünde düzensizliklere neden olmaktadır. miRNA'lar hücre döngüsünde siklin protein ailesi, protein kinazlar gibi süreçlerin kontrolünde görevlidir. miRNA'lar tarafından kinaz inhibitörlerinin aşağı regülasyonu da meme kanseri hücre canlılığını artırmaktadır. miR-497, miR-16, and miR-30c-2-3p, miR-483-3p, miR-143, miR-26a-5p bu miRNA'lardan sadece bazılarıdır (Loh ve ark., 2019).

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), meme kanseri metastaz kaskadının önemli bir özelliğidir, kanser hücrelerinin kök hücre benzeri özellikler kazanmasını sağlar ve göç, istila yeteneklerini kolaylaştırır. Tümör oluşumunda kritik derecede önemlidir. Kanser hücreleri ilaca dirençli hale gelir ve kanser önleyici ilaçların sitotoksik etkisinden kaçma yeteneği kazanmaktadır. Ek olarak, bu hücreler invaziv özellik kazanır, böylece metastazı teşvik etmektedir (Parfenyev ve ark., 2021).

miRNA'lar, ya ana transkripsiyon faktörlerinin efektör molekülleri olarak ya da ekspresyonlarının modülatörleri olarak EMT'de belirleyici bir rol oynamaktadır. Son zamanlarda, miRNA'ların, sürece ana katkıyı yapan miR-200 ailesi ile EMT'nin kritik düzenleyicileri arasında olduğu ortaya çıkmıştır (Loh ve ark., 2019). miRNA'lar, endotel hücre fonksiyonunu etkileyerek doğrudan veya anjiyogenezi önleyen veya destekleyen proteinlerin üretimini değiştirerek dolaylı olarak

anjyogenezi etkileyebilmektedir (Wang ve ark., 2021;Wang ve ark., 2018). Anjyogenez, önceden var olan tümörlerden yeni kan damarları oluşturmak için çok adımlı ve karmaşık bir süreçtir. MikroRNA'lar, kanser büyümesi ve metastazında önemli bir bileşen olan tümör anjyogenezini düzenlemektedir.

Anjyogenez düzenlemesinin yeni moleküler özelliklerinin tanımlanması ve kanser ilerleme stratejilerinin daha iyi anlaşılması, yeni terapötik seçeneklerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Anjyogenezde yer alan çok sayıda gen miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir. Bu nedenle miRNA-hedef etkileşim ağlarının belirlenmesi, meme kanserinde anti-anjiyojenik tedaviyi ve yeni tanısal biyobelirteçleri tanımlamada faydalı olacaktır (Hussen ve ark., 2021).

Özellikle, organa özgü kolonizasyon, hücre dışı matris (ECM) ile birlikte bağışıklık hücreleri, endotelial hücreler, fibroblastlar, adipositler gibi kanserli olmayan hücre çeşitlerinden oluşan tümör hücreleri ve tümör mikro-ortamı (TME) arasındaki dinamik ve karşılıklı ilişkiye dayanmaktadır. Farklı meme kanseri alt tiplerinin, farklı moleküler mekanizmalar tarafından yönetilen farklı metastatik bölge tercihleri gösterdiği bulunmuştur (Wang ve ark., 2021).

Erken evre meme kanserli hastaların yaklaşık %20 ila %30'u uzak metastaz yaşamaktadır. Hasta ölümlerinin yaklaşık %90'ı, tekrarlayan veya metastatik hastalıklara dayalı komplikasyonlardan kaynaklanmaktadır.

Uzak metastazların belirli organlara dağılımı, kanserin alt tipleri, kanser hücrelerinin moleküler özellikleri, konakçı immün mikroçevresi ve çapraz konuşma ve etkileşimler gibi birçok faktör tarafından düzenlenen “metastatik organotropizm” olarak bilinen rastgele olmayan bir süreçtir.

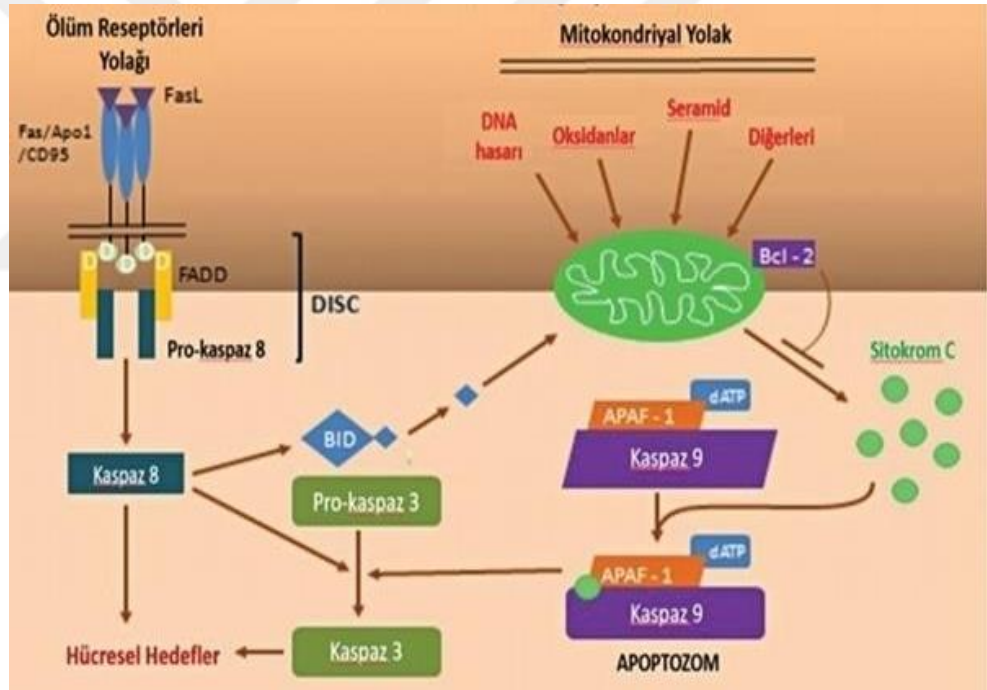
Meme kanserinin histopatolojik alt tiplerine göre metastatik yayılımı farklanır. İDK'lar akciğerlere, uzak lenf düğümlerine ve merkezi sinir sistemine metastaz yapma eğilimindeyken, İLK'nın periton, gastrointestinal sistem ve yumurtalıklarda üç kat daha fazla metastazı vardır (Cheng ve ark., 2017).

2.7.4. miR-484

Kanser etiyolojisine yönelik yapılan en son araştırmalar epigenetiğın kanserde kilit rol oynadığını göstermektedir (Wu ve ark., 2015). Gen ekspresyonunun ana düzenleyicisi olarak kabul edilen miRNA'lar kanserin ilerlemesi, metastaz, apoptoz, otofaji ve epitelyal-mezenkimal geçişin düzenlenmesi, anjiogenez ve ilaç direncinde rol oynamaktadır ve son zamanlarda da miRNA'lar kanserde teşhis, prognoz ve tedavi hedefleri için moleküler belirteç olarak karşımıza çıkmaktadır (Ghafouri-Fard ve ark., 2021). Kanser hücrelerinde bu sinyal yolaklarında rol oynayan miRNA'lardan birisi de miR-484'tür. miR-484 insanlarda 16p13.11 üzerinde lokalize olup 22 nükleotidden oluşmaktadır (Jia ve ark., 2022). Birçok kanserde rol oynadığı bilinmektedir. Bazı kanserlerde onko-miR, bazılarında ise ts-miR olarak davrandığı bulgular arasındadır (Wang ve ark., 2019; Hu ve ark., 2017; Li ve ark., 2017; Merhautova ark., 2015; Vecchione ve ark., 2013). Hepatoselüler karsinom, renal karsinom, yumurtalık kanseri ve metastatik kolon kanserinde miR-484' n onkogenik olarak davrandığı ve hasta prognozuyla ilişkili olduğu görülmektedir (Wang ve ark. 2019; Merhautova ve ark., 2015; Vecchione ve ark., 2013; McGuire ve ark., 2015). Benzer şekilde akciğ r kanserinin ilerlemesinde ise miR-484' n ekspresyonunun artması apoptozu engelleyerek tümör proliferasyona katkı sağlayıp onkogen olarak işlev gördüğü çalışmalardan bir diğ ridir (Li ve ark., 2017). Servikal kanserde miR-484' n tümör supressör olduğu görülmüştür. miR-484' n aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonunu baskıladığı, apoptozu desteklediği de veriler arasındadır (Hu ve ark., 2017). miR-484' n mide kanserinde tümörlü ve komşu tümörlü olmayan dokuları kıyaslandığında kanserli dokularda aşağı regüle edildiği gösterilmiştir. miR-484' n aşağı regülasyonu, mide kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını, göçünü ve istilasını arttırdığı bulunmuştur. Bu veriler de miR-484' n tümör süpressör olduğunu desteklemektedir (Li ve ark., 2020). Meme kanseri hastalarının serum örneklerinde ise miR-484' n ekspresyonun yüksek olduğu, onkogenik miRNA olarak görev yaptığı görülmüş, hücre proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Ye ve ark., 2015; Zearo ve ark., 2014). Görüldüğü gibi miR-484 ile ilgili az sayıda çalışmada birbirleriyle çelişkili veriler yer almaktadır.

2.8. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk defa 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır Yunanca'dan türeyen bu kelime ağaçtan düşen yaprak anlamına gelmektedir. (Apo:ayrı Ptosis: düşen) (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz; ihtiyaç duyulmayan, fonksiyonlarını yerine getiremeyen, biyolojik görevini bitirmiş veya hasarlanmış olan hücrelerin yok edilmesini sağlayan programlı hücre ölümüdür. Apoptoz, iç dengenin sağlanmasında ve yararı olmayan hücrelerin yok edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Apoptoz mekanizması oldukça komplekstir. İntrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki temel yolak tarafından aktive edilmektedir (Singh ve ark., 2022) (Şekil 6).



Şekil 6. Apoptozda rol oynayan intrinsik ve ekstrinsik yolaklar (Singh ve ark., 2022)

1)İntrinsik Yolak: Bu yolak hücre içi sinyalleriyle aktifleşmektedir. DNA hasarı, endoplazmik retikulum (ER) stresi, oksidatif stres gibi tetikleyicilere yanıt olarak mitokondriyal bütünlük tehlikeye girmektedir. Tetikleyiciler Bcl proteinini indükler, bu da mitokondrinin dış zarında geçirgenliğe neden olur. Mitokondriyal bütünlükteki bozulma sitokrom C ve ikinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü (SMAC; DIABLO) gibi iç zar proteinlerinin salınmasına yol açar. Sitokrom C Apaf 1 apoptozom adlı çoklu protein yapısını oluşturur; bunlara kaspaz 9'da bağlanarak apoptoz indüklenir. Aktifleşen kaspaz 9 kaspaz 3,6,7,9,10'u da aktifleştirerek kaspaz kaskadını başlatır. Bcl proteinleri mitokondriyal bağımlı apoptozda çok önemli rol oynamaktadır. Hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğine karar vermektedir. Proapoptotik ve antiapoptotik olarak hareket edebilmektedir. Proapoptotik genler BAX, BCL-10, BIK, BAK, BLK, BAD, BIM, BID, PUMA ve NOXA'yı içerirken, anti-apoptotik genler BCL-2, BAG, BCL-XS, BCL-XL, BCL'yi içermektedir (Kesavardhana ve ark., 2020; Singh ve ark., 2022).

2) Ekstrinsik Yolak: Bu yolak ölüm reseptörlerine ölüm ligandlarının bağlanmasıyla aktifleşmektedir. Ekstrinsik yolakta apoptoz ölüm reseptörleri olarak bilinen hücre zarı proteinleri tarafından başlatılır. Bu reseptörler FAS, TNFR1, TNFR2, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5) reseptörleri FASL, TNF α , TRAIL (TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand) ligandlarında bağlanır ve bu durum adaptör proteinlerinde bağlanması için zemin oluşturur. Her bir ölüm bölgesi reseptöre özgüdür. Adaptör proteinler Fas için FADD; TNFR1 ve TNFR2 için TRADD'dır. Böylelikle ölümün başlamasını sağlayan reseptör-ligand ve adaptör protein kompleksi oluşmuştur. Bu da prokaspaz-8 ve 10'un aktifleşerek kaskadı başlamasına neden olmaktadır. Artık apoptoz indüklenmiştir. Ya başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları aktifleştirecektir ya da BCL ailesi üyelerinden BID'ı uyararak apoptoz intrinsik yoldan devam edecektir. (Abd-elhamid ve ark., 2020; Carneiro B ve El-Deiry 2020; Van ve Lamkanfi, 2019). Apoptozun intrinsik yolağında Bcl-2 proteinleri görev yapmaktadır. Kaspazlar ise her iki yolda da yer almaktadır (Singh ve ark., 2022).

2.8.1. Kaspazlar

Kaspazlar, sistein proteazlarıdır. Aspartik asit kalıntılarından sonra hedeflenen proteinleri parçalarlar. Hem immün hem de immün olmayan hücrelerde eksprese edilirler ve kaspazların çoğu, homeostaz sırasında yapısal olarak eksprese edilir. Kaspazlar, prokaspazlar adı verilen enzimatik olarak aktif olmayan zimojenler olarak üretilmektedir. Aktivasyon için dimerizasyon veya oligomerizasyona uğramaları gerekmektedir. Aktifleştiklerinde hücre ölümü başlamaktadır (Kesavardhana ve ark., 2020).

Kaspazlar, işlevlerine ve yapılarına göre alt tipe ayrılan 14 proteinli sistein proteaz ailesine aittir:

1. ENFLAMATUAR kaspazlar -1, -4, -5, -11, -12, -13 ve -14;
2. BAŞLATICI kaspazlar -2, -8, -9 ve -10 ve
3. EFEKTÖR kaspazlar -3, 6- ve -7 olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (Singh ve ark.,2022).

2.8.1.1. Kaspaz 9

Kaspaz 9, kromozom 1 üzerinde bulunan CASP9 geni tarafından kodlanır. İntrinsik apoptoz yolu için bir başlatıcı kaspaz görevi gören Prokaspaz-9, monomer olarak bulunur ve üç alandan oluşur: N-terminal ön alanı, büyük ve küçük bir alt birimden oluşur (Li ve ark., 2017).

2.8.1.2. Kaspaz 3

Casp3 geni tarafından kodlanır. Büyük ve küçük alt birimlerden oluşmaktadır. Öncelikle olgunlaşmamış şekilde sentezlenir. İnaktif haldedirler, dimerizasyon ile aktifleşirler. Aktifleştiklerinde apoptozu geri dönüşümsüz olarak indüklemektedir. Her 2 yolda da görevlidir (Kashyap ve ark., 2021). Apoptoz dışında doku farklılaşması, rejenerasyon ve nöral gelişimde de işlevleri bulunmaktadır (Asadi ve ark., 2021).

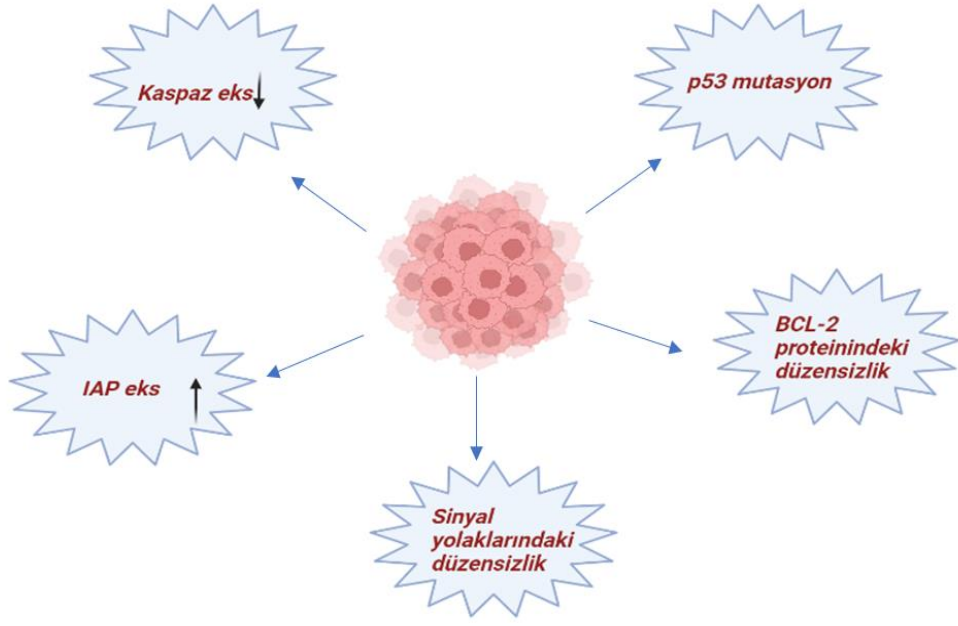
2.8.1.3. BCL-2 (B Hücresi Lenfoma 2)

İntrinsik apoptoz yolağının düzenlenmesi ve yürütülmesinin anahtarı, hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri içeren BCL-2 (B Hücresi Lenfoma 2) ailesi proteinleridir (Singh ve ark., 2022). *Bcl-2* geni tarafından kodlanan Bcl-2 proteini, anti-apoptotik bir rol oynar ve hücre ölümünü inhibe ederek hücrelerin uzun süre hayatta kalmasına neden olur. Bcl-2 birçok kanserde aşırı eksprese edilir ve tümörün başlamasına, ilerlemesine ve tedaviye karşı dirençli olmasına katkıda bulunur (Honma ve ark., 2015; Singh ve ark., 2022).

2.8.2. Apoptoz ve Kanser

Apoptozdaki dengesizlikler bazı hastalıklara neden olmaktadır. Bu hastalıklardan biri de kanserdir. Kanser hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması ve hücrelerin apoptozu gerçekleştirecek ölüm sinyallerini alamamasıyla ortaya çıkmaktadır. Bu durum apoptotik yolların herhangi bir adımında problem meydana getirebilmektedir (Singh ve ark., 2022).

Tümörlü hücrelerin apoptozdan kaçabileceği ya da hücre ölümüne karşı direnç geliştirebileceği çeşitli faktörler vardır. Bunlardan bazıları kaspazların ekspresyonundaki düşüş, inhibitör apoptoz protein ailesinin (IAP) ekspresyonundaki artış, p53'deki mutasyonlar, sinyal yollarındaki reseptörlerin ve Bcl-2 proteininin dengesinin bozulmasıdır (Şekil 7) (Singh ve ark., 2022).



Şekil 7. Kanser ve hücre ölümünden kaçış yolları (BioRender).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

Sunulan tez çalışmasında tüm moleküler çalışmalar Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde gerçekleştirilmiş olup aşağıdaki Tablo 3'deki gereçler kullanılmıştır.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Kullanılan Cihaz ve markası	Kullanım Yeri
Hassas Terazı, Sonyo	Tartma işleminde
Gilson Mikropipet seti	İzolasyon, PCR ve Western çalışmalarında
Sigma Santrifüj cihazı	Santrifüjleme işlemlerinde
Scilogex Doku parçalayıcı	RNA izolasyonunda doku parçalamada
Sensquest Labcycler PCR cihazı	cDNA sentezlenmesinde
Light Cycler 480 II Roche Ekspresyon cihazı	RT-PCR işlemi ve analizinde
Heidolph Vortex cihazı	Kimyasalların homojenizasyonunda
Heidolph shaker cihazı	Protein izolasyonunda
Pequlab Perfect Spin	Kimyasalların spin edilmesinde
Gilson GmcLab Spin	PCR Plate spin edilmesinde
Shimadzu- Biotech Bio-Spec Nano Spectrophotometer	RNA saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesinde
Pipet Tabancası, Gilson	Kimyasal hazırlamada
- 20°C Blok	-20 derece sıcaklık gerektiren çalışmalarda
+ 4°C Blok	+4 derece sıcaklık gerektiren çalışmalarda
Siemens Buzdolabı	Kimyasalların saklanması
Siemens -80°C dolap	Kimyasalların uzun süreli saklanması
BioRad shaker	Tamponların hazırlanmasında
ChemidocGörüntülemeSistemi	Proteinlerin görüntülenmesinde
Biorad marka SDS PAGE sistemi	Proteinlerin yürütülmesinde
Promega Elisa reader cihazı	Proteinlerin ölçülmesinde

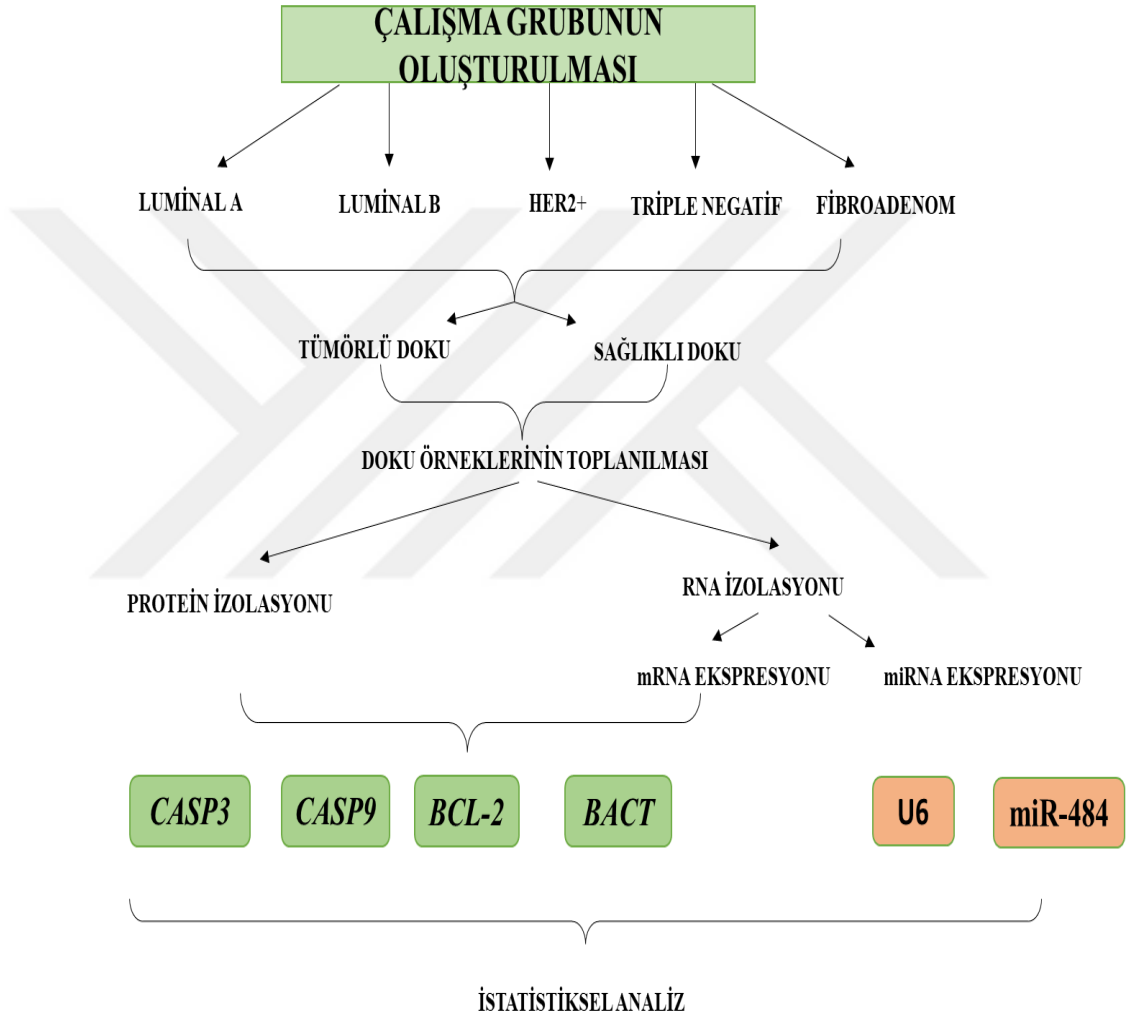
Tablo 4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.

Sarf Malzemeler ve markası	Kullanım Yeri
TriPure Isolation Reagent, Roche	RNA izolasyonu
Kloroform, Merck	RNA izolasyonu
İzopropanol, Merck	RNA izolasyon
%70 Etanol, Merck	RNA izolasyonu
Iscrip cDNA izolasyon kiti, Biorad	cDNA eldesi
SYBR green supermix, Biorad	Gen ekspresyonu
Primer Casp3, Casp9, Bcl-2 Oligomer	Gen ekspresyonu
miRNA qRT-PCR TB Green Kit, Takara	miRNA ekspresyonu
Primer miRNA 500 reaksiyon miR 484, Takara	miRNA ekspresyonu
1,5 ml ve 2 ml'lik ependorf tüp, Greiner	Moleküler işlemlerin yapılmasında
Nükleaz free water, Qiagen	Primerlerin sulandırması ve RNA izolasyonu için
Trisma base, Sigma	Western blot analizi
Glycine, Sigma	Western blot analizi
Sodium dodesil sulphate, Biorad	Western blot analizi
Readygel-4-15 %, Ready Gel, Biorad	Western blot analizi
Tris-HCL, Sigma	Western blot analizi
Sodium Chloride	Western blot analizi
Tween 20, Sigma	Western blot analizi
Nonfat dry milk, Biorad	Western blot analizi
Western ECL substrate, Biorad	Western blot analizi
2-mercaptoethanol, Sigma	Western blot analizi

Methanol (Alkol metilico), Sigma	Western blot analizi
Immun-Blot PVDV- Membrane for protein blotting, Biorad	Western blot analizi
Phosphatase reaction buffer, Sigma	Western blot analizi
4x laemli buffer, Biorad	Western blot analizi
Protease inhibitör coctail, Sigma	Proteinlerin izolasyonunda
Sodium florür, Sigma	Proteinlerin izolasyonunda
Cell extraction buffer, İnvitrogen	Proteinlerin izolasyonunda
DC protein assay reagent a+s+b kit, Biorad	Proteinlerin ölçümünde
96'lık Well plate, Roche	Proteinlerin ölçümünde
Biorad standart assay	Western blot analizi
Biorad Prot/Elec Tips Yükleme pipeti	Western blot analizi
Primer Antibody Casp3, Casp9, Bcl-2 Cell Signaling	Western blot analizi
Sekonder Antibody Anti Mouse, Rabbit	Western blot analizi

3.2.YÖNTEM

Sunulan tez çalışmasında meme kanserli hastalardan alınan dokular Şekil 8’de gösterildiği gibi sınıflandırılarak miRNA, gen ve protein ekspresyon çalışmalarının yapılması planlanmıştır.



Şekil 8.Çalışma grubunun oluşturulması ve çalışmada izlenen basamakların özetlenmesi

3.2.1.Hasta Seçimi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar etik kurulu başkanlığı tarafından 25/09/2019 yılında etik kurul onayı alınmıştır. Eylül 2019-Aralık 2021 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi polikliniğine başvuran, meme kanseri (malign) ya da fibroadenom (benign) ön tanısı almış ve cerrahi müdahale kararı verilmiş, 18 yaş üstü onam alınmış gönüllü hastalardan ameliyat sırasında alınacak tümörlü ve sağlıklı doku örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta yaş aralığı 18-87'dir. Hastaların ikisi erkek diğerleri kadındır (Tablo 5). Ameliyat sırasında 1cm'nin altında tümörü bulunan ve neoadjuvan tedavi alan hastalar çalışma dışında tutulmuştur.

Tablo 5. Meme kanseri hastalarının özellikleri.

HASTA	YAŞ	CİNSİYET	HİSTOLOJİK DERECE
PK	54	K	II
ND	35	K	I
SS	18	K	FA
MY	50	E	I
NA	76	K	II
ZB	61	K	II
MH	44	K	II
RT	42	K	III
ÜK	44	K	III
MÇS	39	K	III
CÖ	47	E	II
NA	41	K	I
NÖ	33	K	III
ŞGA	35	K	FA
SS	39	K	FA
ZT	32	K	II
HD	39	K	II
NE	34	K	I
AA	52	K	I
SS	39	K	II
GÇ	73	K	II
MS	87	K	III
SB	44	K	II
SY	58	K	I
TK	35	K	II
GG	44	K	III
MT	58	K	III
AG	51	K	III

AY	66	K	II
DY	55	K	II
KÜ	18	K	FA
AA	77	K	III
SŞ	44	K	II
MU	76	K	III
GA	47	K	I
DD	64	K	I
TCA	29	K	FA
AŞ	70	K	III
ŞG	30	K	FA
HB	75	K	I
ES	42	K	III
AB	64	K	II

FA: Fibroadenom

3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması

Kötü huylu (malign) ya da iyi huylu(benign) meme kanseri ön tanılı hastalardan ameliyat sırasında 0,5 cm, mercimek büyüklüğünde tümörlü doku örneği ve tümörlü dokuya komşu tümörlü olmayan doku örneği alınmıştır.

Alınan örnekler Avatherm F20 doku hücre taşıyıcısı kullanılarak Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)’ne transfer edilmiştir. GENKÖK Genom biriminde doku örnekleri sıvı azotta dondurularak deneylere başlanıncaya kadar -80°C ’de saklanmıştır.

3.2.3.Dokulardan RNA İzolasyonu

Büyüklüğü 50-100 ng arasında değişen tümörlü ve tümörlü olmayan komşu doku örnekleri üzerine yaklaşık 500 µl kadar Qiazole eklendi. Karışım beatli tüpe konularak magna lyzer cihazında dokunun homojenize hale gelmesi sağlandı. Vortekslendi ve buz üzerinde 5 dk bekletildi. Üzerine 100 µl kloroform eklendi. 15 sn vortekslendi. 15 dk buz üzerinde inkübe edildi. Sonrasında 12000 g’de 20 dk $+4^{\circ}\text{C}$ santrifüj edildi. Aköz faz yeni ependorf tüpe alındı. Aköz faz miktarına bağlı olarak 1:1 oranda izopropanol eklendi. Birkaç kez alt üst edildi. $+4^{\circ}\text{C}$ dolapta 1 gece bekletildi. Ertesi gün 12000 g’de 30 dk $+4^{\circ}\text{C}$ santrifüj edildi. Aköz faz kısmı atıldı. Pellet üzerine 1 ml %75 etanol eklenip, vortekslendi.7500 g’de 5 dk $+4^{\circ}\text{C}$ santrifüj edildi. Süpernatant

kısım atıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Pellet etrafı pellete zarar vermeyecek şekilde temizlendi. 5 dk kadar oda ısısında eppendorf tüpün ağzı açık bırakılarak beklendi. Alkolün uçması ve pelletin kuruması sağlandı. 30 µl nükleaz free water (NFW) ile pellet resüspanse edildi. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı nanodrop kullanılarak ölçüldü. NFW kullanılarak cihaz sıfırlandı ve RNA konsantrasyonu ve kalitesi belirlendi. Kullanılacağı zaman çıkarılmak üzere -80°C'de saklandı.

3.2.4. mRNA Ekspresyon Analizi

3.2.4.1. RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) eldesi

cDNA izole edilmek üzere RNA örnekleri -80°C'den çıkarıldı. Buz üzerinde erimesi sağlandı. Her biri 1000 ng'a göre ayarlandı ve RNA'ların konsantrasyonları eşitlendi. Su+RNA total hacmi 15 µl olarak belirlendi. Biorad marka Iscript cDNA izolasyon kiti kullanıldı. Aşağıdaki tabloda belirlenen miktarda bileşenler eklenerek bir reaksiyon karışımı hazırlandı ve üzerlerine su+RNA karışımı pipetaj yapılarak eklendi. Thermal cycler PCR cihazında aşağıda belirtilen programa konuldu.

cDNA Sentez	
Enzim reverse transkriptaz	1 µl
Su ve RNA	15 µl
5x Iscript Reaction	4 µl
Total Hacim	20 µl
Program	
25°C'de 5 dk	
46°C'de 20dk	
95°C'de 1 dk	
4°C'de ∞	

3.2.4.2. mRNA Ekspresyonu

Her bir hastanın tümörlü ve sağlıklı olmak üzere 2 doku örneğiyle çalışıldı. mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için kantitatif Real-Time PCR (QRT-PCR) uygulandı. Yukarıda anlatıldığı gibi cDNA elde edildikten sonra Biorad SYBR green supermiks ve Oligomer marka primer kullanılarak *Casp3*, *Casp9*, *Bcl-2* ve housekeeping olarak da *ACTB* genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi. Bunun için aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlardaki PCR reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra Light Cycler 480 Multiwell plate (Roche) içerisine 18'er µl karışımdan paylaştırıldı. Üzerine ikişer µl cDNA örneği pipetaj yapılarak ilave edildi. Plate kısa süreli santrifüj edildi ve Light Cycler 480 cihazında deney başlatıldı. Her bir örnek triple olarak çalışıldı.

mRNA Ekspresyonu	
NFW	6 µl
Primer	2 µl
Enzim	10 µl
cDNA	2 µl
Total hacim	20 µl
mRNA PCR Programı	
95°C’de 5 dk	
95°C’de 10 sn	
60 °C’de 10sn	
72°C’de 10sn (single)	
40°C’de 10sn	
40 döngü	

3.2.5. miRNA Ekspresyon Analizi

3.2.5.1. RNA örneklerinden cDNA Eldesi

cDNA izole edilmek üzere RNA örnekleri -80°C'den çıkarıldı. Buz üzerinde erimesi sağlandı. Takara cDNA sentez kiti kullanıldı. Aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi buffer ve enzimden 6,25 µl her tüpe dağıtıp sonrasında RNA örneğinden 3,75 µl pipetaj yaparak karışıma eklendi ve aşağıda belirtilen programa konuldu.

cDNA Sentez	
MRQ Buffer	5 µl
MRQ Enzim	1,25 µl
RNA	3,75 µl
Total hacim	10 µl
Program	
37°C'de 1 saat	
85°C'de 5 dk	
4°C'de ∞	

3.2.5.2. miRNA Ekspresyonu

Öncelikle izole edilen cDNA 'lar 1:5 oranında NFW ile dilüe edildi. Sonrasında Herbir miRNA 220 µl NFW ile sulandırıldı ve stok hazırlandı. Hedef miRNA ve housekeeping miRNA (U6) için aşağıda belirtilen farklı protokoller uygulanarak Takara SYBR green supermix kullanılarak miks hazırlandı. Önce reaksiyon karışımı Light Cycler 480 Multiwell plate eklendi. Sonrasında herbir cDNA örneğimiz pipetaj yaparak eklendi. Seal ile plate kapatılarak kısa bir spin yapıldı ve Light Cycler 480 cihazında aşağıdaki tabloda verilen programa konuldu. Örneklerimiz triple çalışıldı.

Her bir miRNA için

miRNA Ekspresyon	
Enzim 2x (Tb Green) 12,5 µl	
Su	7,5 µl
miRNA primer	2,5 µl
mRQ 3' primer	0,5 µl
cDNA	2 µl
Total	25 µl

U6 için

miRNA Ekspresyon	
Enzim 2x (Tb Green) 12,5 µl	
Su	9,5 µl
U6 Forward primer	0,5 µl
U6 Reverse primer	0,5 µl
cDNA	2 µl
Total	25 µl

miRNA PCR Programı		
95°C'de	15 dk	
94°C'de	15 saniye	40 döngü
55°C'de	30 saniye	
70°C'de	30 saniye	
60°C'de	15 saniye	

3.2.5.3. Protein İzolasyonu ve Western Blot

İyi ve kötü huylu tümörlü meme dokusu ile tümörlü dokulara komşu sağlıklı doku örneklerinde Casp3, Casp9, Bcl-2 proteinlerinin ifade düzeylerini western blot yöntemiyle analiz etmek için aşağıda belirtilen basamaklar uygulandı (Hamurcu ve ark., 2018; Hamurcu ve ark., 2019).

Basamaklar şu şekilde sıralanabilir:

- 1) Doku örneklerinin parçalanması ve protein izolasyonu
- 2) Proteinlerin jelde yürütülmesi
- 3) Membrana transfer işlemi ve blotlama
- 4) Antikorla muamele ve proteinleri görüntüleme

1) Doku örneklerinin parçalanması ve protein izolasyonu

Lizis işlemi; dokuların parçalanarak proteinlerin elde edilmesini sağlamaktır. Bunun için lizis solüsyonu hazırlanarak ve dokunun boyutuna göre yeterli solüsyon içerisinde parçalanması sağlandı.

Protein lizis solüsyonunun hazırlanması: 100 µl hücre lizis solüsyonu içine 0,4 µl sodyum florür (NaF), 1 µl proteaz inhibitör ve 1 µl fosfataz inhibitör eklendi. Miksin içersine konulan doku her 10 dk'da bir vortekslendi. Bu işlem doku parçalanana kadar tekrarlandı. 13000 rpm'de 20dk +4°C'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında izole edilen proteinler analize başlanıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Protein konsantrasyon hesaplama işlemi: Bu aşamada elde ettiğimiz proteinlerden 2 µl protein üzerine 1:7 dilüe olacak şekilde distile su ile seyreltme işlemi yapıldı. Dilüe örneklerimiz ve protein standartları 96'lık plate 5'er µl olarak dağıtıldı. Örnek ve standartlar çift çalışıldı. Örnekler ve standartlar üzerine ilk olarak reagent A + reagent S karışımından 20 µl, daha sonra reagent B'den de 175 µl eklenerek 3 dk homojenize olması sağlandı. Eliza okuyucuda ölçüm yapıldı.

2) Proteinlerin jelde yürütülmesi ve elektroforez

Ölçüm sonucumuza göre proteinlerimizin 40µl'de 40µg protein olacak şekilde konsantrasyonları hesaplandı. Her bir protein örneği jele yüklendi. Yürütme tamponu içerisinde elektrikli ortamda 2-3 saat yürütülerek proteinlerin ayrışması sağlandı.

3) Membrana transfer işlemi ve bloklama

Jelin büyüklüğüne göre membran ve filtre kağıtları kesildi. Membranın sağ üst köşesi etiketlendi. Membran önce methanol, sonra dH₂O'da bir süre bekletildi. Filtre kağıtları ve sünger transfer buffer içerisinde ıslatıldı. Yürütülen jel çıkartıldı ve sandviç modeline göre transfer aparatına yerleştirildi. Bu modele göre sırayla; sünger, filtre kağıdı, membran, jel, filtre kağıdı, sünger şeklinde yerleştirildi. Sonrasında transfer aparatı, transfer solüsyonu içeren transfer tankına yerleştirildi. Daha sonra, +4°C'de buz aküleri ile desteklenen transfer solüsyonu içerisinde 24 mA akımda bütün gece bekletilip proteinlerin jelden polivinilidinden membran (PVDF) membrana aktarılması sağlandı. Transferin sonunda membran, 1X TBS-T içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozu içeren solüsyonu ile bloklandı ve sonrasında membran 3 kez 5'er dakika periyotlarla çalkalayıcı üzerinde TBS-T solüsyonunda yıkandı.

4) Antikorla muamele ve proteinleri görüntüleme

Transfer işlemi tamamlanan membranlar hedefe yönelik primer antikorlarla (Casp3, Casp9, Bcl-2 ve β-Aktin) muamele edildi. Bunun için her bir primer antikor TBS-T ve süt tozu ile hazırlandı. +4°C'de gece boyunca çalkalayıcıda bekletildi. Ertesi gün membran TBS-T solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Sonrasında oda sıcaklığında primer antikora spesifik sekonder antikorla muamele edildi. Sonrasında membranlar yine aynı solüsyonla 3 kez yıkandı ve "BIO-RAD ChemiDoc MP Imaging System" cihazında görüntülendi. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanıldı. Hedef proteini Image J programı kullanılarak ölçüldü.

3.3.3. İstatistik Analiz

Gen ekspresyonu ve western blot analizleri için uygun kontrol ve referans genler çalışıldı. Gen ve protein ekspresyon verilerinin normalizasyonunda delta delta CT ($2^{-\Delta\Delta}$ CT) metodu kullanıldı. Verilerin normal dağılım uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Hastaların tümörlü ve sağlıklı dokularında Casp3, Casp9, Bcl-2 gen ekspresyonu ve protein ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak için paired t testi uygulandı. Moleküler alttıplerin karşılaştırılmasında ise unpaired t testi kullanıldı. Parametrik değişkenler için Wilcoxon, parametrik olmayan değişkenler için Mann-Whitney U kullanıldı. Her bir deney, 3 tekrar (n=3) olacak şekilde çalışıldı. Ayrıca miR-484 ifade düzeyi ile yaş ve Casp3, Casp9 arasındaki ilişki olup olmadığı da Spearman korelasyon analizi ile gösterildi. İstatistiksel analiz ve grafik çizimi için Graphpad 8.0 programı kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, ameliyat tipi, lokalizasyon, moleküler alt tip, tümör dereceleri, hormon reseptör varlığı veya yokluğu, Ki-67 yüzdesi gibi değişkenlere göre meme kanserli hastaların özellikleri Tablo 6’de gösterildi.

Tablo 6. Klinik, histolojik ve patolojik verilere göre meme kanserli hastaların gruplandırılması.

Hastaların Klinikopatolojik Verileri		Sayı
Hasta Sayısı		42
Yaş	≤50	25
	>50	17
Ameliyat Tipi	Mastektomi	30
	Lumpektomi	12
Lokalizasyon	Sağ Meme	24
	Sol Meme	18
Moleküler Alt tip	Luminal A	12
	Luminal B	12
	Her2+	5
	Triple Negatif	5
	Fibroadenom	6
	İn situ	1
	İnvaziv Duktal Karsinom	21
Histolojik Alt tip	İnvaziv Lobüler Karsinom	3
	Duktal Karsinom in Situ	1
	Diğerleri	6
	Fibroadenom	6
Tümör Grade	I	9
	II	15
	III	12
ER	Pozitif	23
	Negatif	7
PR	Pozitif	8
	Negatif	22
Her2+	Pozitif	12
	Negatif	17
Ki 67	≤ %10	12
	> %10	17

4.1. Ekspresyon Sonuçları

4.1.1. miR-484 Ekspresyon Profili

4.1.1.1. Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda miR-484 Ekspresyon Profili

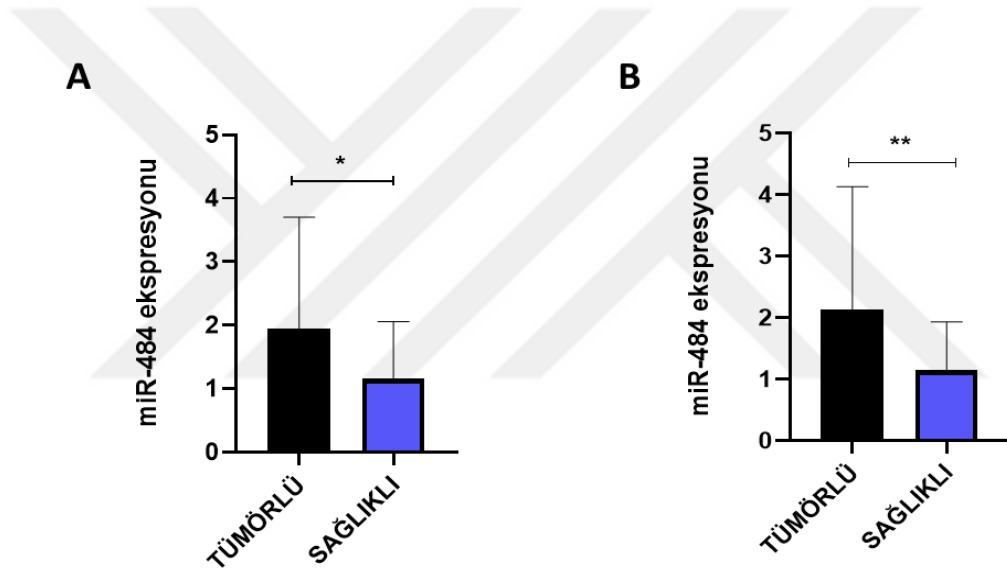
Çalışmamızda meme kanseri (malign) tanısı almış 36 hasta ve fibroadenom (benign) tanısı almış 6 hasta olmak üzere toplamda 42 hastanın tümörlü dokusu ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı doku örneklerinden demografik özelliklerine göre, DSÖ sınıflandırılması dikkate alınarak tümörün histolojik derecelerine, hormon reseptör durumu ve Ki-67 değerine bakılarak moleküler alt tiplere ayrılan hastaların tümörlü ve sağlıklı dokularda miR-484'ün ekspresyon seviyesi analiz edildi. miR-484 ekspresyon seviyeleri Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 7. Tümörlü ve sağlıklı meme doku örneklerinde miR-484 ekspresyon profili.

HASTA	YAŞ	HİSTOLOJİK DERECE	miR-484 EKSPRESYONU (2 ^{-ΔΔ} CT)	
			TÜMÖRLÜ	SAĞLIKLI
PK	54	II	0,31639	0,213123
ND	35	I	0,08189	0,823452
SS	18	FA	0,83495	0,578246
MY	50	I	1,27435	0,763001
NA	76	II	2,34527	1,156493
ZB	61	II	2,04168	3,55477
MH	44	II	3,65471	0,408882
RT	42	III	0,4352	4,227357
ÜK	44	III	0,74214	1,789748
MÇS	39	III	3,5795	2,329073
CÖ	47	II	2,39455	0,503393
NA	41	I	0,14966	1,101719
NÖ	33	III	2,60224	1,802196
ŞGA	35	FA	0,24652	0,444346
SS	39	FA	4,46839	0,562434
ZT	32	II	2,08458	1,579816
HD	39	II	2,36159	3,629463
NE	34	I	0,49646	0,394954
AA	52	I	0,37625	0,829179
SS	39	II	1,3377	0,823452
GÇ	73	II	2,60224	1,443685
MS	87	III	3,48161	1,049539
SB	44	II	4,49947	1,840064
SY	58	I	0,3035	0,668851
TK	35	II	1,77738	1,590804
GG	44	III	6,91513	0,570285
MT	58	III	0,11186	0,972491
AG	51	III	7,41145	0,965773
AY	66	II	1,26554	1,172637
DY	55	II	0,763	1,03509
KÜ	18	FA	1,8022	0,479551
AA	77	III	1,85286	0,800934
SŞ	44	II	0,38683	0,641604
MU	76	III	3,29381	1,04229
GA	47	I	7,99865	0,371068
DD	64	I	1,8022	0,486245
TCA	29	FA	2,21876	-
AŞ	70	III	2,82795	1,056839
ŞG	30	FA	0,22527	0,979255
HB	75	I	1,3377	1,071592
ES	42	III	0,99983	2,85295
AB	64	II	1,30112	0,521145

4.1.1.2. Malign ve Benign Tanısı Almış Hastalarda Tümörlü ve Tümörlü Dokuya Komşu Sağlıklı Meme Dokusu Örneklerinde miR-484 Ekspresyon Bulguları

Çalışmamızda, meme kanseri tanısı almış 36 (malign) hastadan ve fibroadenom tanısı almış 6 (benign) hastadan ameliyat sırasında alınan tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı meme doku örneklerinde miR-484'ün ekspresyon profili analiz edildi. miR-484 ekspresyon seviyesinin tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre daha yüksek olduğu bulundu ve bu farkın hem hastaların totalinde hem de malign grupta anlamlı olduğu görüldü (sırasıyla Şekil 9A $p=0.0155$, Şekil 9B $p=0.0065$).

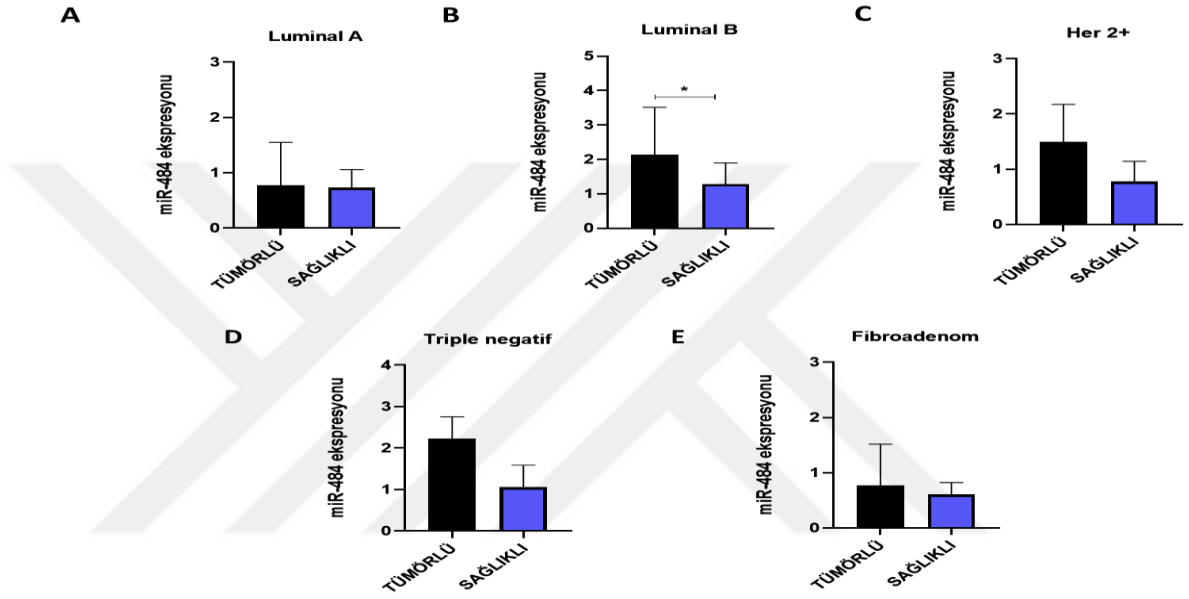


Şekil 9. Tüm hastaların tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı doku örneklerinde miR-484 ekspresyon seviyesi. **A.** Malign ve benign teşhisi konmuş tüm hastaların tümörlü dokusuyla sağlıklı doku örneklerinde miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. (* $p<0.05$) **B.** Sadece malign teşhisi konan hastaların tümörlü dokusuyla sağlıklı doku örneklerinde miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması (** $p<0.01$).

4.1.1.3. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplerinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokular Arasında miR-484 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

Ameliyat esnasında meme kanserli hastalardan alınan örnekler daha sonra klinikohistolojik ve patolojik verilerine göre Luminal A, Luminal B, Her 2+, Triple negatif olmak üzere moleküler alt tiplerine ayrıldı. Bu gruplara ek olarak

fibroadenom dokuları çalışmaya dahil edildi. Öncelikle her grupta hastanın tümörlü dokusu ile tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokusunda miR-484 ekspresyon seviyesi analiz edildi. Her bir moleküler alt tipte tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre miR-484 ekspresyon seviyesinde artış görüldü. Bu artış Luminal B moleküler alt tipinde istatistiksel olarak anlamlı iken ($p=0.0439$), diğer moleküler alt tiplerde ve fibroadenom grubunda ekspresyon artmış olsa da farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Şekil 10).



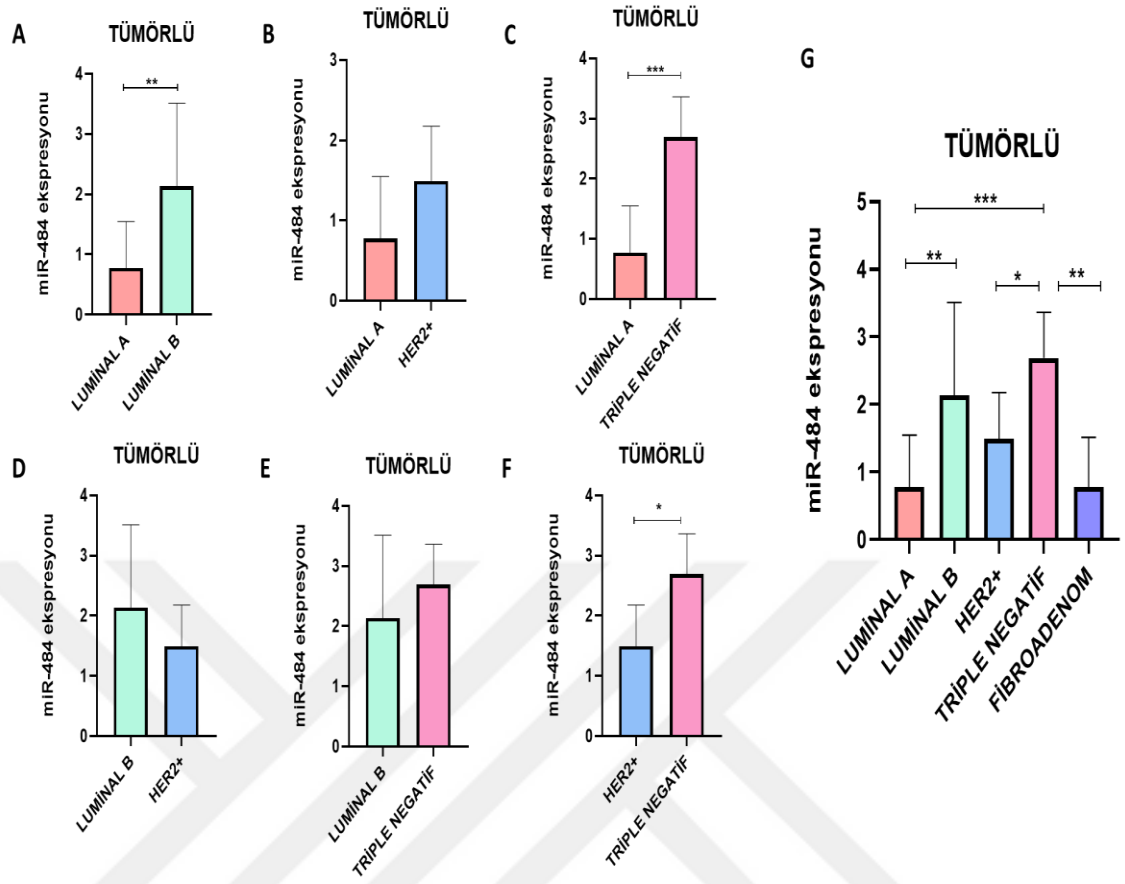
Şekil 10. Meme kanserinin moleküler alt tiplerinde tümörlü ve sağlıklı dokular arasında miR-484 ekspresyon bulguları. **A.** Luminal A alt tipli meme kanseri hastalarında tümörlü ve sağlıklı dokularda miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. **B.** Luminal B alt tipli meme kanseri hastalarında tümörlü ve sağlıklı dokularda miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması (* $p<0.05$). **C.** Her 2+ alt tipli meme kanseri hastalarında tümörlü ve sağlıklı dokularda miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. **D.** Triple Negatif alt tipli meme kanseri hastalarında tümörlü ve sağlıklı dokularda miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. **E.** Fibroadenom alt tipli meme kanseri hastalarında tümörlü ve sağlıklı dokularda miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması.

4.1.1.4. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplerinde Tümörlü Dokular Aarasında miR-484 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

Luminal A, Luminal B, Her 2+, Triple negatif meme kanserli moleküler alt tiplerde (malign) ve fibroadenom (benign) hasta grubundan alınan tümörlü dokularda miR-484 ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı (Şekil 11). Klinik seyri stabil ilerleyen ve

daha az agresif olan Luminal A grubunda sırasıyla agresifliği artan Luminal B, Her2+ ve triple negatif grubunda tümörlü dokularda miR-484 ekspresyon seviyesi karşılaştırıldı. Buna ek olarak tüm malign gruplar arasında da tümörlü dokularda miR-484 ekspresyon seviyesi analiz edildi. Luminal B moleküler alt tipli tümörlü dokularda Luminal A'ya kıyasla miR-484 ekspresyon seviyesinde artış olduğu bulundu ($p=0.0098$) (Şekil 11A). Her 2+ grubundaki hastalardan alınan tümörlü dokularda yine Luminal A grubuna kıyasla artış olduğu görüldü fakat bu artışın anlamlı olmadığı bulundu ($p=0.0973$) (Şekil 11B). Triple negatif grubunda ise Luminal A grubundaki tümörlü dokulara göre miR-484 ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak önemli oranda artış bulundu ($p=0.0008$) (Şekil 11C).

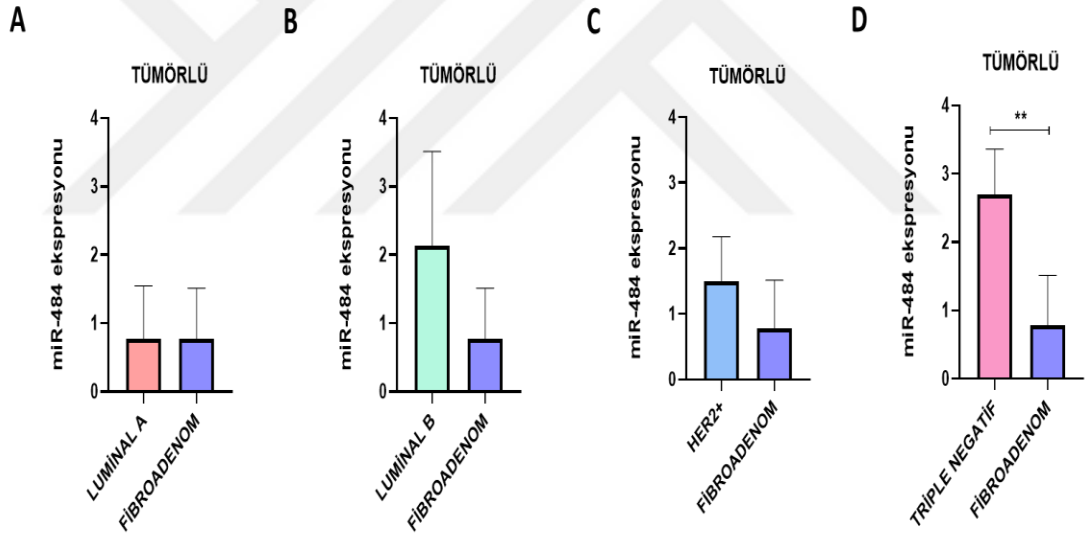
Luminal B ve Her2+ grubunda tümörlü dokularda miR-484 ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında Luminal B'de miR-484'ün ifade düzeyi daha fazla fakat artışın anlamsız olduğu bulundu (Şekil 11D). Luminal B ile Triple negatif grubu karşılaştırıldığında ise triple negatif grubunda tümörlü dokularda miR-484 ekspresyon seviyesinin fazla olduğu fakat farkın anlamsız olduğu görüldü (Şekil 11E). Her2+ ve Triple negatif grubunda tümörlü dokular karşılaştırıldığında triple negatif grubunun her gruba kıyasta olduğu gibi Her2+ grubuyla kıyasla da miR-484 ekspresyon seviyesi daha fazladır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.0338$) (Şekil 11F). Şekil 11G'de ise tüm tümörlü dokulardaki miR-484 ekspresyon seviyesi gösterildi. Fibroadenom grubundaki iyi huylu tümörle (benign) karşılaştırarak miR-484 ekspresyon seviyeleri arasındaki fark bulundu. Fibroadenom (benign) grubuna göre malign grupların hepsinde (Luminal A, Luminal B, Her2+, Triple negatif) miR-484 ekspresyon seviyesinde artış bulundu. Fibroadenoma göre agresiflik derecesi arttıkça miR-484 ekspresyon seviyesinin de arttığı net bir şekilde gösterildi. Fibroadenoma diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken sadece triple negatifle miR-484 ekspresyon seviyesi arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p=0.0086$) (Şekil 11G).



Şekil 11. Tümörlü dokuda moleküler alt tiplerde miR-484 ekspresyon profilinin karşılaştırılması. **A.** Luminal A moleküler alt tipiyle Luminal B moleküler alt tipinde miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. (** $p < 0.01$) **B.** Luminal A moleküler alt tipiyle Her 2+ moleküler alt tipinde miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. **C.** Luminal A moleküler alt tipiyle Triple negatif moleküler alt tipinde miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. (** $p < 0.001$) **D.** Luminal B moleküler alt tipiyle Her 2+ moleküler alt tipinde miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. **E.** Luminal B moleküler alt tipiyle Triple negatif moleküler alt tipinde miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. **F.** Her 2+ moleküler alt tipiyle Triple negatif moleküler alt tipinde miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. (* $p < 0.05$) **G.** Total olarak tüm moleküler alt tiplerde ve fibroadenom grubunda miR-484 ekspresyon profili. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.1.1.5. Meme Kanserinde Malign ve Benign Tümörlü Dokularda miR-484 Ekspresyon Bulguları

Meme kanserli hastalarda malign (Luminal A, Luminal B, Her2+, Triple negatif) ve benign (Fibroadenom) dokularda miR-484 ekspresyon seviyesi karşılaştırıldı (Şekil 12). Benign dokularda miR-484 ekspresyon seviyesinin düşük olduğu bulundu ($p =$ Luminal A ile fibroadenom dokusunda miR-484 ekspresyon seviyesinin hemen hemen aynı seviyede olduğu ve istatistiksel olarak da anlamlı olmadığı görüldü (Şekil 12A). Luminal B, Her2+, Triple negatif malign dokularında benign dokulara göre miR-484 ekspresyon seviyesinde artış olduğu görüldü (Şekil 12B, 12C) ve bu farklılardan sadece triple negatif ile arasında anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p=0.0086$) (Şekil 12D).



Şekil 12. Meme Kanserinde malign ve benign tümörlü dokularda miR-484 ekspresyon bulgularının karşılaştırılması. **A.** Tümörlü dokularda fibroadenom ile Luminal A moleküler alt tipinin karşılaştırılması. **B.** Tümörlü dokularda fibroadenom ile Luminal B moleküler alt tipinin karşılaştırılması. **C.** Tümörlü dokularda fibroadenom ile Her2+ moleküler alt tipinin karşılaştırılması. **D.** Tümörlü dokularda fibroadenom ile Triple negatif moleküler alt tipinin karşılaştırılması (** $p<0.01$).

4.1.1.6. Meme Kanserinde Tümörlü Dokuların Histolojik Derecelerinde miR-484 Ekspresyon Bulguları

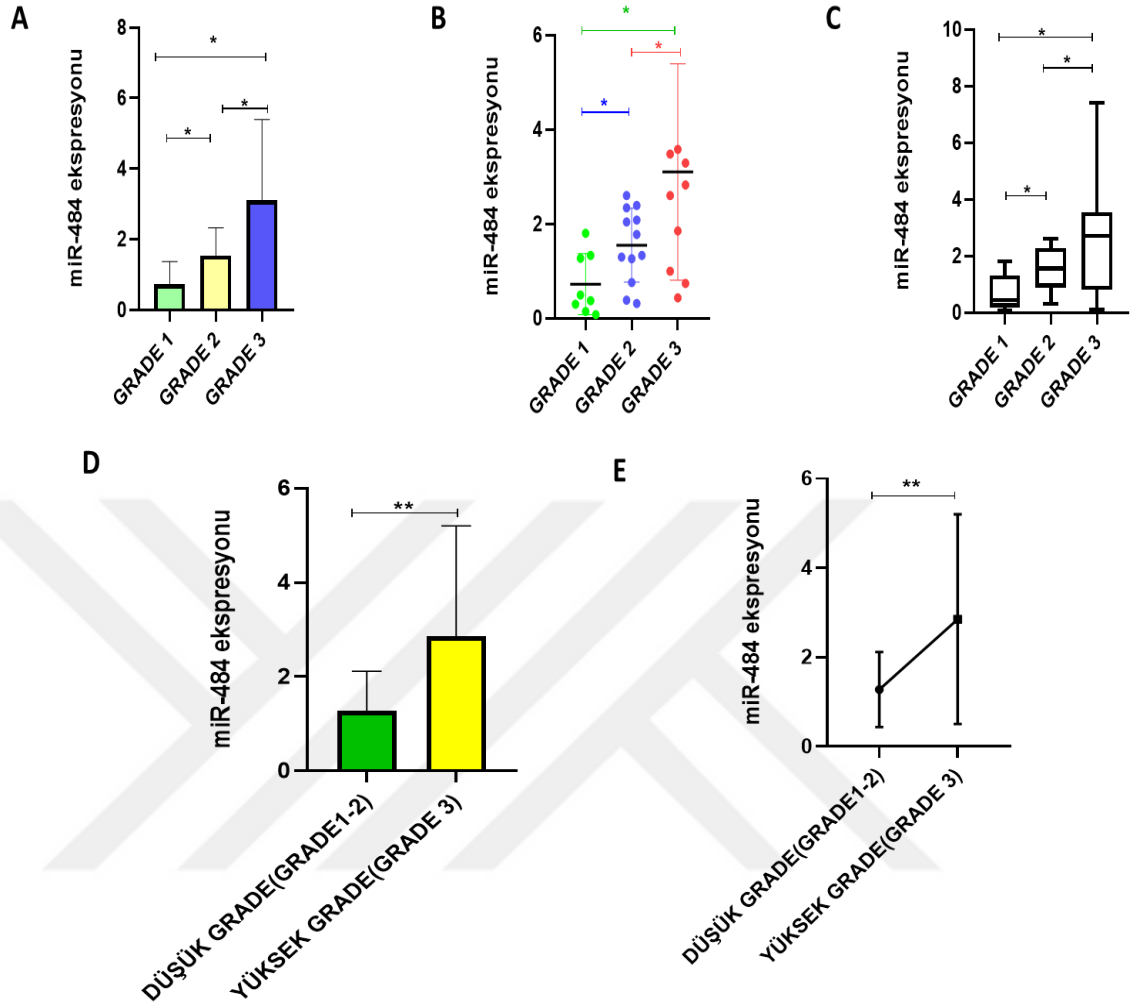
Meme kanserli hastalardan alınan doku örnekleri DSÖ sınıflandırması dikkate alınarak histolojik derecelerine göre gruplara ayrıldı. Her bir gruptaki sayı ve miRNA ekspresyon seviyelerinin ortalamaları Tablo 8’de gösterildi.

Tablo 8. Meme kanseri hastalarının histolojik derecelerine göre miR-484 profili.

Meme Kanseri Hastalarının Özellikleri	Sayı (n=36)	miR-484 ekspresyon profili (Ort $\pm$ SD)
Histolojik Derece-I	9	0,7277 $\pm$ 0,6474
Histolojik Derece-II	15	1,551 $\pm$ 0,7813
Histolojik Derece- III	12	2,854 $\pm$ 2,349

Ort: Ortalama, SD: Standart Hata

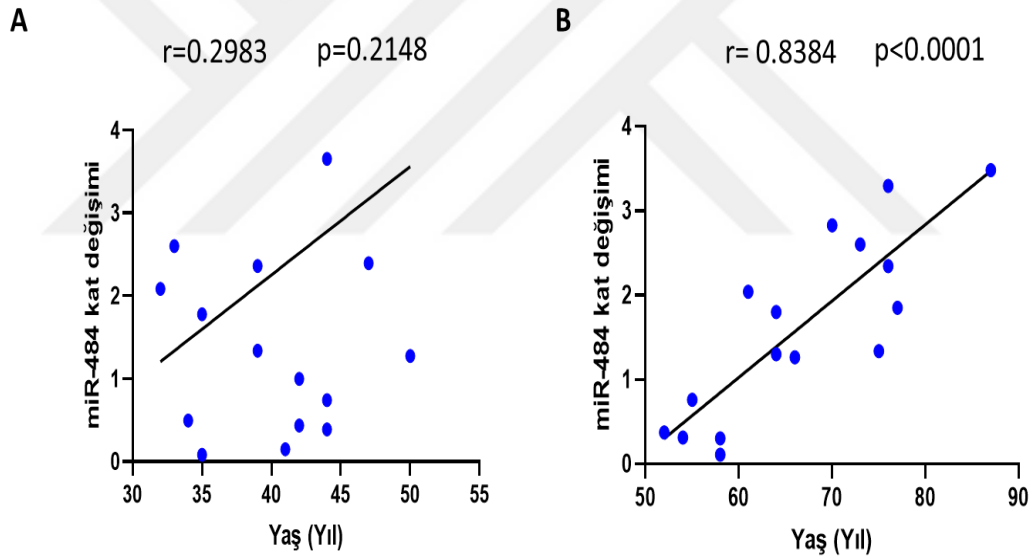
Alınan doku örnekleri histolojik derecelerine göre gruplandırılarak miR-484’ün ekspresyon seviyesi karşılaştırılmıştır. Histolojik derecesi III olan hastalarda histolojik derecesi II olan hastalara göre miR-484 ekspresyon seviyesinin arttığı görüldü ve bu farkın anlamlı olduğu bulundu ($p=0.0469$). Histolojik derecesi II olan hastalardaki miR-484 ekspresyon profili de histolojik dereceleri I olan hastalara kıyasla arttığı görüldü ve bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0345$). Aynı şekilde histolojik derecesi III olan hastaların histolojik derecesi I olan hastalara göre de miR-484 ekspresyon seviyesinde artış olduğu görüldü ($p=0.0234$). Hastaların histolojik derecelerine göre Derece-I, Derece-II ve Derece-III arasında miR-484 ekspresyon profili açısından istatistiksel olarak önemli bir farkın olduğu ve hastaların histolojik dereceleri arttıkça miR-484 ekspresyon seviyesinin de arttığı bulundu (Şekil 13 A,B,C). Ayrıca histolojik derecelerine göre hastaları düşük grade (Grade I ve Grade II) ve yüksek grade (Grade III) olarak karşılaştırdığımızda yüksek grade olan hastalarda miR-484 ekspresyonunun düşük grade olan hastalara göre arttığı bulundu ve bu farkın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0086$) (Şekil 13 D,E).



Şekil 13. Tümörlü dokularda histolojik derecelerine göre miR-484 ekspresyon bulguları. **Şekil A-C.** Histolojik dereceleri I, II ve III olan gruplarda miR-484 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (*p < 0.05). **D ve E.** Histolojik derecesi düşük (Derece I ve II) ve histolojik derecesi yüksek (Derece III) olarak ayrılan grupta miR-484 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması (**p<0.01).

4.1.1.7. Meme Kanserinde Yaş ve miR-484 Ekspresyon Seviyesi Arasındaki İlişki

Doku örneklerini alınan hastaların yaş ortalaması 52,5 olarak bulundu. Hasta örnekleri 50 yaş üstü ve 50 yaş altı olarak gruplandırıldı. Her 2 grupta da miR-484 ekspresyon seviyesiyle yaş arasında pozitif korelasyon olduğu bulundu. Böylelikle artan yaşla birlikte meme kanserine yakalanma riskinin de arttığı da desteklenmektedir. Şekil 14. A'da 50 yaş altı hastalarda artan yaşla birlikte miR-484 ekspresyon seviyesinde artış bulundu. Bu artış pozitif yönde fakat anlamsızdır ($r=0.2983$, $p=0.2148$). Şekil 14 B'de ise 50 yaş üstü hastalarda yine benzer şekilde artan yaşla birlikte miR-484 ekspresyon seviyesinde de pozitif yönde kuvvetli bir artışın olduğu bulundu. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($r=0.8384$, $p<0.0001$) (Şekil 14).

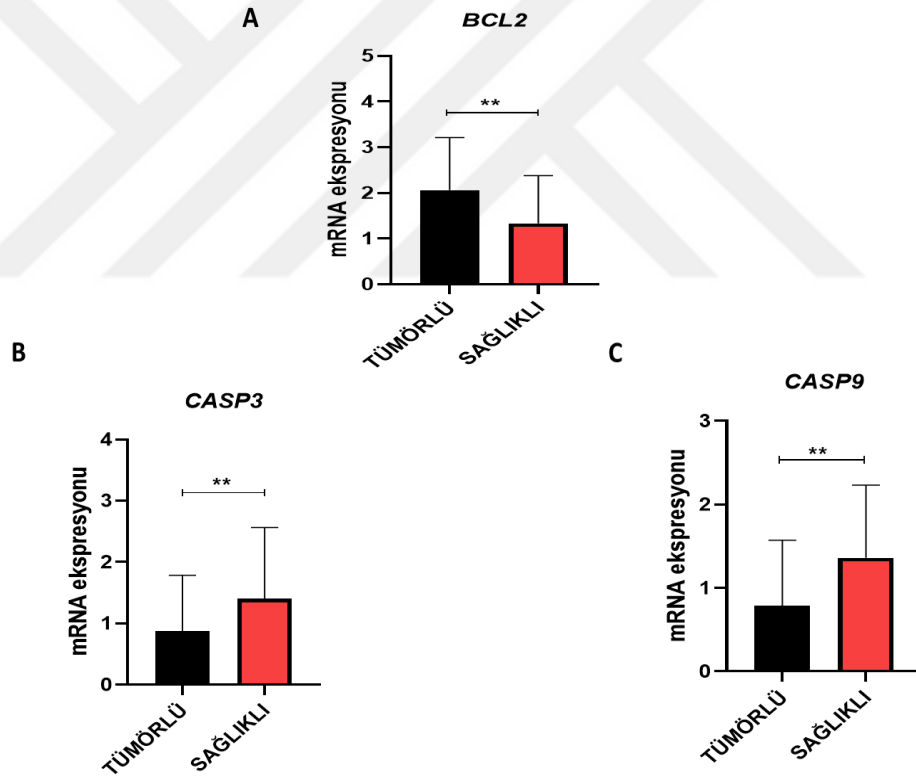


Şekil 14. Meme kanserinde yaş ve miR-484 ekspresyon seviyesi arasındaki korelasyon. **A.** 50 yaş altı hastalarda yaş ile miR-484 ekspresyon seviyesi arasındaki korelasyon sonuçları. **B.** 50 yaş üstü hastalarda yaş ile miR-484 ekspresyon seviyesi arasındaki korelasyon sonuçları (****p <0.0001).

4.1.2. Gen Ekspresyonu Bulguları

4.1.2.1. Meme Kanseri Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda *Bcl-2*, *Casp3*, *Casp9* Gen Ekspresyon Profili

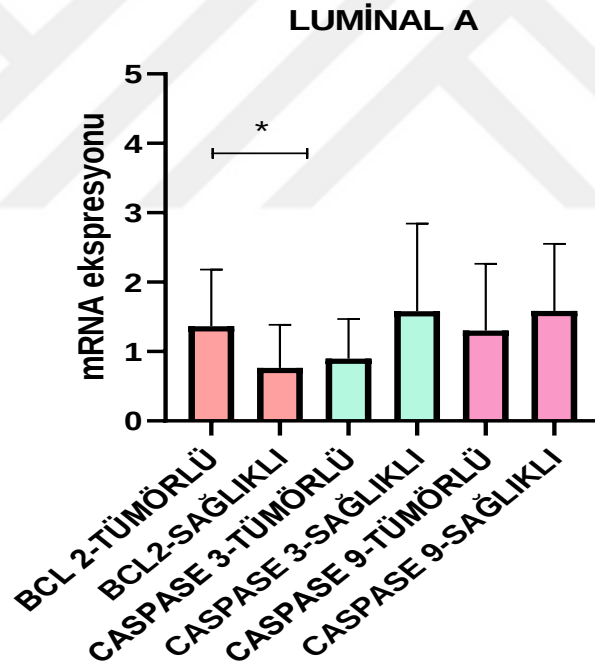
Çalışmamızda, meme kanseri tanısı almış 36 (malign) hastadan ve fibroadenom tanısı almış 6 (benign) hastadan ameliyat sırasında aldığımız tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı meme dokusu örneklerinde *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* genlerinin ekspresyon profili analiz edildi. *Bcl-2* gen ekspresyon seviyesinin tümörlü dokuda komşu sağlıklı dokuya göre arttığı bulundu. Bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0015$) (Şekil 15A). *Casp3* ve *Casp9* genlerinde ise tümörlü dokuda ekspresyon seviyesinin sağlıklı dokuya göre istatistiksel olarak azaldığı bulundu (*Casp3* $p=0.0083$, *Casp9* $p=0.0026$) (Şekil 15B, C).



Şekil 15. Meme Kanseri tümörlü ve sağlıklı dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* gen ekspresyon bulguları **A.** Tümörlü ve tümörlü olmayan sağlıklı meme dokusunda *Bcl-2* gen ekspresyon profili (** $p<0.01$). **B.** Tümörlü ve tümörlü olmayan sağlıklı meme dokusunda *Casp3* gen ekspresyon profili (** $p<0.01$). **C.** Tümörlü ve tümörlü olmayan sağlıklı meme dokusunda *Casp9* gen ekspresyon profili (** $p<0.01$).

4.1.2.1. Meme Kanseri Luminal A Moleküler Alt Tipinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* Genlerinin Ekspresyon Profili

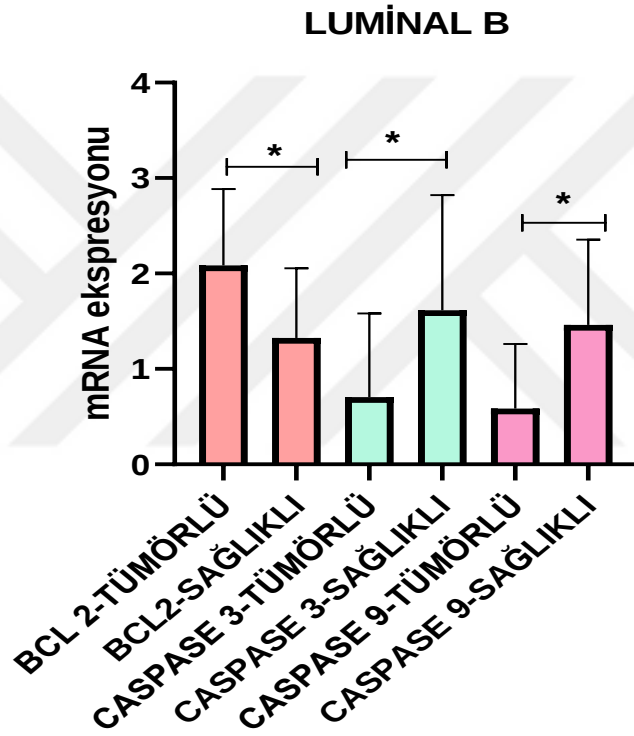
Ameliyat esnasında meme kanserli hastalardan aldığımız örnekler daha sonra klinikohistolojik ve patolojik verilerine göre moleküler alt tiplerine ayrıldı. Luminal A moleküler alt tipli hasta grubumuzda tümörlü doku ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokuda her bir gen ekspresyonu seviyesi belirlendi (Şekil 16). *Bcl-2* gen ekspresyonunun tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre arttığı bulundu bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0172$). *Casp3* ve *Casp9* genlerinde ise tümörlü dokulardaki ekspresyon seviyesinin sağlıklı dokulara göre azaldığı bulundu. Farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (*Casp3* $p=0.2500$, *Casp9*=0.4492) (Şekil 16).



Şekil 16. Meme kanseri Luminal A moleküler alt tipinde tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* genlerinin ekspresyon seviyesi ve birbirleriyle karşılaştırılması. (* $p<0.05$).

4.1.2.2.Meme Kanseri Luminal B Moleküler Alt Tipinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* Genlerinin Ekspresyon Profili

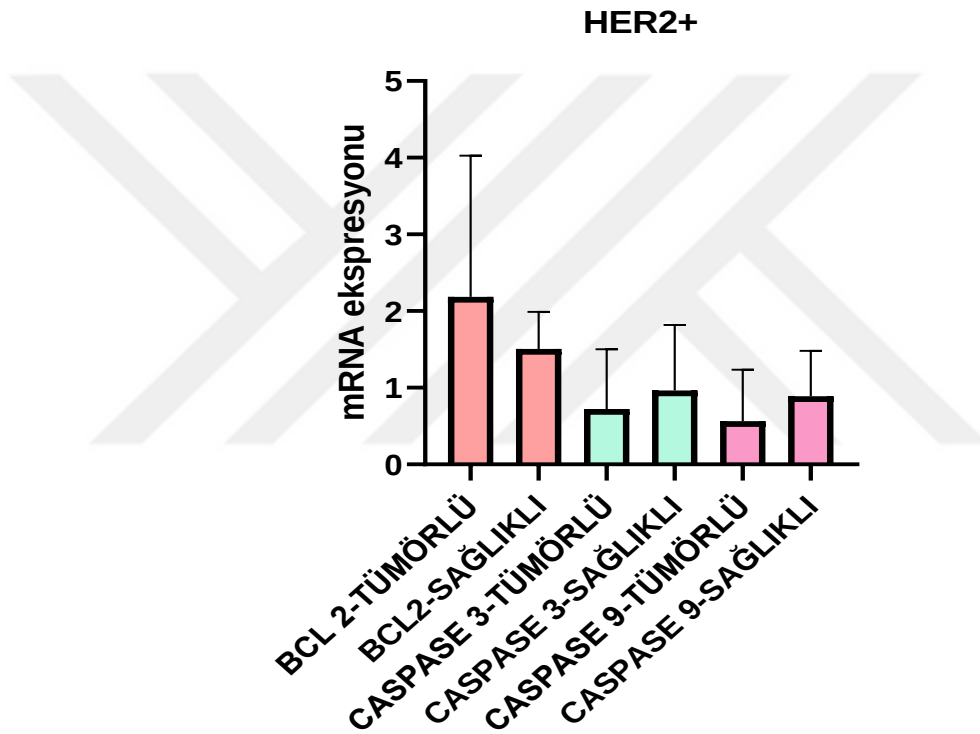
Luminal B moleküler alt tipli hasta grubumuzda tümörlü doku ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokuda her bir gen ekspresyonu seviyesi belirlendi (Şekil 17). *Bcl-2* gen ekspresyonunun tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre arttığı bulundu bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0469$). *Casp3* ve *Casp9* genlerinde ise tümörlü dokulardaki ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak sağlıklı dokulara göre azaldığı bulundu (*Casp3* $p=0.0420$, *Casp9* $p=0.0210$) (Şekil 17).



Şekil 17. Meme kanseri Luminal B moleküler alt tipinde tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* genlerinin ekspresyon seviyesi ve birbirleriyle karşılaştırılması (* $p<0.05$).

4.1.2.3. Meme Kanseri Her2+ Moleküler Alt Tipinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* Genlerinin Ekspresyon Profili

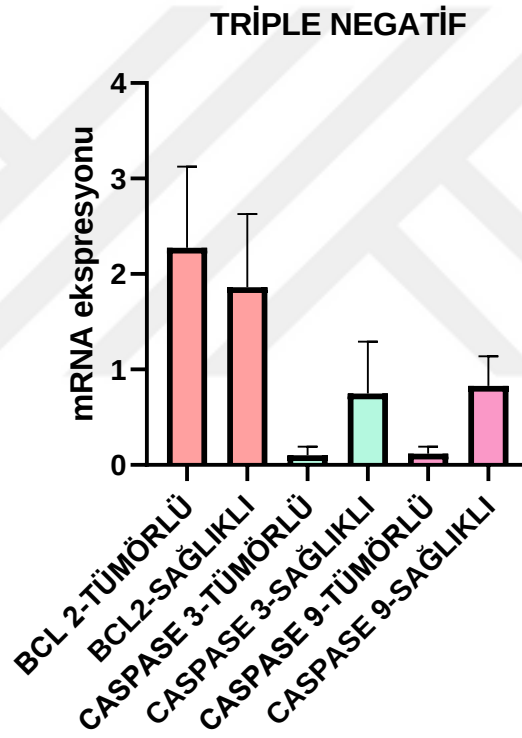
Her 2+ moleküler alt tipli hasta grubumuzda tümörlü doku ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokuda her bir gen ekspresyon seviyesi belirlendi (Şekil 18). *Bcl-2* geninin ekspresyon seviyesinin tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre arttığı bulundu($p=0.5599$) *Casp3* ve *Casp9* genlerinde ise tümörlü dokulardaki ekspresyon seviyesinin sağlıklı dokulara göre istatistiksel olarak azaldığı bulundu (*Casp3* $p=0.5443$, *Casp9*=0.3247).



Şekil 18. Meme kanseri Her 2+ moleküler alt tipinde tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* genlerinin ekspresyon seviyesi ve birbirleriyle karşılaştırılması.

4.1.2.4. Meme Kanseri Triple Negatif Moleküler Alt Tipinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* Genlerinin Ekspresyon Profili

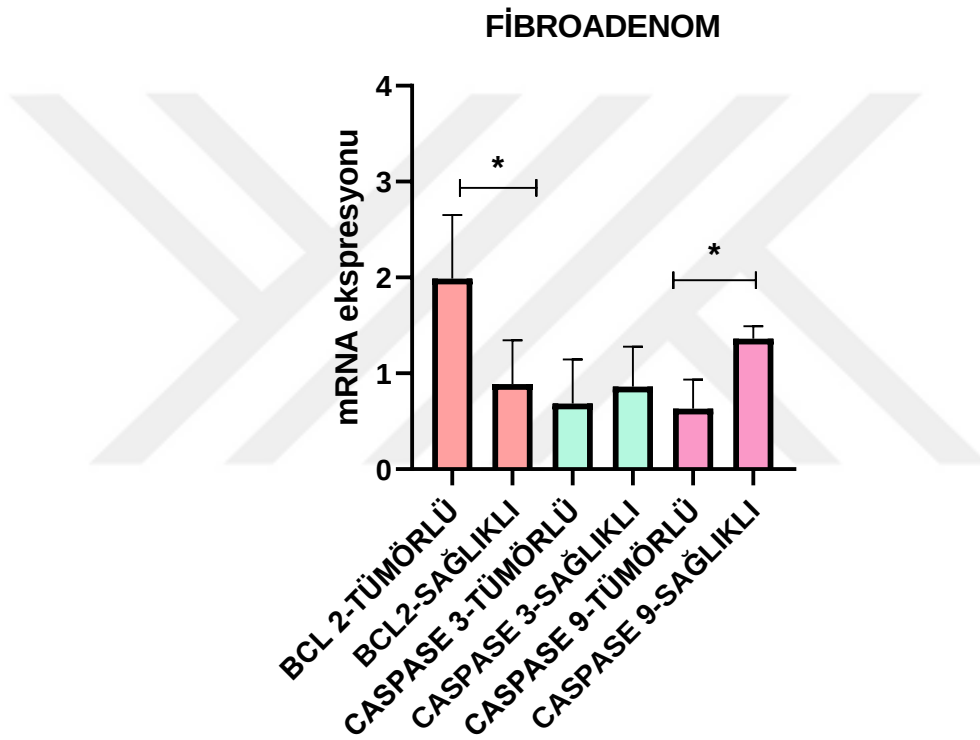
Triple negatif moleküler alt tipli hasta grubumuzda tümörlü doku ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokuda her bir gen ekspresyonu seviyesi belirlendi (Şekil 19). *Bcl-2* gen ekspresyon seviyesinin tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre arttığı bulundu ($p=0.5706$). *Casp3* ve *Casp9* genlerinde ise tümörlü dokulardaki ekspresyon seviyesinin sağlıklı dokulara göre istatistiksel olarak azaldığı bulundu (*Casp3* $p=0.1194$, *Casp9*=0.0708)



Şekil 19. Meme kanseri Triple Negatif moleküler alt tipinde tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* genlerinin ekspresyon seviyesi ve birbirleriyle karşılaştırılması.

4.1.2.5. Fibroadenom Alt Tipinde Tümörlü ve Sağlıklı Dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* Genlerinin Ekspresyon Profili

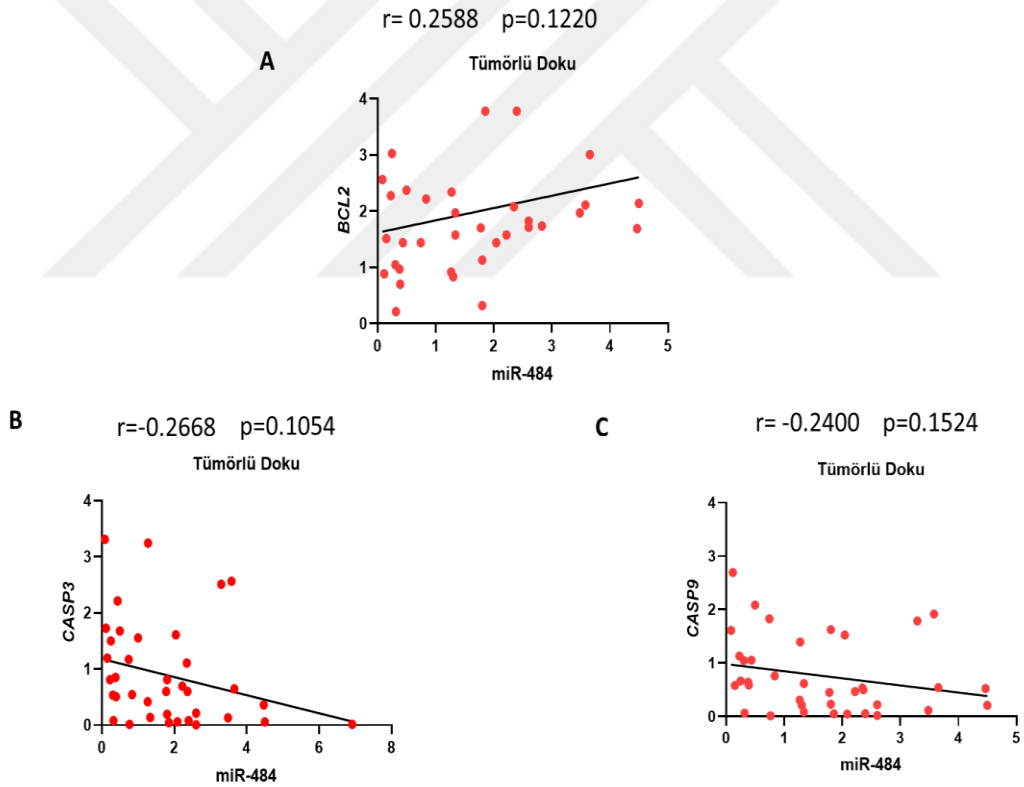
Fibroadenom alt tipli hasta grubumuzda tümörlü doku ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokuda her bir gen ekspresyonu seviyesi belirlendi (Şekil 20). *Bcl-2* geninin ekspresyon seviyesinin tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre arttığı bulundu ($p=0.0161$). *Casp3* ve *Casp9* genlerinde ise tümörlü dokulardaki ekspresyon seviyesinin sağlıklı dokulara göre istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı bulundu (*Casp3* $p=0.7256$, *Casp9* $p=0.0195$).



Şekil 20. Meme kanseri Fibroadenom grubunda tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı dokularda *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* genlerinin ekspresyon seviyesi ve birbirleriyle karşılaştırılması (* $p<0.05$).

4.1.3. miR-484 ile *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* Genleri Arasındaki Korelasyon Bulguları

Hastaların miR-484 ekspresyon seviyesi ile *Bcl-2*, *Casp3* ve *Casp9* gen ekspresyonu arasındaki ilişki analiz edildi. miR-484 gen ekspresyonu seviyesi artarken *Bcl-2* gen ekspresyonu seviyesinin de arttığı ve ikisi arasında pozitif yönlü bir ilişki olduğu bulundu ($r=0.02588$ $p=0.01220$) (Şekil 21A). Ancak miR-484 ekspresyon seviyesi artarken *Casp3*, *Casp9* gen ekspresyon seviyesinin azaldığı ve miR-484 ile *Casp3* ve *Casp9* arasında negatif yönlü bir ilişki olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (*Casp 3* $r=0.2668$ $p=0.1054$) (*Casp 9* $r=0.2400$ $p=0.1524$) (Şekil 21 B, C).



Şekil 21. miR-484 ile *Bcl-2*, *Casp3*, *Casp9* genleri arasındaki korelasyon bulguları **A.** miR-484 ile *Bcl-2* gen ekspresyonu arasındaki korelasyon bulguları. **B.** miR-484 ile *Casp3* gen ekspresyonu arasındaki korelasyon bulguları. **C.** miR-484 ile *Casp9* gen ekspresyonu arasındaki korelasyon bulguları.

4.1.4.Bcl-2, Casp3, Casp9 Proteinlerinin Ekspresyon Seviyeleri

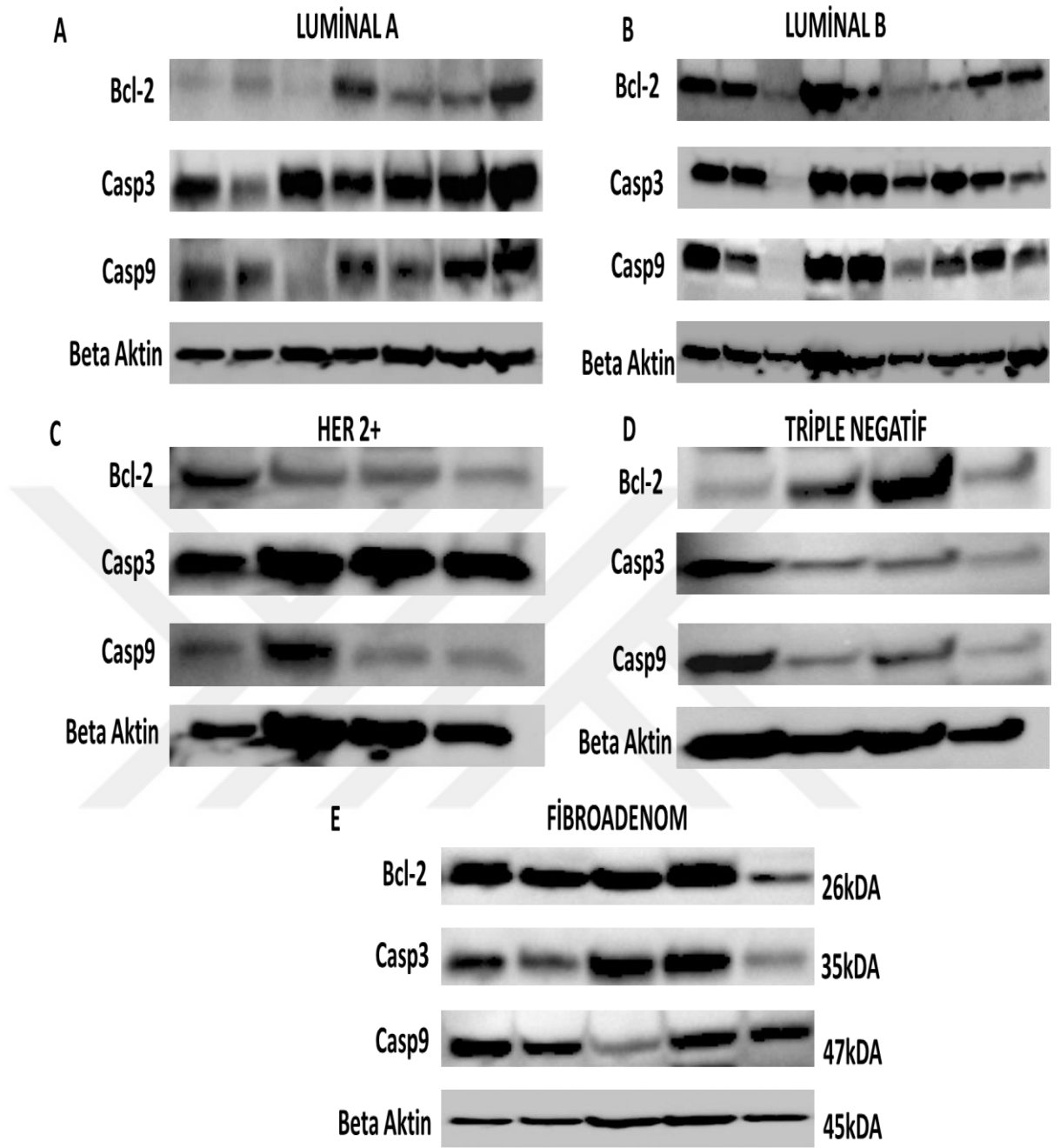
Meme kanserinde hastalardan alınan örnekler patolojik verilerine göre Luminal A, Luminal B, Her2+ ve Triple negatif alt tiplere ayrıldı. Bunlara ek olarak fibroadenom grubunda alınan örneklerde çalışmaya dahil edildi. Bu 5 farklı gruba ayırdığımız hastaların tümörlü dokularında Bcl-2, Casp3 ve Casp9 protein ekspresyonları analiz edildi.

Luminal A (n=7), Luminal B (n=9), Her2+ (n=4), Triple negatif (n=4) ve Fibroadenom (n=5) hasta gruplarında Bcl-2, Casp3, Casp9 protein ekspresyonları analiz edildi. Çalışılan hastaların listesi Tablo 9’da verildi.

Tablo 9. Meme kanseri protein ekspresyonu çalışılan hasta listesi.

Histopatolojik tip				
Luminal A	Luminal B	Her2+	Triple Negatif	Fibroadenom
PK	MH	HD	NÖ	SS
DK	RT	DY	MS	ŞGA
NA	ÜK	ES	GG	SS
NA	ZT	AB	AA	KÖ
NE	GÇ			ŞG
AY	TK			
GA	AG			
	AY			
	CÖ			

Tabloda belirtilen hastalardan alınan tümörlü dokularda Bcl-2, Casp3, Casp9 protein ekspresyon seviyeleri Şekil 22’de gösterilmektedir.



Şekil 22. Meme kanseri Luminal A, Luminal B, Her2+, Triple negatif moleküler alt tiplerinde ve fibroadenom grubumuzda Bcl-2, Casp3, Casp9 ve beta aktin protein membran görüntüleri. **A.** Meme Kanseri Luminal A moleküler alt tipinde tümörlü dokularda Bcl-2, Casp3, Casp9 protein membran görüntüleri. **B.** Meme Kanseri Luminal B moleküler alt tipinde tümörlü dokularda Bcl-2, Casp3, Casp9 protein membran görüntüleri. **C.** Meme kanseri Her 2+ moleküler alt tipinde tümörlü dokularda Bcl-2, Casp3, Casp9 protein membran görüntüleri. **D.** Meme Kanseri Triple Negatif moleküler alt tipinde tümörlü dokularda Bcl-2, Casp3, Casp9 protein membran görüntüleri. **E.** Fibroadenom grubunda tümörlü dokularda Bcl-2, Casp3, Casp9 protein membran görüntüleri.

4.1.4.1. Meme Kanseri Moleküler Alt Tiplerde Tümörlü Dokularda Bcl-2, Casp3 ve Casp9 Protein Ekspresyon Bulguları

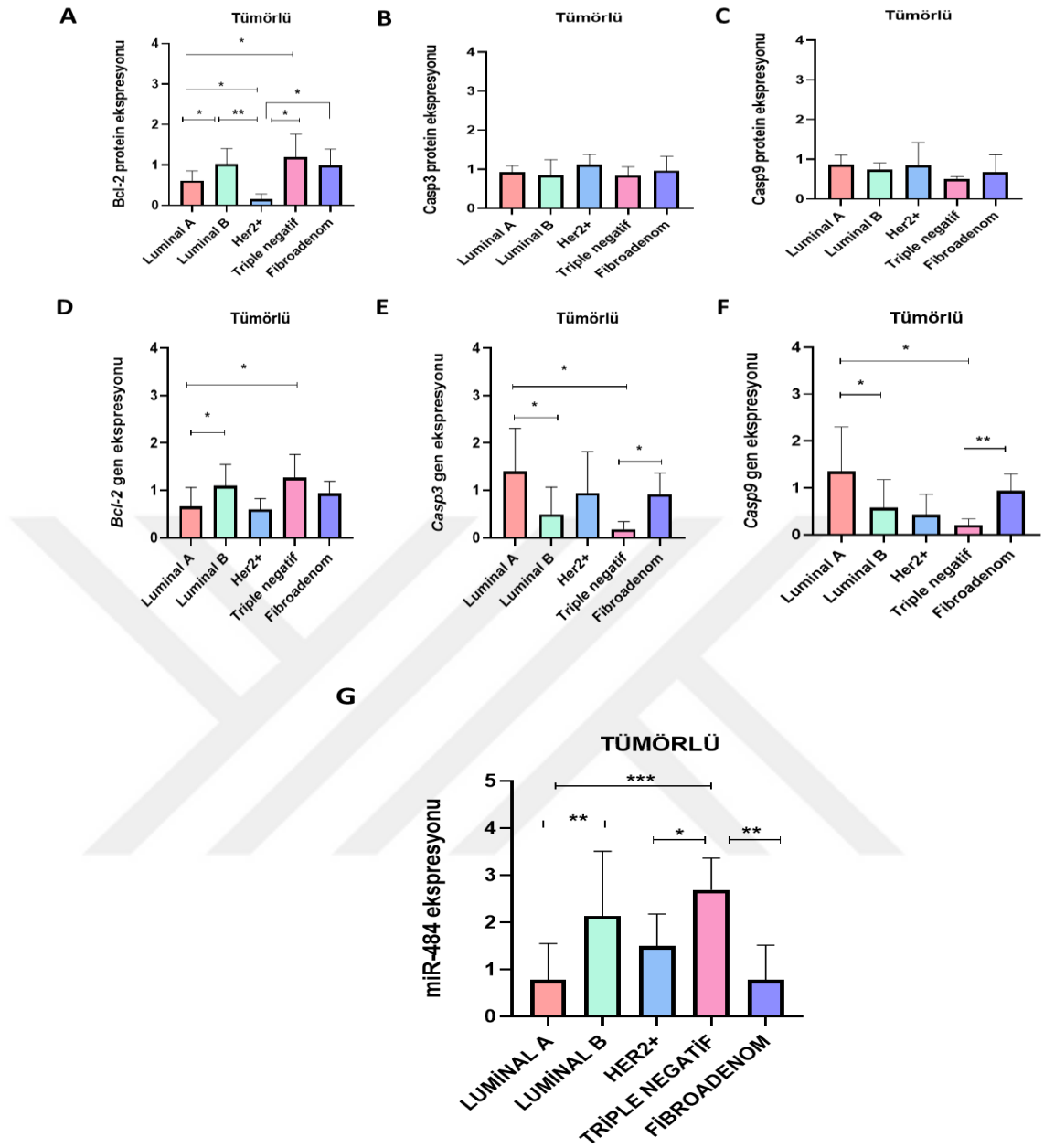
Western blot için seçilen hastalardan alınan dokularda protein ekspresyon seviyelerine bakıldı. Aynı hastaların gen ekspresyon seviyesi de kendi içerisinde analiz edildi ve bu sayede gen ve protein ekspresyonundaki bulgular birebir karşılaştırılmış oldu. Bcl-2 protein ekspresyon seviyesinin Luminal A, Her2+ ve Fibroadenom grubunda azaldığı görülürken, Luminal B ve Triple negatif grubunda arttığı görüldü. Tümörlü dokuda Bcl-2 protein ekspresyonunda Luminal A'ya göre Luminal B ve triple negatif moleküler alt tipi ve fibroadenom grubunda artış görüldü. Bu artışın Luminal B ve Triple negatifte istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (sırasıyla $p=0.0426$, $p=0.0491$). Her 2+ moleküler alt tipimizde ise Bcl-2 protein ekspresyonunun seviyesi Luminal A, Luminal B, Triple negatif ve fibroadenom grubuna göre azaldı. Farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. (Sırasıyla $p=0.0185$, $p=0.0048$, $p=0.0267$, $p=0.0132$) (Şekil 23 A). Bcl-2 gen ekspresyonu sonuçları ile Bcl-2 protein ekspresyonu sonuçları benzerdir. Luminal A, Her2+ ve Fibroadenom grubunda Bcl-2 gen ekspresyon seviyesinin azaldığı görülürken, Luminal B ve Triple negatif grubunda arttığı görüldü. Tümörlü dokuda Bcl-2 gen ekspresyonunda Luminal A'ya göre Luminal B ve triple negatif moleküler alt tipi ve fibroadenom grubunda artış görüldü. Bu artışın Luminal B ve Triple negatifte istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (sırasıyla $p=0.0285$, $p=0.0280$) (Şekil 23 D).

Tümörlü dokularda Casp3 protein ekspresyon seviyesinin azdan çoğa doğru Triple negatif, Luminal B, Fibroadenom, Her 2+ ve Luminal A şeklinde olduğu görüldü. Aradaki farklarınsa istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Şekil 23 B). Casp3 gen ekspresyonu sonuçları da Casp3 protein ekspresyonu sonuçlarıyla benzerdir. Herbir moleküller alt tipte Luminal A grubuna göre Casp3 gen ekspresyonunda azalma olduğu görüldü. Luminal A'ya göre Luminal B ve Triple negatif gen ifadesindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (sırasıyla $p=0.0251$, $p=0.0261$). Fibroadenom grubunda ise triple negatif grubuna göre gen

ekspresyon seviyesinde artış olduğu bulundu. Bu farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p= 0.0155$) (Şekil 23 E).

Tümörlü dokularda Casp9 protein ekspresyon seviyesinin azdan çoğa doğru Triple negatif, Luminal B, Fibroadenom, Her 2+ ve Luminal A şeklinde olduğu görüldü. Aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Şekil 23 C). *Casp9* gen ekspresyonu sonuçları da Casp9 protein ekspresyonu sonuçlarıyla benzerdir. Herbir moleküller alt tipte Luminal A grubuna göre *Casp9* gen ekspresyonunda azalma olduğu görüldü. Luminal A'ya göre Luminal B ve Triple negatif gen ifadesindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (Sırasıyla $p=0.0252$, $p=0.0403$). Fibroadenom grubunda ise Triple negatif grubuna göre gen ekspresyon seviyesinde artış olduğu bulundu. Bu farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0064$) (Şekil 23 F).

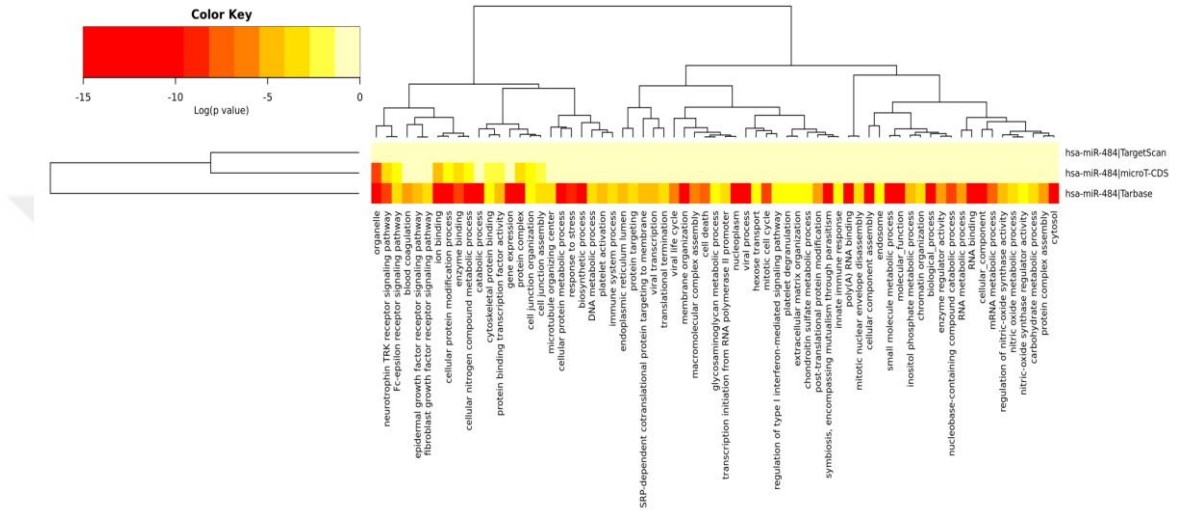
Meme kanseri tümörlü dokularda miRNA ekspresyon bulguları sonucunda miR-484 ekspresyonun fibroadenom grubunda en az olduğu, Triple negatif grubunda ise en fazla olduğu bulundu (Şekil 23 G). Bu bize miR-484'ün meme kanserinde onkogen olduğunu bir kez daha gösterdi. Buna paralel olarakda antiapoptotik gen olan Bcl-2'ninde protein ve gen ekspresyonu açısından miR-484 ile paralel olduğu gösterildi. Kanserleşme durumunda artan miR-484 ve apoptoza gitmeyi engelleyen Bcl-2 miktarındaki artış birbiriyle koreledir. Buna ek olarak Casp 3 ve Casp9 gen ve protein ekspresyonunda ise fibroadenom grubunda gen ifade düzeyinin en fazla olduğu, Triple negatif grubunda ise en az olduğu bulundu.



Şekil 23. Meme kanseri moleküler alt tiplerde tümörlü dokularda Bcl-2, Casp3 ve Casp9 protein ekspresyon bulguları ve gen ekspresyon bulgularıyla karşılaştırılması. **A.** Moleküler alt tiplerde tümörlü dokularda Bcl-2 protein ekspresyonu profili (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **B.** Moleküler alt tiplerde tümörlü dokularda Casp3 protein ekspresyonu profili. **C.** Moleküler alt tiplerde tümörlü dokularda Casp9 protein ekspresyonu profili. **D.** Moleküler alt tiplerde tümörlü dokularda Bcl-2 gen ekspresyonu profili. **E.** Moleküler alt tiplerde tümörlü dokularda Casp3 gen ekspresyonu profili. **F.** Moleküler alt tiplerde tümörlü dokularda Casp9 gen ekspresyonu profili (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **G.** Moleküler alt tiplerde tümörlü dokularda miR-484 ekspresyon profili.

4.1.5. miR-484 ile İlişkili Sinyal Yolakları

miR-484 birçok yolda görev almaktadır. DIANA TOOLS-mirPath v.3 programı kullanılarak yapılan KEGG ve GO analizlerine göre, miR-484'ün kanser ilişkili birçok yolda rol alan genlerle ilişkili olduğu bulundu. Şekil 24 ve Tablo 10 ve 11'de miR-484'ün ilişki olduğu yollar gösterilmektedir (Şekil 24) (Tablo 10,11).



Şekil 24. miR-484'e ait Heat Map Grafik (KEGG).

Tablo 10. miR-484 için KEGG Yolak Analizi

miR-484	
Yolak	p değeri
Fatty acid metabolism (hsa01212)	0.000476824920364
Adherens junction (hsa04520)	0.000526830659824
Lysine degradation (hsa00310)	0.00187272890897
Proteoglycans in cancer (hsa05205)	0.00911655261096
Focal adhesion (hsa04510)	0.0145751527598
Cell cycle (hsa04110)	0.0192201990111
Glioma (hsa05214)	0.0282005869051
Central carbon metabolism in cancer (hsa05230)	0.0282005869051

Tablo 11. miR-484 için GO Yolak Analizi.

miR-484	
Yolak	p değeri
Protein targeting (GO:0006605)	0.000113759444878
Carbohydrate metabolic process (GO:0005975)	0.000113897955354
Nitric oxide metabolic process (GO:0046209)	0.000129263721781
Activation of signaling protein activity involved in unfolded protein response (GO:0006987)	0.000129900864231
Fc-epsilon receptor signaling pathway(GO:0038095)	0.00017770347544
Transcription initiation from RNA polymerase II promoter (GO:0006367)	0.000265546081001
translational termination (GO:0006415)	0.000374904934063
Immune system process (GO:0002376)	0.000377722535744
Microtubule organizing center (GO:0005815)	0.000552321439372
Chromatin organization (GO:0006325)	0.000593065877661
Mitotic nuclear envelope disassembly (GO:0007077)	0.000893844049834
Fibroblast growth factor receptor signaling pathway (GO:0008543)	0.000903011610744
DNA metabolic process (GO:0006259)	0.000907865755697
Cell junction assembly (GO:0034329)	0.00093561066904
Nitric-oxidesynthaseregulator activity(GO:0030235)	0.00155612806649
Hexose transport (GO:0008645)	0.00169636947898
Glycosaminoglycanmetabolicprocess(GO:0030203)	0.00183363024908
Extracellular matrix organization (GO:0030198)	0.00206893550886
Platelet degranulation (GO:0002576)	0.00263359230327
Cell junction organization (GO:0034330)	0.00322297399671
Cellular component disassembly involved in execution phase of apoptosis (GO:0006921)	0.00332642916027
Endocytic vesicle lumen (GO:0071682)	0.00377794042687
Cytokine-mediatedsignaling pathway(GO:0019221)	0.00396701151036
Regulation of type I interferon-mediated signaling pathway (GO:0060338)	0.00446058376114
Innate immune response (GO:0045087)	0.00469003262702
Nuclear-transcribed mRNA catabolic process,nonsense-mediated decay (GO:0000184)	0.00517708865957
Endosome (GO:0005768)	0.00534820310017
Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis (GO:0038096)	0.00624399839145
Chondroitinsulfate metabolic process (GO:0030204)	0.00764454425598
ProteinN-linked glycosylation via asparagine(GO:001827)	0.00812274006606

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Kadınlarda en sık görülen kanser meme kanseridir. Meme kanseri kanser nedenli ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Her yıl yaklaşık 2 milyon yeni vakaya meme kanseri tanısı konmaktadır. Meme kanseri oranı, yaş, cinsiyet, hormonal bozukluklar, aile geçmişi, yaşam tarzı, populasyon artışı, fiziksel aktivite ve obezite gibi çeşitli risk faktörlerinden etkilenir (Sung ve ark.,2021). Hastalarda tarama ve erken tanı için mammografi altın standart olarak tercih edilmektedir. Tedavide ise geleneksel meme kanseri tedavilerinden cerrahi, radyasyon, kemoterapi ve hormon tedavisi kullanılmaktadır. Meme kanseri multifaktöriyel bir kanserdir. Meme kanserinin patogenezi tam olarak aydınlatılamadığından, tanı için etkili bir referans indeksi bulunmadığından, tanı ve tedavi için biyolojik göstergeler ve yeni hedefler klinik uygulamalarda araştırma odağı haline gelmiştir (Koh ve Kim, 2021). Klinik uygulamadaki en popüler hedef mikroRNA'lardır.

miRNA'lar 19-25 nükleotid büyüklüğünde küçük, kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar translasyonu inhibe ederek veya mRNA'ların susturulmasını tetikleyerek gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. miRNA'lar küçük kodlanmayan RNA molekülleri olarak post-transkripsiyonel gen regülasyonunda özellikle normal ve patolojik durumlarda çeşitli hücrel ve biyolojik olaylarda görevlidir. miRNA ekspresyonundaki bozulmalar kanser dahil birçok insan hastalığı için ortak özelliktir. Değişen miRNA ekspresyonları birçok insan malignitesinin patogenezi ile korelasyon gösterir, ki meme kanseri içinde miRNA'lar hem tanı hem de prognoz için çok değerli moleküler biyomarkırlardır (Elango ve ark., 2019). Meme kanserini etkileyen her bir yolda Ts-miR ve Onko-miR olarak rol oynayan

birçok miRNA'lar vardır (Nurzadeh ve ark., 2021). Bu miRNA'lardan biri de miR-484'tür.

Son yıllarda miR-484 ile ilgili birçok alanda çalışma yapılmıştır. Kanserle ilgili çalışmaların da popüler olduğu görülmektedir. miR-484 ile yapılan çalışmalarda sonuçlar birbirleriyle korele değildir. Kanser türüne göre miR-484'ün fonksiyonu değişiklik göstermektedir. Kimi kanser türünde miR-484 onkogen rol oynarken kiminde tümör supressör olarak davranmaktadır. Bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Mide kanserlerinde yapılan hem doku hem de hücre hattı çalışmalarında miR-484 ekspresyonun azaldığı ve mide kanserinin oluşumunda, gelişmesinde anti-kanser rolü oynadığı ve miR-484'ün artan ekspresyonunun hücre proliferasyonunu, tümörojeniteyi baskıladığı ve apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2020; Li ve ark., 2020).

Servikal kanserde de benzer şekilde Hu ve arkadaşları, miR-484'ün ZEB1 ve SMAD2'yi hedefleyerek hücre proliferasyonu ve epitelyal-mezenkimal geçişi baskıladığını gösterdi (Hu ve ark., 2017). Servikal kanserde yapılan bir diğer çalışmada ise miR-484'ün hücre adhezyonu, göçü, istilas ve EMT geçişinde yer alan MMP14-TNF eksenini ve HNF1A-Wnt eksenini inhibe ederek anti-kanser etkileri olduğu gösterilmiştir. Gastrik ve kolorektal kanserlerde miR-484'ün ekspresyonunun düşük olduğu ve tümör supressör olarak davrandığı belirlenmiştir (Hu ve ark., 2017; Zare ve ark., 2018; Lu ve Lu, 2015). Pankreas kanserinde ise miR-484'ün tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı kanıtlanmıştır. Bu da pankreas kanserinin erken teşhisi için umut verici arasındadır (Yin-Zhao ve ark., 2022).

Kolon kanserli hastalardan alınan serum örneklerinde ise evre 1-2'de miR-484'ün ekspresyon düzeyi belirgin şekilde azalmışken; evre 3-4'de miR-484'ün ifadesinde anormal bir artış olduğu görülmüştür. Bu da Lu ve arkadaşlarına kolon kanseri progresyonunun erken teşhisine ve izlenmesine yardımcı olabileceğini düşündürmüştür (Lu ve ark., 2015).

Prostat kanserli hastalarda da miR-484'ün onkogenik olarak rol oynadığı görülmektedir (Lee ve ark., 2020). Benzer şekilde hepatoselüler karsinomada,

yumurtalık kanserlerinde ve renal karsinomlarda da miR-484'ün ekspresyonunun yüksek olduğu ve hastalığın progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2017; Merhautova ve ark., 2015; Yang ve ark., 2016; Vecchione ve ark., 2013). Ayrıca küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde komşu sağlıklı dokulara göre tümörlü dokularda ve NSCLC hücre hatlarında ve akciğer normal hücrelerinde de miR-484 ekspresyonunun arttığı, NSCLC'nin ilerlemesini teşvik etmek için onkogen olarak işlev gördüğü çalışmada gösterilmiştir (Li ve ark., 2017). Renhui ve ark., yüksek miR-484 ekspresyonunun glioma hastaları için kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (Renhui ve ark., 2018).

Literatürde miR-484 ve meme kanseri ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda vardır. Meme kanserli hastaların serum örneklerinde miR-484'ün ekspresyonunun yüksek olduğu, hücrelerde proliferasyonu, kemorezistansı arttırdığı bildirilmiş ve onkogenik miRNA olarak davrandığı belirlenmiştir (Ye ve ark., 2015; Zearo ve ark., 2014). Benzer şekilde Halubekova ve ark., 39 erken evre meme kanseri hastasının serum örneklerinde miR-484 ekspresyon seviyesinin sağlıklı gönüllülere göre yüksek olduğunu göstermiştir (Halubekova ve ark., 2020).

Shi ve ark. invaziv meme kanserli hastalarda 253 hasta da miRNA profilinin karşılaştırmalı analizinden yüksek miR-484 seviyesinin kötü prognoz ile ilişkisi olduğu sonucuna varmışlardır (Shi ve ark., 2019). Volinia ve ark., invaziv duktal karsinomlu 466 hastanın miRNA veri analizinde miR-484 ile İDK hastalarının prognozu arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir (Volinia ve ark., 2013). Kabil ve ark.'da triple negatif meme kanserinde miR-484'ün onkogen olarak davrandığını göstermişlerdir. Ayrıca Wei ve ark., da östrojen reseptör ER+ meme kanseri hücrelerinde miR-484'ün tümör süpressör olarak rol oynadığını göstermişlerdir (Wei ve ark., 2021).

Bu çalışmada meme kanserli hastaların doku örnekleri kullanılmıştır. 6'sı benign 36'sı malign tümöre sahip 42 meme kanserli hastadan alınan tümörlü ve tümörlü dokuya komşu sağlıklı meme dokusu örneklerinde sağlıklı dokuya göre tümörlü dokuda miR-484'ün ekspresyonu yüksek bulundu. Ayrıca alınan doku örnekleri histopatolojik özelliklerine göre sınıflandırarak hastalar Luminal A, Luminal B, Her

2+, Triple negatif moleküler alt tiplere ayrıldı ve fibroadenom grubu da dahil edildi. Bu 5 grup kendi içerisinde miR-484 ekspresyon seviyeleri analiz edildiğinde tüm gruplarda tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre miR-484 ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu bulundu. Ayrıca tümörlü dokularda fibroadenom grubunda (benign tümör) diğer moleküler alt tiplere sahip (malign) gruplar karşılaştırıldığında miR-484 ekspresyon seviyesinin fibroadenom grubunda en azken; sırasıyla Luminal A, Her2+, Luminal B ve triple negatif grupların ekspresyon seviyesinin arttığı belirlendi. Ayrıca malign grup kendi içerisinde karşılaştırıldığında seyri en hafif, stabil grup olan Luminal A'da miR-484 ekspresyon seviyesinin en düşük olduğu, en agresif tip olan triple negatifte ise miR-484 ekspresyon seviyesinin en yüksek olduğu bulundu. Bu da bize meme kanserinde agresiflik arttıkça miR-484 ekspresyon seviyesinin de arttığını kanıtlamış oldu.

Çalışmaya dahil edilen malign tümöre sahip 36 hastadan, DSÖ meme kanseri sınıflandırmasına göre 9 hasta derece-I, 15 hasta derece-II, 12 hasta derece-III olarak sınıflandırıldı. Bu hastaları histolojik derecelerine göre ayrıldığında da derecesi I olan hasta grubunda miR-484 ekspresyon seviyesi en düşüktür. Derece arttıkça miR-484 ekspresyon seviyesinin de arttığı bulundu. Elde edilen verilere göre moleküler alt tipler ve histolojik dereceler düşünüldüğünde artan agresiflikle birlikte miR-484'ün ekspresyonunun istatistiksel olarak önemli oranda arttığı gösterildi. Sonuçlarımızın meme kanserinde miR-484'ün onkogen olarak rol oynadığına da ışık tutarak literatürde bahsedilen önceki bazı verileri de desteklediği bulundu (Ye ve ark, 2015; Zearo ve ark, 2014; Halubekova ve ark., 2020).

Ayrıca artan yaşla birlikte meme kanserine yakalanma oranının da arttığı bilinmektedir. Yaş ile miR-484 ekspresyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında da artan yaşla birlikte miR-484 ekspresyonunda da artış olduğu bulundu. Bizim çalışmamızda meme kanserinde aynı hastanın tümörlü ve sağlıklı dokusunu kullanarak bireysel farklanmalar devre dışı bırakılmış, tümörlü ve sağlıklı doku arasındaki miR-484 ekspresyon farkı net bir şekilde ortaya konulmuştur. Bu da kanserin ortaya çıkmasında miR-484'ün etkisinin olabileceği hipotezimizi doğruladı. Aynı hastaya ait malign ve benign dokuların kullanılması da çalışmamızı özgün kılmaktadır.

Apoptoz, kaspaz kaskadının aktivasyonuna bağlı olarak meydana gelen programlanmış hücre ölümü sürecidir. Apoptoz i  dengenin sağlanması, yaralı, enfekte veya görevini tamamlamış hücrelerin uzaklaştırılmasında, hücresel gelişimde ve hastalık patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (Marzieh Asadi,2021). Apoptozda intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere 2 temel yolak görevlidir. İ trinsik yolağın kilit proteinlerden birisi Bcl-2'dir. Kaspazlar ise her iki yolda da görev yapan proteazlardır. Bcl-2 proteinindeki dengesizlikler ve kaspazların fonksiyonlarındaki azalma hücrenin apoptozdan kaçarak anormal şekilde çoğalmasında rol oynayan sebeplerdendir (Marziehve ark., 2021).

Kanser ve apoptoz arasındaki i lişkinin aydınlatılması için birçok çalışma yapılmaktadır. Yang ve ark., *Casp3* gen ekspresyonunun artmasının meme kanserinde kötü prognoz ile i lişkili olduğunu ve genel sağkalım üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu gösterdi (Yang ve ark., 2018). Yine başka bir çalışmada meme kanserli hastaları 17,5 yıl takip edilmiş ve serum örneklerinden Bcl-2 ve p53 miktarlarına bakılmıştır. Serum Bcl-2 ve p53 miktarı sağlıklılara göre hastalarda yüksek bulunmuştur. Yüksek Bcl-2 seviyelerine sahip hastalar, düşük Bcl-2 değerlerine sahip olanlardan daha kötü prognoza (17,5 yıllık sağkalım) sahip olduğu bulunarak bu durumun tümör ağressifliği ile de i lişkisi olduğu vurgulanmıştır (Sirotković-Skerlev ve ark., 2021). Pankreas kanserinde anti-apoptotik protein Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun kemoterapiye kötü yanıt alınmasına yol açtığı ve Bcl-2'nin kanser için potansiyel bir terapötik hedef olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2018). Li ve arkadaşları akciğer kanserinde 20 hastada tümörlü ve komşu sağlıklı doku örneklerinde miR-484, *Casp3* ve *Apaf1* ekspresyon seviyesini değerlendirdiler. Tümörlü dokularda miR-484 ekspresyonunun yükseldiğini akciğer kanserinde onkogen olarak rol oynadığını göstermişlerdir. Artan miR-484 ekspresyon seviyesinin hücre proliferasyonunu artırarak hücre büyümesini teşvik ettiğini, *Apaf-1* ve *Casp3*' n ekspresyonunu ise azaltarak apoptozu baskılandığını bulmuşlardır (Li ve ark., 2017).

Asadi ve ark., kolorektal kanserde 50 hastada tümörlü ve komşu sağlıklı doku örneklerinde *Casp3*, *Casp8* ve *Casp9* genlerinin ekspresyon seviyelerine

bakmışlardır. Sağlıklı dokulara göre tümörlü dokularda *Casp3* ve *Cas9* gen ekspresyonunun azaldığını, *Casp8* ekspresyonunun ise arttığını bulmuşlardır (Asadi ve ark., 2018). Zhang ve ark., 2019 yılında triple negatif meme kanseri hastalarında doku ve hücre hattında miR-224'ün ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Artan miR-224 seviyesinin ise *Casp9*'u baskıladığı ve apoptoz yolunu inaktive ettiğini belirlemişlerdir (Zhang ve ark., 2019). Yapılan bu çalışmada meme kanserli hastalardan alınan doku örneklerinde sağlıklı dokuya göre tümörlü dokularda *Casp3*, *Casp9* gen ve protein seviyelerin de azalma, *Bcl2* gen ve protein seviyesinde ise artma olduğu bulundu.

Hücre göçü, invazyonu, proliferasyonu ve apoptoz miRNA'lar tarafından yönlendirilebilir (Li ve ark., 2017). Tümörögenез sırasında miRNA'lar tümör süpressör gibi davranarak onkogenik iletişim modülasyonunu düzenlerler veya onkogen gibi davranarak anti-tümör hücreyel yolları baskırlar (Elango ve ark., 2017). Bu çalışma ile meme kanserinde miR-484'ün onkogenik rol oynadığı belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen ana bulgular aşağıda belirtildiği şekildedir:

- Hastalar hem derecelerine göre hem de moleküler alt tiplerine göre sınıflandırıldığında miR-484'ün meme kanseri için kötü prognozla ilişkili olduğu bulundu.
- Çalışmamızda kontrol örneği kullanmayıp hastanın tümörlü ve sağlıklı doku örneklerini kullanarak bireysel farklılıklar elimine edilmiş oldu.
- Onkogenik özellik gösteren miR-484'ün artan ekspresyonu apoptozun mitokondriyal yolağını baskılayarak hücrelerin apoptoza gitmesini durdurabileceğini gösterdi.
- İntrinsik yolda antiapoptotik olarak görev yapan Bcl-2'nin ekspresyonunun sağlıklı dokuya göre tümörlü dokuda artış göstermesinin de apoptozun baskılanmasına neden olabileceği gösterildi.
- Tümörlü dokularda *Casp3* ve *Casp9* gen ve protein ekspresyonunda azalma görülürken, sağlıklı dokularda ise artış görülmektedir. Bu da bize kanserde koruyucu

gen olarak düşündüğümüz kaspazların sağlıklı dokularda görevini yapabilirken tümörlü dokularda baskılandığını, miktarının azaldığını ve koruyucu olarak görev yapamadığını buna paralel olarak da apoptoza gidişin baskılandığını ve tümörögenезin desteklendiğini göstermektedir.

- Tümörlü meme dokularında mitokondriyal apoptotik yolda onko-miR olarak görev yaptığını düşündüğümüz miR-484 ve artan Bcl-2 ekspresyonu ile azalan Casp3, Casp9 ekspresyonunun apoptozu baskılayabileceğini göstermektedir.

Bu yönlerden çalışmamızın literatüre yeni bilgiler kazandırdığını düşünmekteyiz. İlerleyen çalışmalar için daha fazla hasta sayısı ile ilgili olduğunu düşündüğümüz yolda daha fazla belirteç incelenerek, meme kanser alt tiplerini daha da spesifikleştirip özellikle en agresif tip olan triple negatif meme kanserinde çalışmanın devam ettirilmesini önermekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- Abd-Elhamid RA, Nazmy MH and Fathy M. Targeting Apoptosis as a Therapeutic Approach in Cancer. MJMR,2020; 321-334
- Ahmadpour S & Hosseinimehr SJ. Recent developments in peptide-based SPECT radiopharmaceuticals for breast tumor targeting. Life Sciences,2019; 239, 116870.
- Akram M, Iqbal M, Daniyal M, & Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. Bio Research, 2017; 1–23.
- Aldrees R, Gao X, Zhang K, Siegal GP. Validation of the revised 8th AJCC breast cancer clinical prognostic staging system : analysis of 5321 cases from a single institution. Mod Path, 2021; 291–299.
- Alkabban FM, & Ferguson T. Breast Cancer. StatPearls Publishing, 2022
- Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, Vakili O, Taheri-Anganeh M, Tahamtan M, & Savardashtaki A. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. Biotechnol Appl Biochem, 2021; 1-1
- Asadi M, Shanebandi D, Kermani TA, SanaaT Z, Zafari V, Hashemzadeh S. Expression Level of Caspase Genes in Colorectal Cancer. Asian Pac J Cancer Prev, 2018; 19 (5), 1277-1280
- Bou-Dargham, MJ, Draughon S, Cantrell V, Khamis ZI & Sang QXA. Advancements in human breast cancer targeted therapy and immunotherapy. J Cancer,2021; 13(23), 6949–6963.
- Britt KL, CuzickJ & Phillips KA.Key steps for effective breast cancer prevention. Nat Rev Cancer, 2020; 20(8), 417–436.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F & Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99(24), 15524–15529

- Carneiro BA, & El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020;17(7), 395–417
- Cava C, Bertoli G & Castiglioni I. Pathway-based expression profile for breast cancer diagnoses. *Annu Int Conf IEEE Eng Med and Biol Soc*, 2014; 1151–1154.
- Cheng P, Huang Q, Shou J, Hu G, Han M, Huang J. Treatment and survival outcomes of lobular carcinoma in situ of the breast: A SEER population based study. *Oncotarget*, 2017; 8(61), 103047–103054.
- Conti I, Varano G, Simioni C, Laface I, Milani D, Rimondi E & Neri LM. miRNAs as Influencers of Cell-Cell Communication in Tumor Microenvironment. *Cells*, 2020; 9(1).
- Correia de Sousa M, Gjorgjiev M, Dolicka D, Sobolewski C & Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci*, 2019;20(24).
- Deshmukh SK, Srivastava SK, Poosarla T, Dyess DL, Holliday NP, Singh AP & Singh S. Inflammation, immunosuppressive microenvironment and breast cancer: opportunities for cancer prevention and therapy. *Ann Transl Med*, 2019; 7(20), 593–593
- Elango R, Alsaleh KA, Vishnubalaji R, Manikandan M, Ali AM, Abd El-Aziz N, Altheyab A, Al-Rikabi A, Alfayez M, Aldahmash A and M. Alajez N. MicroRNA Expression Profiling on Paired Primary and Lymph Node Metastatic Breast Cancer Revealed Distinct MicroRNA Profile Associated With LNM. *Front Oncol*, 2021; 10 : 1–13.
- Fei F, Zhang K, Siegal GP & Wei S. A simplified breast cancer prognostic score: comparison with the AJCC clinical prognostic staging system. *Mod Pathol*, 2021;34(12), 2141–2147.
- Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, Ji X, Liu W, Huang B, Luo W, Liu B, Lei Y, Du S, Vuppalapati A, Luu HH, Haydon RC, He TC & Ren G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*, 2018;5(2), 77–106.
- Fridrichova I & Zmetakova I. MicroRNAs Contribute to Breast Cancer Invasiveness. *Cells*, 2019; 8(11).
- Garrido-Castro AC, Lin NU & Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: Improving patient selection for treatment. *Cancer Discov*, 2019; 9(2), 176–198.
- Ghafouri-Fard S, Khanbabapour Sasi A, Abak A, Shoorei H, Khoshkar A & Taheri M. Contribution of miRNAs in the Pathogenesis of Breast Cancer. *Front Oncol*, 2021;11, 768949.
- Goradel NH, Mohammadi N, Haghi-Aminjan H, Farhood B, Negahdari B, Sahebkar A. Regulation of tumor angiogenesis by microRNAs: State of the art. *J Cell Physiol*, 2019;234(2):1099–1110.

- Haji F, & Hurvitz SA. Can Women With HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Be Cured ? Clin Breast Cancer,2021; 10–15.
- Hamam R, Hamam D, Alsaleh KA, Kassem M, Zaher W, Alfayez M, Aldahmash A & Alajez NM.Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. Cell Death Dis, 2017; 8(9), e3045.
- Hamed S, Zahra J, Arash S, Momeni F, Mokhtari M, Sadri J, Majid N & Mirzaei H. Breast cancer diagnosis:Imaging techniques and biochemical markers.J Cell Physiol, 2018; 5200–5213.
- Hamurcu Z, Delibası N, Nalbantoglu U, Sener EF & Nurdinov N. FOXM1 plays a role in autophagy by transcriptionally regulating Beclin-1 and LC3 genes in human triple-negative breast cancer cells. J Mol Med(Berl), 2019; 491–508.
- Hamurcu Z, Delibaşı N, Geçene S, Şener EF & Altuntaş HD. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation , survival , migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR / Integrin β 1 / Src signaling in triple negative breast cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol, 2018;144(3), 415–430.
- Hanahan D & Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell, 2011; 144(5), 646–674.
- Hasbay B.Metaplastic Carcinoma of the Breast: Analysis of 38 Cases from a Single Institute.Turk Patoloji Derg, 2019; 23–30.
- Holubekova V, Kolkova Z, Grendar M, Brany D, Dvorska D, Stastny I, Jagelkova M, Zelinova K, Samec M, Liskova A, Laucekova Z, Kudela E, Bobrovskaya M, Kalman M, Zubor P and Dankova Z .Pathway Analysis of Selected Circulating Mirnas in Plasma of Breast Cancer Patients: A Preliminary Study. Int J Mol Sci, 2020;21 (19): 1–16.
- Honma N, Horii R, Ito Y, Saji S, Younes M, Iwase T & Akiyama F. Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. BMC Cancer, 2015; 15:698
- Hu Y, Xie H, Liu Y, Liu W, Liu M & Tang H. miR-484 suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SMAD2 in cervical cancer cells. Cancer Cell Int, 2017;17(1), 1–17.
- Hussen BM, Abdullah ST, Rasul MF, Salihi A, Ghafouri-Fard S, Hidayat HJ & Taheri M . MicroRNAs: Important Players in Breast Cancer Angiogenesis and Therapeutic Targets. Front Mol Biosci, 2021; 8, 764025.
- Inoue J & Inazawa J. Cancer-associated miRNAs and their therapeutic potential. J Hum Genet, 2021; 66(9), 937–945.
- Ismail S, Kherbek H, Skef J, Zahlouk N, Abdulal R & Alshehabi Z. Triple - negative apocrine carcinoma as a rare cause of a breast lump in a Syrian female : a case report and review of the literature. BMC Women's Health, 2021; 1–7.

- Jenkins S, Kachur ME, Rechache K, Wells JM & Lipkowitz S. Rare Breast Cancer Subtypes. *Curr Oncol Rep*, 2021;23(5).
- Jia Y, Liu J, Wang G & Song Z. miR-484: A Potential Biomarker in Health and Disease. *Front Oncol*, 2022; 1–22.
- Kabil N, Bayraktar R, Ivan C, Kahraman N, Mokhlis H, Calin G, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. miR-484 acts as an “onco-miR” in Triple Negative Breast Cancer cells to promote tumor growth and progression by targeting HOXA5. *Cancer Res*, 2018; 78:504
- Karabulut S, Bayramov K, Gölgeci A. The Epigenetic Regulation Of Memory: The Role Of Micrnas. *Journal Of Health Sciences*, 2018; 27: 87-94
- Kashyap D, Garg VK & Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis : Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2021;125:73-120.
- Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972;26(4), 239–257.
- Kesavardhana S, Malireddi RKS & Kanneganti T. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Gasdermin-Induced Pyroptosis. *Annu Rev Immunol*, 2020; 38: 567–595.
- Koh J & Kim MJ. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean J Radiol*, 2019;20(1):69-82,
- Kuba MG, Murray MP, Coffey K, Calle C, Morrow M & Brogi E. Morphologic subtypes of lobular carcinoma in situ diagnosed on core needle biopsy : clinicopathologic features and findings at follow-up excision. *Mod Pathol*, 2021;1495–1506.
- Lee D, Tang W, Dorsey TH and Ambs S. miR-484 Is Associated with Disease Recurrence and Promotes Migration in Prostate Cancer. *Biosci Rep*, 2020; 40 (5): 1–14.
- Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, Zheng X & Li Q. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*, 2017; 8(14), 23996–24008.
- Li T, Ding ZL, Zheng YL & Wang W. MiR-484 promotes non-small-cell lung cancer (NSCLC) progression through inhibiting Apaf-1 associated with the suppression of apoptosis. *Biomed Pharmacother*, 2017; 96, 153–164.
- Li Y, Liu Y, Yao J, Li R & Fan X. Downregulation of miR-484 is associated with poor prognosis and tumor progression of gastric cancer. *Diagn Pathol*, 2020; 15(1), 25.
- Liang Y, Zhang H, Song X & Yang Q. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Semin Cancer Biol*, 2020; 60,14–27.
- Lima LJG, Morais AHF, Valentim RAM & Barreto EJSS. iRNAs as biomarkers for

- early cancer detection and their application in the development of new diagnostic tools. *Biomed Eng OnLine*, 1–20.
- Limaïem F & Ahmad F. *Mucinous Breast Carcinoma*. StatPearls Publishing, 2022.
- Limaïem F & Mlika M. *Medullary Breast Carcinoma*. StatPearls Publishing, 2022;30.
- Liu J and Li SM. miR-484 Suppressed Proliferation, Migration, Invasion and Induced Apoptosis of Gastric Cancer via Targeting CCL-18. *Int J Exp Pathol*, 2020; 101 (6): 203–14.
- Loh HY, Norman BP, Lai KS Rahman NMANA, Alitheen NBM & Osman MA. The regulatory role of microRNAs in breast cancer. *Int J Mol Sci*, 2019; 20(19), 1–27.
- Lu TX & Rothenberg ME . MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol*, 2018; 141(4), 1202–1207.
- Lu X & Lu J. The significance of detection of serum miR-423-5p and miR-484 for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Lab*, 2015; 61(1–2), 187–190.
- Łukasiewicz S, Czeczulewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R & Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers*, 2021; 13(17), 1–30.
- Maqbool M, Bekele F & Fekadu G. Treatment Strategies Against Triple-Negative Breast Cancer: An Updated Review. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2022;14, 15–24.
- Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E & Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Semin Cancer Biol*, 2021; 72, 123–135.
- Mcguire KP. *Breast Anatomy and Physiology*. Breast Disease, 2016.
- Merhautova J, Hezova R, Poprach A, Kovarikova A, Radova L, Svoboda M, Vyzula R, Demlova R & Slaby O. MiR-155 and miR-484 are associated with time to progression in metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *Biomed Res Int*, 2015;1–5.
- Miladinova D. Molecular Imaging in Breast Cancer. *Nucl Med Mol Imaging*, 2019;313–319.
- Nair MG, Somashekaraiah VM, Ramamurthy V, Prabhu JS & Sridhar TS. miRNAs : Critical mediators of breast cancer metastatic programming. *Exp Cell Res*, 2021; 401(1), 112518.
- Nascimento RG & Otoni KM. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology*, 2020; 30, 1–8.
- Nurzadeh M, Naemi M and Hasanı SS. A comprehensive review on oncogenic miRNAs in breast cancer. *J Genet*, 2021; 100:15

- Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem*, 2017; 26;8(1):45-56.
- Pallerla S, Abdul AURM, Comeau J & Jois S. Cancer vaccines, treatment of the future: With emphasis on her2-positive breast cancer. *Int J Mol Sci*, 2021; 22, 779
- Parfenyev S, Singh A, Fedorova O, Daks A, Kulshreshtha R & Barlev NA. Interplay between p53 and non-coding RNAs in the regulation of EMT in breast cancer. *Cell Death Dis*, 2021; 12(1), 17.
- Pellegrino B, Hlavata Z, Migali C, De Silva P, Aiello M, Willard-Gallo K, Musolino A & Solinas C. Luminal Breast Cancer: Risk of Recurrence and Tumor-Associated Immune Suppression. *Mol Diagn Ther*, 2021; 25(4), 409–424.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO & Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000; 406(6797), 747–752.
- Rani V & Sengar RS. Biogenesis and mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Biotechnol Bioeng*, 2022;119(3), 685–692.
- Richard V, Davey MG, Annuk H, Miller N, Dwyer RM, Lowery A & Kerin MJ. Micrnas in molecular classification and pathogenesis of breast tumors. *Cancers*, 2021; 13(21).
- Salim U, Kumar A, Kulshreshtha R & Vivekanandan P. Biogenesis, characterization, and functions of mirtrons. *Wiley Interdisc Rev RNA*, 2022; 13(1), 1–15.
- Schettini F & Prat A. Dissecting the biological heterogeneity of HER2-positive breast cancer. *Breast*, 2022; 59, 339–350.
- Schnitt SJ, Brogi E, Chen YY, King TA & Lakhani SR. American registry of pathology expert opinions: The spectrum of lobular carcinoma in situ: Diagnostic features and clinical implications. *Ann Diagn Pathol*, 2020; 45, 151481.
- Senga SS & Grose RP. Hallmarks of cancer the new testament. *Open Biol*, 2021; 11(1), 0–2
- Shi W, Dong F, Jiang Y, Lu L, Wang C, Tan J, Yang W, Guo H, Ming J and Huang T. Construction of Prognostic MicroRNA Signature for Human Invasive Breast Cancer by Integrated Analysis. *Onco Targets Ther*, 2019;12: 1979–2010.
- Shien T, Terata K. Loco-regional therapy for metastatic breast cancer. *Transl Cancer Res*, 2020;9(8):5026-5027.
- Siegel RL, Miller KD & Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, 2020; 70(1), 7–30.
- Singh V, Khurana A, Navik U, Allawadhi P, Bharani KK & Weiskirchen R. Apoptosis and Pharmacological Therapies for Targeting There of for Cancer Therapeutics. *Sci*, 2022;4,15

- Sirotković-Skerlev M, Plavetić N, Sedlić F, Kuna SK, Vrbanc D, Belev B, Pleština S, Kovač Z and Kulić A. Prognostic Value of Circulating Bcl-2 and Anti-P53 Antibodies in Patients with Breast Cancer: A Long Term Follow-up (17.5 Years). *Cancer Biomark*, 2021; 30 (1): 95–104.
- Sokolova A & Lakhani SR. Lobular carcinoma in situ: diagnostic criteria and molecular correlates. *Mod Pathol*, 2021; 8–14.
- Stavast CJ & Erkeland SJ. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells*, 2019; 8(11):1465.
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP & Zhu HP. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J of Biol Sci*, 2017 ; 13(11), 1387–1397.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A & Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 2021; 71(3), 209–249.
- Tomlinson-Hansen S, Khan M & Cassaro S. Breast Ductal Carcinoma in situ. Stat Pearls Publishing, 2022.
- Tsang JYS & Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*, 2020, 27(1), 27–35.
- Van Opdenbosch N & Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 2019;50(6), 1352–1364.
- Vecchione A, Belletti B, Lovat F, Volinia S, Chiappetta G, Giglio S, Sonogo M, Cirombella R, Onesti EC, Pellegrini P, Califano D, Pignata S, Losito S, Canzonieri V, Sorio R, Alder H, Wernicke D, Stoppacciaro A, Baldassarre G & Croce CM. A microRNA signature defines chemoresistance in ovarian cancer through modulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013; 110(24), 9845–9850.
- Volinia S and Croce CM. Prognostic MicroRNA/MRNA Signature from the Integrated Analysis of Patients with Invasive Breast Cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013;110 (18): 7413–17.
- Wang L, Zhang S, Wang X, Chen X & Wang X. The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis. *Front oncol*, 2021; 10, 1–21.
- Wan L. Early Diagnosis of Breast Cancer. *Sensors*, 2017;17(7):1572.
- Wang S, Wang W, Han X, Wang Y, Ge Y & Tan Z. Dysregulation of miR484-TUSC5 axis takes part in the progression of hepatocellular carcinoma. *J Biochem*, 2019; 166(3), 271–279.
- Wei Y, Li H, and Qu Q. miR-484 Suppresses Endocrine Therapy-Resistant Cells by Inhibiting KLF4-Induced Cancer Stem Cells in Estrogen Receptor-Positive Cancers. *Breast Cancer*, 2021; 28 (1): 175–186.
- Wen HY & Brogi E. Lobular Carcinoma in Situ. *Surg Pathol Clin*, 2018; 11(1): 123–

- Wilson N, Ironside A, Diana A & Oikonomidou O. Lobular Breast Cancer: A Review. *Front Oncol*, 2021; 10:591399.
- Wu Y, Sarkissyan M & Vadgama JV. Epigenetics in breast and prostate cancer. *Methods Mol Biol*, 2015;1238, 425–66.
- Yang X, Zhong DN, Qin H, Wu PR, Wei KL, Chen G, He RQ and Zhong JC. Caspase-3 over-Expression Is Associated with Poor Overall Survival and Clinicopathological Parameters in Breast Cancer: A Meta-Analysis of 3091 Cases. *Oncotarget*, 2018; 9 (9): 8629–41.
- Yang Y, Lin X, Lu X, Luo G, Zeng T, Tang J, Jiang F, Li L, Cui X, Huang W, Hou G, Chen X, Ouyang Q, Tang S, Sun H, Chen L, Gonzalez FJ, Wu M, Cong W, Wang H. Interferon-microRNA signalling drives liver precancerous lesion formation and hepatocarcinogenesis. *Gut*, 2016; 65(7), 1186–201.
- Ye F, Song C, Cao Z, Xia C, Chen D, Chen L & Li S. Cytidine Deaminase Axis Modulated by miR-484 Differentially Regulates Cell Proliferation and Chemoresistance in Breast Cancer. *Cancer Res*, 2015;75(16), 1504–1516.
- Yi R, Feng J, Yang S, Huang X, Liao Y, Hu Z and Luo M. MiR-484/MAP2/c-Myc-Positive Regulatory Loop in Glioma Promotes Tumor-Initiating Properties through ERK1/2 Signaling. *J Mol Histol*, 2018; 49 (2): 209–18.
- Zare A, Ahadi A, Larki P, Omrani MD, Zali MR, Alamdari NM & Ghaedi H. The clinical significance of miR-335, miR-124, miR-218 and miR-484 downregulation in gastric cancer. *Mol Biol Rep*, 2018; 45(6), 1587–1595.
- Zearo S, Kim E, Zhu Y, Zhao JT, Sidhu SB, Robinson BG & Soon PSH. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer*, 2014; 14(1), 1–7.
- Zhang L, Zhang X, Wang X, He M, and Qiao S. MicroRNA-224 Promotes Tumorigenesis through Downregulation of Caspase-9 in Triple-Negative Breast Cancer. *Dis Markers*, 2019;9
- Zubair M, Wang S & Ali N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Front Pharmacol*, 2021;11, 1–24.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Meme Kanseri miR-484' ün Rolünün Belirlenmesi					
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU							
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe	☐	İngilizce	☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe	☐	İngilizce	☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe	☐	İngilizce	☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe	☐	İngilizce	☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama					
	SİGORTA						
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ						
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU						
	ILAN						
	YILLIK BİLDİRİM						
	SONUÇ RAPORU						
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ						
DİĞER							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No :	2019/637	Tarih :	25.09.2019			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Sema Kader KÖSE

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlişki	Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Sema Kader KÖSE	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Murat SİPAHIOĞLU	iç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Güven KAHRIMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Yusuf SEVİM	Genel Cerrahi	Kayseri Eğitim Hast.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Mehmet DOLANBAY	Kadın Hast. ve Doğum	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Fatih KARDAŞ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Serpil TAHERİ	Tıbbi Biyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Kemal Erdem BAŞARAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Sevtap KOÇER	Sivil Üye	Serbest	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Sema Kader KÖSE

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Meme Kanseri miR-484'ün Rolünün Belirlenmesi			
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU					
ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU			
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı/Melikgazi/KAYSERİ *			
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11			
	FAKS	0 352 437 52 85			
	E-POSTA	sukriye@erciyes.edu.tr			
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Doç.Dr.Elif Funda Sener			
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı , Kayseri			
	VARSA İDARİ SORUMLU ÜNVANI/ ADI SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
Gözlemsel ilaç çalışması		☐			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐			
İlaç dışı klinik araştırma		☐			
	Diğer ise belirtiniz	Doktora Tezi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEKMERKEZ ☒	ÇOKMERKEZ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

ORIGINALITY REPORT

7%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

- 1 acikbilim.yok.gov.tr 154 words — 2%
Internet
- 2 dergipark.org.tr 51 words — 1%
Internet
- 3 Juanping Yin, Xinke Chen. "Edaravone prevents high glucose-induced injury in retinal Müller cells through thioredoxin1 and the PGC-1 α /NRF1/TFAM pathway", *Pharmaceutical Biology*, 2021 32 words — < 1%
Crossref
- 4 Ayşegül BİLDİK, İrem BAYAR. "Inhibition of Apoptotic Pathways in Cancer", *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 2018 28 words — < 1%
Crossref
- 5 Soyler, Dilek. "Mcf-7 ve Mda-mb-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Juglon ve Kurkumin Uygulamasının Fabp Proteinleri (Fatty Acid Binding Protein) üzerine Etkilerinin Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi", *Necmettin Erbakan University (Turkey)* 28 words — < 1%
ProQuest
- 6 turkiyeklinikleri.com 25 words — < 1%
Internet
- 7 www.bioinforange.com
Internet

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Reyhan TAHTASAKAL (FİDAN)

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	Erciyes Üniversitesi	2005-2009
Tezsiz Yüksek Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Öğretmenliği	Erciyes Üniversitesi	2009-2010
Y. Lisans	Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı	Erciyes Üniversitesi	2014-2017
Doktora/S.Yeterlik/ Tıpta Uzmanlık	Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji (Yök 100/2000 öncelikli alanlar Moleküler Onkoloji) Anabilim Dalı	Erciyes Üniversitesi	2018-2022

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

Tez Başlığı: Koroner Bypass Ameliyatı Yapılan Hastalarda PTEN ve BDNF Genlerinin Ekspresyonlarının Araştırılması. (Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kayseri. 2017).

Danışman: Doç. Dr. Elif Funda ŞENER

Doktora Tezi Başlığı ve Danışmanı:

Tez Başlığı: Meme Kanserinde miR-484'ün Rolünün Araştırılması. (Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji (Moleküler Onkoloji) Anabilim Dalı, Kayseri.2022).

Danışman: Doç. Dr. Elif Funda ŞENER

Projelerde Yaptığı Görevler:

A. Bursiyer Olduğu TÜBİTAK Projeleri:

1. İnsüline Bağlı Oluşturulan Hipogliseminin Hipotalamus-Hipofiz-Adrenal Aks Üzerine Etkilerinin Mekanizması. TÜBİTAK 1001 Projesi (114S478), Bursiyer,
2. Tübitak BİDEB 2211A-Doktora bursiyeri, 2019-2022

B. Bursiyer Olduğu YÖK Destekleri

3. Yök 100/2000 öncelikli alanlar doktora bursiyeri, 2018-2022

C. Araştırmacı Olduğu Bilimsel Araştırma Projeleri:

4. Koroner bypass ameliyatı yapılan hastalarda PTEN ve BDNF genlerinin ekspresyonlarının araştırılması. (TYL-2017-7188), Yüksek Lisans Tezi, Araştırmacı, 03.07.2017-11.07.2018
5. Açık kalp ameliyatlarında microRNA düzeylerinin myokard korunmasındaki rolü. (TSA-2020-9948), G.Araştırma, Araştırmacı, 27.05.2020-27.03.2023
6. Meme kanserinde miR484'ün rolünün belirlemesi. (TDK-2021-10918), Doktora Tezi, Araştırmacı, 17.05.2021-17.05.2023
7. Cc2d1a genotiplerinin otizm fare modellerinde genom çapında DNA/RNA hibrit R-Loop profilleri. (TDK-2021-10744), G.Araştırma, Araştırmacı, 03.06.2021-15.06.2023

Ödüller ve Burslar:

1. **Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gevher Nesibe Araştırma Teşvik Ödülü, Öğretim Elemanı Kategorisi, Deneysel ve Laboratuar Çalışması Birincilik Ödülü, 14 Mart 2016.**

Serpil Taheri, Elif Funda Şener, Nazan Dolu, Didem Behice Öztop, Korhan Arslan, Feyzullah Beyaz, Gökmen Zararsız, Kezban Korkmaz, Fadime Özdemir, Ergül Ergen, Tuğba Topaloğlu, Esra Tufan, **Reyhan Fidan**, Züleyha Doğanıyğit, Minoo Rassaulzadegan, Yusuf Özkul. Otizmde miRNA Profillemesi ve Fare Modeli Oluşturulması.

2. **Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gevher Nesibe Araştırma Teşvik Ödülü, Öğretim Elemanı Kategorisi, Klinik Çalışma Kategorisi Birincilik Ödülü, 14 Mart 2019. (Birincilik Ödülü)**

Elif Funda Şener, Zuhale Hamurcu, Serpil Taheri, Aydın Tunçay, Nesrin Delibaşı, **Reyhan Tahtasakal**, Ecmel Mehmetbeyoğlu, Fatma Dal, Kezban Korkmaz Bayram, Arslan Bayram, Işın Güneş, Ömer Naci Emiroğulları. Myokard Korunmasında Otofajinin Rolü.

3. **Abdullah Gül Üniversitesi V.Yaşam Bilimleri Kongresi Sözlü Sunum Birincilik Ödülü,**

Dana H, Şener EF, **Tahtasakal R**, Mehmetbeyoglu E, Yılmaz Z, Tufan E, Delibaşı N, Taheri S, Hamurcu Z, Korkmaz Bayram K, Bayram A, Özkul Y. *Cc2d1a* Otistik Fare Modeli Serebellum Dokusunda Otofajik Belirteçlerin Rolü.

Sertifikalar:

1. ***Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası.*** SBY 000 Deney Hayvanları ve Uygulama Yöntemleri Erciyes Üniversitesi. 2014, Kayseri
2. ***III. Uygulamalı Temel Hücre Kültürü Teknikleri Kursu*** Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi 9- 13 Mart 2015, Kayseri

3. “Fourth International Workshop on cAMP Signaling, Protein Kinase A and Phosphodiesterases: from genetics to function and human diseases” Erciyes Üniversitesi. 3-5 Eylül 2015, Kayseri
4. “Uygulamalı Oral Fibroblast ve Mezenkimal Kök Hücre Teknikleri” Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi 4-6 Mayıs 2015, Kayseri
5. “Uygulamalı Yoğunlaştırılmış Biyoinformatik Kursu” Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi 30 Haziran-3 Temmuz 2015, Kayseri
6. “3. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi” Katılım Belgesi 5-8 Mayıs 2016, Kayseri

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (SCI ve SCI-E):

A1. Seyhan AU, Şener EF, Bol O, Taheri S, Topaloglu T, Tufan E, **Tahtasakal R**, Ekici Günay N, Karabulut H, Günay N. Role of circulating microRNAs in acute appendicitis. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2018 May;24(3):211-215. (SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi)

A2. Dana H, Bayramov KK, Delibaşı N, **Tahtasakal R**, Bayramov R, Hamurcu Z, Sener EF. Disregulation of Autophagy in the Transgenerational Cc2d1a Mouse Model of Autism. Neuromolecular Med. 2019 Nov 13. (SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi)

A3. Elcik D , Tuncay A, Sener EF, Taheri S, **Tahtasakal R**, Mehmetbeyoğlu E, et al. Blood mRNA Expression Profiles of Autophagy, Apoptosis, and Hypoxia Markers on Blood Cardioplegia and Custodiol Cardioplegia Groups. Brazilian journal of cardiovascular surgery, 2021 (SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi)

A4. Özkan M, Günay N, Sener EF, Karcıoğlu Ö, **Tahtasakal R**, Dal F, Günay NE, Demiryürek AT. Variants in TNF and NOS3 (eNOS) genes associated with sepsis in adult patients. J Gene Med. 2021 Feb 20:e3323. (SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi)

A5. Hamurcu Z, Sener EF, Taheri S, Nalbantoglu U, Delibasi Kokcu N, **Tahtasakal R**, Cınar V, Guler A, Ozkul Y, Donmez-Altuntas H, Ozpolat B. MicroRNA profiling identifies Forkhead box transcription factor M1 (FOXM1) regulated miR-186 and miR-200b alterations in triple negative breast cancer. Cellular Signaling, 2021; 83: 109979 (SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi)

A6. Kale A, Sener EF, Ekici Günay N, **Tahtasakal R**, Demiryürek S, Günay N, Demiryürek AT. Evaluation of the rs35996865 polymorphism of the ROCK1 gene in sepsis. Revista da Associação Médica Brasileira, 2022 (SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi)

A7. **Tahtasakal R**, Sener EF, Delibasi N, Hamurcu Z, Mehmetbeyoglu SE, Korkmaz Bayram K, Gunes I, Emirogullari ÖN. Overexpression Of *Pten* Gene In Myocardial Tissues Of The Patients With Coronary Bypass Surgery. ABC Cardiol Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2022 (SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi) (Revizyon aşamasında)

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

B1. Şener EF, Dana H, Topaloğlu T, **Fidan R**, Durmuş R, Zararsız G, et al., ‘Agresyonla Bağlantılı olan Tachykinin Reseptör 1 (TACR1) Geninin İntihar Eğilimi İle İlişkisi.’ 13. Kognitif Nörobilim Kongresi, İstanbul, Türkiye. 19-22 Mayıs 2016, ss. 57-58.

B2. Badıllı M, **Tahtasakal R**, Pirencioğlu Ş, Şahin M, Tuğhan E, Demirci E, Şener EF. Relationship Between Autism and Alpha-Synuclein. V. International Icontech Conference on Innovative Surveys in Positive Sciences. (**Oral Presentation**), February 5-6, 2022, Sanliurfa, Turkey.

C. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Dana H, **Tahtasakal R**, Pirencioğlu Ş, Güneş I, Emiroğulları ÖN, Şener EF, Rassoulzadegan M. Anesthetics Change microRNA Levels in Blood Samples of Bypass Patients and in Blood and Sperm Tissues of Mice. Experimed, 2022; 12 (Supplement 1): S11-S12.

D. Kitap Bölümü

-

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

E1. Dana H, **Tahtasakal R**, Pirencioğlu Ş, Güneş I, Emiroğulları ÖN, Şener EF, Rassoulzadegan M. Anesthetics Change microRNA Levels in Blood Samples of Bypass Patients and in Blood and Sperm Tissues of Mice. 13. Aziz Sancar DETAE Günleri, (Sözlü Bildiri), 21-22 Aralık 2021, İstanbul, Türkiye.

E2. **Tahtasakal R**, Dana H, Şener EF, Tunçay A, Güneş I, Emiroğulları ÖN. Koroner Bypass Cerrahisinde Hipoksinin Rolü. V. Yaşam Bilimleri Kongresi, 21-22 Şubat 2020, Kayseri, Türkiye.

E3. Dana H, Şener EF, **Tahtasakal R**, Mehmetbeyoglu E, Yılmaz Z, Tufan E, Delibaşı N, Taheri S, Hamurcu Z, Korkmaz Bayram K, Bayram A, Özkul Y. *Cc2d1a* Otistik Fare Modeli Serebellum Dokusunda Otofajik Belirteçlerin Rolü. V. Yaşam Bilimleri Kongresi, (Sözlü Bildiri), 21-22 Şubat 2020, Kayseri, Türkiye.

E4. Topaloğlu T, **Tahtasakal R**, Korkmaz Bayramov K, Emiroğulları ÖN, Şener EF. Koroner Arter Hastalarında LC3 Gen Ekspresyonunun Araştırılması. Uluslararası Katılımlı Erciyes Tıp Genetik Günleri (Sözlü Bildiri), 21-23 Şubat 2019 Kayseri, Türkiye.

E5. Tahtasakal R, Dana H, Hamurcu Z, Korkmaz Bayramov K, Tufan E, Mehmetbeyoğlu E, Aybuğa F, Emiroğulları ÖN, Şener EF. Bypass Ameliyatı Geçiren Hastaların Kan ve Miyokard Dokularında *PTEN* Geninin Ekspresyonunun Araştırılması. 7. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 02-05 Temmuz 2018, Nevşehir, Türkiye.

E6. Dana H, Delibaşı N, **Tahtasakal R,** Hamurcu Z, Şener EF. *Cc2d1a* Otistik Fare Modelinde LC3 ve Beclin Ekspresyonlarının Araştırılması. 7. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, (Sözlü Bildiri), 02-05 Temmuz 2018, Nevşehir, Türkiye.

