



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Meme Kanseri Tanılı Olgularda İmmün Kontrol Noktası Genlerini
Regüle Eden miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi**

Doktora Tezi

Dr. Mustafa Barış ZEYTUNLU

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Meme Kanseri Tanılı Olgularda İmmun Kontrol Noktası Genlerini
Regüle Eden miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi**

Dr. Mustafa Barış ZEYTUNLU

Danışman
Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

Tez Deęerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Burçin TEZCANLI
KAYMAZ

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Ayşe CANER

Üye : Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yağmur
KİRAZ DURMAZ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Besra
ÖZMEN YELKEN

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Dünya genelinde her yıl 2.1 milyon kadın meme kanserine yakalanırken, ülkemizde ise 20 bin kadın meme kanseri teşhisi almaktadır. Meme kanseri görülme sıklığı tüm dünyada artmaya devam etmektedir. Beni bu alanda çalışmaya iten temel sebep ise birinci dereceden yakınım olan anneme meme kanseri teşhisi koyulması ve devam eden süreçte yaşadığımız olaylardır. Teşhis ve tedavi süreçleri her ne kadar hekimlik mesleğinin kaçınılmaz bir parçası olsa da kişinin kendi ailesi ve özellikle annesine kanser teşhisi konulduğunu öğrenmesi hekimlik ve evlat sıfatlarının birleşmesine sebep olmaktadır. Mesleki bilgilerimi annemin tedavisi için kullanmak, bu amaçla araştırmalar yaparak çabalamak bir hekim olarak doktora tez çalışmamda da bu alana yönelmemi sağlamıştır. Bu çalışmada, meme kanseri hastalarında ve sağlıklı bireylerde, immun kontrol noktalarında görevli olan PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3 genlerinin miRNA seviyesindeki ekspresyonları ile bu genleri regüle edebildiği in siliko olarak belirlenen 21 adet miRNA'nın ekspresyon profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede, çalışmadan elde edilecek veriler ışığında, olgu ve kontrol grubuna ait ekspresyon verilerinin kıyaslanması sonrasında onkogenik veya tümör süpresör potansiyelindeki aday miRNA'lar belirlenmesi ve klinik parametreler ile hedef gen ve miRNA'ların ekspresyon profillerinin kıyaslanmasıyla ileri yapılacak çalışmalar ile bu miRNA'lardan biyobelirteç tanımlaması amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle etik kurul dosyası hazırlanmış ve Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'na sunulmuş ve 21-7T/58 karar numarası ile onay alınmıştır. Sonrasında Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü kapsamında doktora tez projesi olarak sunulan çalışma, kabul edilmiş olup 40.000 TL lik bütçe ile desteklenmektedir.

Araştırmamın her aşamasında benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve bana her zaman yol gösterici olan, fikirleri ile beni aydınlatan, aklıma takılan konuları danışarak engin fikirlerinden faydalanabildiğim, beni farklı başlıkları araştırmaya yönelterek tezime katkı sunmamı sağlayan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ'a en içten saygılarımı ve şükranlarımı sunuyorum.

İzmir, 24.06.2024

Mustafa Barış ZEYTUNLU

Özet

Meme Kanseri Tanılı Olgularda İmmun Kontrol Noktası Genlerini Regüle Eden miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi

Meme kanseri (MK) hücreleri oldukça heterojen bir yapıda olup tedavide genel yaklaşım tümör rezeksiyonu sonrası kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve immunoterapidir. İmmunoterapide, immün kontrol noktası inhibitörleri (ICI) ile tümör mikroçevresinde immunosupresif ortama neden olan moleküller hedeflenerek immün mikroçevrenin kanser hücreleri üzerindeki aktivitesinin artırılması ile tümör hücrelerinin eliminasyonu amaçlanmaktadır. MK'de ilk immunoterapi, diğer MK türlerine göre daha immünojenik mikroçevreye sahip olan üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) tedavisinde kullanılmak üzere, FDA tarafından onaylanmış, özellikle PD-L1 ekspresyonu olan hastalarda önemli bir tedavi seçeneği olması ve yapılan klinik çalışmaların bazılarında sağ kalım süresini artırmış olmasına rağmen ÜNMK tedavisinde yetersiz aktivite gösterdiği bildirilmiştir. İmmunoterapi etkinliğini belirleyen en önemli etkenlerden biri, İKN moleküllerinin, kanser immün mikroçevresine göre değişen ekspresyon profilleridir. Bu nedenle İKNi'lerinin duyarlılığını artırmak ve İKN'larında görevli genlerin ekspresyon profillerinin belirlenmesi ve moleküler patogenezinin aydınlatılarak hedefe yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir. miRNA'lar, post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunun regülatörleri olarak, hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon, metastaz gibi onkogenik ve birçok hücresel süreçte görev alan kısa kodlanmayan RNAlardır. Terapötik bir hedef olmalarının dışında, diagnostik ve prognostik belirteç olarak da kullanılabilmektedir. Ayrıca miRNA profillemesinin, hastalıkların altında yatan moleküler patogenezin aydınlatılmasında ve yeni hedef tedavi modellerinin geliştirilmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. miRNA'lar ile İKN'larında rol alan ko-inhibitör moleküllerin prognostik rolleri veya bu molekülleri hedef alan antikorlarının terapötik etkileri arasındaki korelasyon hakkında çok az şey bilinmektedir.

Bu amaçla çalışmamızda, MK tanılı olgular ile sağlıklı kontrol grubu olgularında, İKN'larında görevli olan PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG- 3 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri ile, genleri regüle edebileceği *in siliko* analizle belirlenen 21 adet miRNA'nın ekspresyon profillemesi gerçekleştirildi. Böylece, İKN'larında görev

alan genlerin ekspresyonunun altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ile yeni hedef tedavi modellerinin geliştirilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

MK tanılı olgular (n=50) ile sağlıklı kontrol grubu olgularından (n=46) alınan periferik kan örneklerinden total RNA ve miRNA izolasyonu yapılmış ve reverse transkripsiyon ile cDNA sentezlenmiştir. 21 adet miRNA'nın ekspresyonu q-RT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Hedef genlerin mRNA ve bu genleri regüle ettiği düşünülen miRNAların ekspresyon seviyeleri $p<0.05$ 'in önemi referans alınarak değerlendirilmiştir.

Sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, olguların PD-1,PD-L1,CTLA4 ve LAG3 mRNA düzeylerinde anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte hastalarda 21 miRNA'nın analizi yapılmış ve bunlardan 6 tanesinin kontrol grubuna göre farklı düzeylerde upregüle veya downregüle olduğu belirlenmiştir. miR-195-5p ifadesinin ise kontrol grubuna kıyasla, -3.09 kat daha düşük ifade edildiği ($p<0.0001$) saptanmışken; miR-6838-5p ekspresyonunun kontrol grubuna göre -6.93 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). Kontrol grubuna kıyasla, miR-520b ailesinden olan miR-520-5p ifadesinin 2.46 kat ($p<0.0001$), miR-302d-3p ifadesinin 2.83 kat ($p<0.0001$), miR-15b-5p nin 3.08 kat ($p<0.0001$), miR-373-3p nin ise 2.40 kat ($p<0.0001$) olgu grubunda daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 9, Grafik 5, Grafik 6 ve Grafik 7).

Çalışma örneğimizi oluşturan periferik kan hücrelerinde İKN moleküllerinin sağlıklı kontrollere göre farklı olmamasının nedeni bu bölgede bulunan kanser hücrelerinden oluşturulan kronik immunojenik uyarıların az olmasından dolayı inhibitör sinyallerin oluşmaması olabilir. Ayrıca, hücre proliferasyonu ve invazyonunda rol oynadığı bilinen miRNAların upregüle olması, bunların MK'de diagnostik ve prognostik bir belirteç olarak kullanımına katkı sağlayabilir. Daha ileri çalışmalar için tümör dokusunda da ekspresyon analizlerinin yapılması, immün temelli tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunacak önemli yaklaşımlar olacaktır.

Anahtar Kelimeler; Meme Kanseri; İmmün Kontrol Noktaları; PD 1; CTLA4; LAG3; miRNA

Abstract

Determination of Expression Profiles of miRNAs Regulating Immune Checkpoint Genes in Breast Cancer Cases

Breast cancer (BC) cells are highly heterogeneous and the general approach to treatment is chemotherapy, radiotherapy, targeted therapies and immunotherapy after tumor resection. In immunotherapy, immune checkpoint inhibitors (ICI) target molecules that cause immunosuppressive environment in the tumor microenvironment and aim to eliminate tumor cells by increasing the activity of the immune microenvironment on cancer cells. The first immunotherapy in BC was approved by the FDA for the treatment of triple negative breast cancer (TNBC), which has a more immunogenic microenvironment compared to other types of BC. Although it is an important treatment option especially in patients with PD-L1 expression and has increased survival in some clinical trials, it has been reported to show insufficient activity in the treatment of TNBC. One of the most important factors determining the efficacy of immunotherapy is the expression profiles of IC molecules, which vary according to the cancer immune microenvironment. Therefore, it is important to increase the sensitivity of ICs and to develop targeted treatment methods by determining the expression profiles of genes involved in ICs and elucidating the molecular pathogenesis. miRNAs are short non-coding RNAs that are involved in oncogenic and many cellular processes such as cell proliferation, apoptosis, invasion and metastasis as regulators of gene expression at the post-transcriptional level. Apart from being a therapeutic target, they can also be used as diagnostic and prognostic markers. In addition, miRNA profiling is thought to contribute to the elucidation of the underlying molecular pathogenesis of diseases and the development of new target therapy models. Little is known about the correlation between microRNAs and the prognostic roles of co-inhibitory molecules involved in ICs or the therapeutic effects of antibodies targeting these molecules.

For this purpose, in our study, we performed mRNA expression profiling of PD-1, PDL-1,CTLA-4,LAG-3 genes, which are involved in ICs, and expression profiling of 21 miRNAs, which were determined by in silico analysis to regulate these genes, in patients with BC and healthy control subjects. Thus, it was aimed to contribute to the

development of new target treatment models by elucidating the molecular mechanisms underlying the expression of genes involved in ICs.

Total RNA and miRNA were isolated from peripheral blood samples obtained from patients with CC (n=50) and healthy control subjects (n=46) and cDNA was synthesized by reverse transcription. Expression of 21 miRNAs was determined by q-RT-PCR method. Expression levels of mRNA of target genes and miRNAs thought to regulate these genes were evaluated by taking the significance of $p < 0.05$ as a reference.

There was no significant difference in PD-1, PD-L1, CTLA4 and LAG3 mRNA levels of the patients compared to the healthy control group. However, 21 miRNAs were analyzed in the patients and 6 of them were found to be upregulated or downregulated at different levels compared to the control group. miR-195-5p expression was found to be -3.09-fold lower compared to the control group ($p < 0.0001$), while miR-6838-5p expression was -6.93-fold lower compared to the control group ($p < 0.0001$). Compared to the control group, miR-520-5p expression, miR-302d-3p expression was 2.46-fold ($p < 0.0001$), miR-302d-3p expression was 2.83-fold ($p < 0.0001$), miR-15b-5p expression was 3.08-fold ($p < 0.0001$) and miR-373-3p expression was 2.40-fold ($p < 0.0001$) higher in the case group (Table 9, Graph 5, Graph 6 and Graph 7).

The reason why IC molecules were not different in peripheral blood cells constituting our study sample compared to healthy controls may be that inhibitory signals do not occur due to the lack of chronic immunogenic stimuli generated from cancer cells in this region. In addition, upregulation of miRNAs known to play a role in cell proliferation and invasion may contribute to their use as a diagnostic and prognostic marker in CC. Expression analysis in tumor tissue for further studies will be important approaches that will contribute to the development of immune-based therapies.

Keywords; Breast Cancer, Immune Checkpoints; PD 1; CTLA4; LAG3; miRNA

İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	IV
İçindekiler.....	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Grafikler Dizini.....	X
Kısaltma Listesi.....	XI
1. Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu.....	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	2
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	3
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	4
1.6. Araştırmanın Amacı.....	4
2. Genel Bilgiler.....	6
2.1. Meme Anatomisi.....	6
2.2. Meme Kanseri.....	6
2.2.1. Meme Kanserinin Sınıflandırılması ve Evrelemesi.....	7
2.2.2. Meme Kanseri Tedavisi.....	8
2.3. Kansere İmmünoterapisi.....	9
2.3.1. İmmün Kontrol Noktaları Moleküler Biyolojisi.....	10
2.3.1.1. PD-1/PD-L1 Sinyal İletimi.....	11
2.3.1.2. CTLA4 Sinyal İletimi.....	11
2.3.1.3. LAG3 Sinyal İletimi.....	11
2.3.2. Meme Kanseri Tedavisinde İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri.....	12
2.4. miRNA'lar.....	13
2.4.1. miRNA'lar ve Kansere.....	13
2.4.2. İmmün Kontrol Noktaları ve miRNA Regülasyonu.....	14
3. Gereç ve Yöntem.....	16
3.1. Olgu Seçimi ve Çalışma Dizaynı.....	16
3.2. Kan Örneklerinin Toplanması.....	16

3.3. Total RNA ve miRNA İzolasyonu.....	16
3.3.1. Total RNA İzolasyonu.....	16
3.3.2. miRNA İzolasyonu.....	17
3.3.3. RNA Miktar ve Saflık Ölçümü.....	18
3.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	19
3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	20
3.6. İstatistiksel Analizler.....	23
4. Bulgular.....	24
4.1. Olgu ve Sağlıklı Kontrol Grubuna Ait Demografik ve Klinik Özellikler...24	
4.2. Olgu ve Sağlıklı Kontrol Grubunda mRNA VE miRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	25
4.2.1. Olgu ve Sağlıklı Kontrol Grubunda mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	25
4.2.2. Olgu ve Sağlıklı Kontrol Grubunda miRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	27
5. Tartışma.....	32
Sonuç ve Öneriler.....	41
Kaynaklar.....	42
Ekler.....	54
Teşekkür.....	55
Özgeçmiş.....	56

Tablolar Dizini

Tablo 1. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	19
Tablo 2. cDNA Termal Döngü Profili.....	20
Tablo 3. qRT-PCR analizlerinde hazırlanan reaksiyon karışımı.....	21
Tablo 4. qRT-PCR analizi termal döngü profili.....	21
Tablo 5. Kullanılan genlerin primer dizileri.....	22
Tablo 6. Kullanılan miRNA'ların primer dizileri.....	24
Tablo 7. Olguların demografik ve klinik özellikleri.....	24
Tablo 8. Olgu ve sağlıklı kontrol grubunda mRNA gen ekspresyon düzeyleri.....	26
Tablo 9. Olgu ve sağlıklı kontrol grubunda miRNA ekspresyon düzeyleri.....	28

Grafikler Dizini

Grafik 1. Olguların kanser tipine göre dağılımları.....	24
Grafik 2. Olguların hormon reseptörü ekspresyon durumlarına göre dağılımları.....	25
Grafik 3. Olgu ve sağlıklı kontrol grubunda mRNA gen ekspresyonlarının değişimi.	26
Grafik 4. Olgu ve sağlıklı kontrol grubunda mRNA gen ekspresyon düzeyleri ısı haritası.....	27
Grafik 5. Olgu ve sağlıklı kontrol grubunda miRNA ekspresyon düzeyleri sütun grafiği.....	29
Grafik 6. Sağlıklı kontrol grubuna göre olgularda ifadesi artan miRNA'ların grafiği.....	29
Grafik 7. Sağlıklı kontrol grubuna göre olgularda ifadesi artan miRNA'ların ısı haritası.....	30
Grafik 8. Sağlıklı kontrol grubuna göre olgularda ifadesi azalan miRNA'ların sütun grafiği.....	30
Grafik 9. Sağlıklı kontrol grubuna göre olgularda ifadesi azalan miRNA'ların ısı haritası.....	31

Kısaltma Listesi

BRCA	: Meme Kanseri Duyarlılık Geni
HR	: Hormon Reseptörü
ÖR	: Östrojen Reseptörü
PR	: Progesteron Reseptörü
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2
CDK 4/6i	: Siklin Bağımlı Kinaz 4/6 İnhibitörü
CAR-T	: Kimerik Antijen Reseptörü Hücre Tedavisi
İKNi	: İmmun Kontrol Noktası İnhibitörü
APC	: Antijen sunan hücreler
IL	: İnterlökin
DC	: Dendritik hücreler
PD1	: Programlı Ölüm Reseptörü 1
PD-L1	: Programlı Ölüm Ligandı 1
CTLA4	: Sitotoksik T- Lenfosit İlişkili Protein 4
TCR	: T Hücre Reseptörü
Treg	: Regülatör T Hücreleri
LAG3	: Lenfosit Aktivasyon Geni 3
FDA	: Dünya Sağlık Örgütü
miRNA	: MikroRNA
UTR	: Translasyonu yapılmayan bölge

q-RT-PCR

˙ Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir
Reaksiyonu



Giriş

1.1.Araştırmanın Problemi

Dünya çapında her yıl 2.1 milyon kadın meme kanseri teşhisi alırken, ülkemizde ise bu hastalık her yıl 20 bin kadını etkilemektedir. Her 38 kadından biri meme kanserinden hayatını kaybetme riski taşırken, meme kanseri görülme sıklığı küresel düzeyde artmaya devam etmektedir. Meme kanserinde ilk tedavi seçeneği olarak kemoterapi ve radyoterapi uygulanmakla birlikte, bu tedaviler sırasında ortaya çıkan basit yan etkilerin yanı sıra, ciddi yan etkiler de görülebilir; bunlar arasında sitotoksikite, tümör relapsı ve ölüm gibi sonuçlara yol açmaktadır. Gelişen bu yan etkilerin yanı sıra relaps veya refrakteri olan hastalarda, mevcut tedavi seçenekleri genellikle yetersiz kalmaktadır. Meme kanseri konvansiyonel tedavisindeki sınırlamalara rağmen, bu hastalığın moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ile ilgili elde edilen son gelişmeler, hedefe yönelik tedavilerin potansiyelini artırmaktadır. Bu potansiyel, neoadjuvan, adjuvan ve metastatik evre tedavilerinde hedefe yönelik tedavilerin kullanılmasına imkân tanımaktadır.

Kanser immünoterapisi, bağışıklık sisteminin güçlendirilerek, kanser hücrelerini spesifik olarak tanımasını ve yok etmesi esasına dayanan bir tedavi yöntemidir. İmmünoterapi, özgünlüğü, kalıcı etkileri ve iyileşmeye katkılarıyla kanser tedavisinde giderek daha önemli bir yer edinmektedir. Tümörler, anti-tümör bağışıklık tepkilerini engellemek için bağışıklık kontrol noktalarındaki inhibitör reseptörleri kullanır. Bu reseptörlerden, Sitotoksik T-Lenfosit-İlişkili Antijen-4 (CTLA-4) ve Programlanmış Ölüm-1 (PD-1) ve Lenfosit Aktivasyon Geni 3 (LAG3) bu mekanizmaya en çok aracılık eden reseptörlerdendir. Bu reseptörleri hedefleyen monoklonal antikor temelli tedaviler günümüzde tedavi protokollerinde aktif olarak kullanılmaya başlanmış olsa da bazı hastalarda sağkalım üzerine olumlu etki gösterirken bazı hastalarda etkisiz kaldığı bildirilmiştir. Buna sebep olan mekanizmaların aydınlatılması, immünoterapilerin daha etkili kullanılabilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır.

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ifadesini regüle ederek birçok biyolojik hücresel süreçlerde rol oynamaktadır. İnsan genomunda bulunan birçok miRNA, hücrelerin gelişimi, farklılaşması, çoğalması ve programlı hücre ölümü süreçlerinde önemli düzenleyici rol oynar. miRNA'ların ekspresyonunun çeşitli hastalıkların oluşumunda

etkili olduğu bilinmektedir. miRNA'ların kanser hücrelerindeki anormal ekspresyonlarının da kanser gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bunların yanı sıra miRNA'ların bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini düzenlediği de bildirilmiştir. MiRNA ekspresyonlarının modellenmesi, bu alt tiplerin moleküler temellerini açığa çıkarabilir ve bu sayede hedefe yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Fakat, literatürlere bakıldığında immün kontrol noktasında görevli olan genlerin ve bu genleri regüle edebilen miRNA ların ekspresyon profillerine yönelik veya bunları hedefleyebilen moleküllerin, hedefe yönelik tedavileri ne şekilde etkilediği net olarak bilinmemektedir.

1.2.Araştırmanın Sorusu

P; Meme kanseri hastalarının sağlıklı bireylere göre kıyaslandığında, immün kontrol noktası ekspresyonu ile miRNA ekspresyonu arasındaki ilişki nedir?

İ; İmmün kontrol noktasında rol alan PD1, PDL1, CTLA4 ve LAG3 genleri ile bu genleri regüle edebilen miRNA ekspresyon düzeylerinin Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q-RT-PCR) ile belirlenmesi

C; Ekspresyon verilerinin meme kanseri öyküsü bulunmayan sağlıklı bireylerle, meme kanseri hastalarında karşılaştırılması

O; Elde edilen bu verilerin immünoterapi yanıtı, hastalık prognozu üzerine etkileri veya potansiyel bir biyomarker adayı olarak kullanılma ihtimali

1.3.Araştırmanın Hipotezleri

“İmmün modüle edici miRNA'ların ekspresyon profili, kanser immünoterapisinde yanıt ve klinik sonuçlar için öngörücü bir biyobelirteç olarak faydalı olabilir” hipotezine dayanarak,

İmmün kontrol noktalarındaki artmış ekspresyon, belirli miRNA'ların artmış ekspresyonu ile ilişkilidir. Bu durum, miRNA'ların immün kontrol noktası regülasyonunda rol oynayabileceğini ve dolayısıyla immün cevabın modülasyonunda önemli bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotez, meme kanseri

tedavisinde immünoterapi yanıtını tahmin etmek ve hastalık prognozunu belirlemek için potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilecek miRNA'ların keşfedilmesine yol açma potansiyelindedir.

Hedef gen ve miRNA ların ekspresyon profillerinin belirlenmesi kanser terapisinde yeni potansiyel ilaçlar olarak kullanılmaya başlanacak, hastalık ile mücadelede yeni hedefler ortaya çıkarmaya yardımcı olacaktır.

Karsinogenetik süreçte görevli bazı önemli genlerin mRNA seviyesindeki ekspresyonel değişimlerin belirlenmesi hastalığın seyri, mortalite, metastaz, tedaviye cevap, nüks, hastaneye yatış oranları gibi birçok veri hakkında herhangi bir ilişki olup olmadığının görülmesini sağlayacaktır.

Kombinasyon kemoterapisi ve radyoterapisi ile progresyon gelişen hastalarda progresyonsuz sağkalım, yanıt oranı ve genel sağkalımda herhangi bir anlamlı farklılık olup olmadığı hakkında istatistiksel veriler ışığında yorum yapabilmek mümkün olacaktır.

1.4.Araştırmanın Varsayımları

İmmün sistem, çevremizdeki çeşitli organizma ve molekülleri tanıyıp etkisiz hale getirerek bizi koruyan bir savunma mekanizmasıdır. Bağışıklığın temeli, "kendinden olmayan" unsurların tanınmasıdır. Kanser ve bağışıklık sistemi arasındaki ilişki kavramı, bağışıklık sisteminin spontan tümörlerin oluşumunu veya ilerlemesini baskılayabileceği teorisiyle yıllar öncesine dayanmaktadır.

Kanser immünoterapisi, bağışıklık sistemini güçlendirerek kanser hücrelerini yok etmeyi hedefler. Bu tedavi yaklaşımının temelinde, bağışıklık sisteminin antikorlar ve T hücrelerinin üstün özgülüklerini kullanarak kanser ve sağlıklı hücreler arasındaki farkların kullanılarak tümör hücrelerinin eliminasyonu esasına dayanmaktadır.

Son yıllarda, immün kontrol noktası blokajı, onkoloji alanında umut vaat eden en önemli ilerlemelerden biri olarak öne çıkmıştır. Bu tedavi yöntemi kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel kanser tedavileriyle kombine olarak kullanılmaktadır.

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ifadesini regüle ederek birçok biyolojik hücrel süreçlerde rol oynamaktadır. Bu nedenle immun kontrol noktası genleri üzerinde de etki mekanizması bulunmaktadır. Çalışmada incelenen miRNA'ların, hücrel ve moleküler düzeyde meme kanseri patogeneğinde önemli rol oynadığı varsayılmaktadır. Bu varsayım, miRNA'ların kanser biyolojisinde tanımlanmış ve doğrulanmış fonksiyonları üzerine dayanır.

1.5.Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamız sadece hastaların hemogram kanında yürütülmüştür. MiRNA ekspresyonlarının zamansal değişim göstermesi, patogeneze açısından bazı olguların yanlış şekilde negatif olarak değerlendirilmesine neden olabilir.

Örneklem büyüklüğünün kısıtlı olmasının yanı sıra farklı kanser alt tiplerin olgu sayısının az olmasının, istatistiksel olarak anlamlı sonuçları kısıtlayabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmamız *in vitro* ortamda gerçekleştirilmiştir. *In vivo* çalışmaların bulunmaması araştırmayı sınırlandırmış olup gen ekspresyonu sonuçlarının etkilenebileceği düşünülmektedir.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada, meme kanseri hastalarında ve sağlıklı bireylerde, immun kontrol noktalarında görevli olan PD-1,PDL-1,CTLA-4, LAG-3 genlerinin miRNA seviyesindeki ekspresyonları ile bu genleri regüle edebildiği *in silico* olarak belirlenen 21 adet miRNA'nın ekspresyon profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu sayede,

Çalışmadan elde edilecek veriler ışığında, olgu ve kontrol grubuna ait ekspresyon verilerinin kıyaslanması sonrasında onkogenik veya tümör süpresör potansiyelindeki aday miRNA'lar belirlenmesi;

Klinik parametreler ile hedef gen ve miRNA' ların ekspresyon profillerinin kıyaslanmasıyla ileri yapılacak çalışmalar ile bu miRNA'lardan biyobelirteç tanımlaması amaçlanmıştır.



Genel Bilgiler

2.1. Meme Anatomisi

Meme, sternumun yan kenarından orta koltuk altı çizgisine kadar ve 2. kottan 6. kota kadar olan bir alanda lokalizedir. Memenin apeksindeki memebaşını çevreleyen koyu renkli alana “areola” denmektedir. Ortada meme başı-areola kompleksi ve etrafında laktiferöz kanallar ve loblar bulunmaktadır (Erel ve KemalAtahan, 2019; Schlenz ve ark, 2000). Meme dokusu, lobüller (süt bezleri), duktuslar (kanallar), yağ dokusu ve bağ dokusundan oluşmaktadır. Meme bezleri, 15-20 adet lobdan, loblar da lobüllerden oluşmaktadır. Bu lobüllerin içerisinde ise sütün üretimi ve depolanmasından sorumlu, üzüm salkımı şeklindeki alveoller ve bunları çevreleyen süt kanalları bulunmaktadır. Alveollerden başlayan süt kanalları epitel hücrelerle kaplanmıştır. Süt kanalları, üretilen sütü meme başına taşımakta ve bu kanallar meme başında birleşerek üretilen sütün dışarı boşaltılmasını sağlar. Meme bağ dokusu, meme dokusunun desteklenmesinde ve meme yapısının bütünlüğünü sağlamaktadır. Yağ dokusu ise meme bezlerinin desteklenmesinde ve şeklinin belirlenmesinde rol oynar. Memenin büyüklüğünü belirleyen yağ dokusunun miktarıdır. Ergenlik döneminden önce meme bezleri küçük olup alveoller ve süt kanalları gelişmemiştir. Ergenlik dönemi ile östrojen, progesteron, prolaktin gibi hormonların etkisiyle alveollerin ve kanalların gelişmesiyle yetişkin meme yapısı oluşmaktadır (Erel ve KemalAtahan, 2019; Noyan, 2004).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en sık rastlanan kanser türü olup, ölümcül kanser türü olarak öne çıkmaktadır. Her yıl milyonlarca kadın meme kanseri teşhisi almaktadır. Dünya genelindeki kanser istatistiklerine bakıldığında, kadınlarda en yüksek insidansa sahip sistemik ve kronik bir hastalık olup, önemli ölçüde morbidite ve mortalite nedenidir. Meme kanserinin kadınlardaki mortalite oranı akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (WHO, 2020). Gelişmiş ülkelerde, kadınlarda meme kanseri insidansı artarken, ölüm oranlarında gözle görülür bir azalma gözlenmektedir. Buna karşılık, gelir durumu daha az olan ülkelerde meme kanseri insidansındaki artış, mortalite artışıyla paralellik göstermektedir. Türkiye’de kadınlar arasında meme kanseri insidansı 100.000 kadında 45.6 olarak kaydedilmiştir.

Özellikle 45-54 yaş aralığındaki kadınlarda meme kanseri insidansının artışı görülmektedir (Kaynaklar: Eryılmaz ve diğerleri, 2012; Sasco ve diğerleri, 1993). Buna göre meme kanserinde en yüksek insidansın 25-50 yaş aralığındaki kadınlarda görüldüğü ve 35 yaşından daha genç kadınlarda ise %5, 50-69 yaş aralığında ise bu oranın yaklaşık %25 olduğu bildirilmiştir. İnvaziv duktal karsinomali hastaların oranı tüm kanser tiplerine göre en yüksek olanıdır (Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2018, Erişim tarihi. 26.06.2024, <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/>). Meme kanseri gelişimi çok faktörlüdür; diyet alışkanlıkları, üreme faktörleri ve hormonal etkilerin yanı sıra yaş, erken menarş (ilk adet yaşının erken olması), doğumun hiç gerçekleştirilmemiş olması veya ileri yaşta yapılan doğumların olması, hiç emzirme yapmamış olmak veya emzirmenin çok az yapılması, erken yaş çocukluk döneminde meme bölgesine gerçekleştirilen radyoterapi işlemleri, menopoz döneminin sonrasında uzun süreli olarak kullanılan çeşitli hormon yerine koyma tedavileri, oral kontraseptif kullanım süresinde uzama, uzun süreli yüksek düzeyde alkol tüketimi, aşırı kilo artışı ve obezite , benign proliferatif meme hastalıkları, meme dokusunda bulunan çeşitli hiperplaziler gibi durumlar meme kanseri riskini artırabilir. Ayrıca, ailesel ve genetik faktörler, meme kanserinde biyomarker olarak kullanılan BRCA1 ve BRCA2 gibi genlerin mutasyonları, meme kanserinin yanı sıra over kanseri riskini önemli ölçüde artırabilir. Meme kanseri riskinin değerlendirilmesinde kullanılan bazı yaygın modeller arasında Gail, Claus, BRCAPRO ve Tyrer-Cuzick modelleri bulunmaktadır (Ban ve Dodellas, 2014; Tryggvadóttir ve ark, 2001; Kelsey ve Berkowitz, 1988). Meme kanserinin etyolojisi çok faktörlüdür. Bunlar arasında genetik, epigenetik ve endokrin gibi değiştirilemeyen faktörlerin önemli yeri vardır. Risk altındaki bireylere yapılacak etkili taramalar ile bireylerin klinisyenler tarafından değerlendirmeleri ve bilgilendirmeleri meme kanserinin görülme sıklığının düşürülmesine katkı sağlayabilir. Bununla birlikte obezite prevalansının azaltılması, sigara ve alkol kullanımının kısıtlanması ve düzenli olarak fiziksel aktivitenin gerçekleştirilmesi meme kanseri riskinin azaltılmasına yardımcı olabilecek faktörler arasındadır.

2.2.1. Meme Kanserinin Sınıflandırılması ve Evrelemesi

Heterojen bir yapıya sahip meme tümörleri, gen ekspresyon profillerine göre östrojen reseptörü (ÖR), progesteron reseptörü (PR) gibi hormon reseptörleri (HR) ile insan

epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) amplifikasyonu varlığı veya yokluğuna göre; LuminalA (HR+/HER2-), LuminalB (HR+/HER2+), HER2-zengin (HR-/HER2+), üçlü negatif (HR-/HER2-) ve meme benzeri olarak beş kategoriye göre sınıflandırılmaktadır (Waks ve Winer, 2019; Kohler ve ark, 2015; Eliyatkin ve ark, 2015).

Meme kanserinde bulunan heterojenliği histolojik özelliklerine sınıflandırma şekli ise daha çok klinikte kullanılmaktadır. Bu sınıflandırma sistemine göre kanser hücrelerinin bulunduğu bölgeye göre in situ ve invazif karsinoma olarak 2 ana gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar ise bulundukları bölgeye göre farklı olarak kategorize edilmektedir (Malhotra ve ark, 2010).

Meme kanserinde evreleme, tümörün boyutu ve yayılımının derecesi ile belirlenmektedir. En yaygın kullanılan sistem TNM evrelemesidir. Buna göre, tümör büyüklüğü (T), lenf nodu metastazı (N) ve uzak metastaz (M) varlığına göre derecelendirilmektedir.

2.2.2. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanserinde tedavi yöntemine, kanser hücrelerinin özelliklerine, yayılma derecesine, kanserin evresine ve hastanın sağlık durumuna göre karar verilmektedir (Waks ve Winer, 2019; Kohler ve ark, 2015). Erken tanı ve erken tedavi ile kür sağlanabilmekte ve sağkalım önemli ölçüde artırılabilir. Erken tanıda mamografinin çok önemli bir rolü bulunmaktadır. Metastatik meme kanserinde ise kür sağlanamamaktadır. Meme kanseri tedavisinde genel yaklaşım tümör rezeksiyonu sonrası kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve immunoterapidir (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2020). Tümörü ve çevre dokularını içeren bir bölümün çıkarılması (lumpektomi), memenin tamamının alınması (mastektomi) ve kanserin yayılım gösterdiği lenf nodlarının çıkarılması (sentinel lenf nodu biyopsisi) gibi cerrahi yöntemler kanserin yayılımına göre tercih edilmektedir. Kemoterapide ise çok çeşitli ajanlar ile farklı tedavi rejimleri uygulanabilmektedir. Kemoterapötik ajanların seçiminde kanser tipi ve yayılım derecesi önemli bir belirleyici olmakta ve bu ajanlardan doksorubisin, siklofosamid, dosetaksel, paklitaksel, nab-paklitaksel, metotreksat, 5-florourasil, sisplatin, kapesitabin gibi ilaçlar tedavi protokollerinde

sıklıkla kullanılmaktadır. Cerrahi ve kemoterapi tedavisi almış hastalara, östrojen ve progesteron hormon duyarlılığı mevcut ise hormon tedavisi uygulanmaktadır. Tamoksifen, gonadotropin agonistleri, aromataz inhibitörleri endokrin tedavide sık kullanılmaktadır (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2020). Radyoterapi ise hem tümörün bölgesel kontrolünü sağladığı hem de genel sağkalım süresini artırması nedeniyle operasyon sonrası tümör bölgesine radyoterapi uygulaması standart bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (Violet ve Harmer, 2004). HER2 pozitifliği olan hastada Trastuzumab'ın konvansiyonel kemoterapi tedavisine eklenmesi hedefe yönelik tedavide önemli bir seçenek olarak kullanılmaktadır. HER2 pozitif olan hastalarda prognozu olumlu yönde etkilemektedir. Bunların yanında hücre döngüsünde görevli siklin bağımlı kinaz 4/6 inhibitörlerinden (CDK 4/6i) palbociclib, ribociclib, abemaciclib gibi ajanların da kombinasyon olarak kullanımlarının tedaviyi olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir (Violet ve Harmer, 2004). Hedefe yönelik olarak klinik araştırmalarla etkinlikleri denenilen fazla sayıda ajan bulunmaktadır. Bunların yanında son yıllarda kemoterapi tedavisinin yanında immunoterapi yöntemleri de kombinasyon tedavisi olarak protokollere dahil edilmiştir. Meme kanseri düşük tümör mutasyon yükü ve tümöre infiltre edici lenfositlerin azlığı nedeniyle zayıf immunojenik olarak bilinmektedir. Bununla birlikte ÜNMK diğer meme kanseri tiplerine kıyasla daha fazla immunojenik özellik gösterdiğinden kanser immunoterapisine daha iyi yanıt verdiği bildirilmiştir (Zhang ve ark, 2022; Schmid ve ark, 2018).

2.3. Kanser İmmunoterapisi

Kanser tedavisinde immunoterapi, deneysel ve klinik çalışmalarla özellikle hastalıksız ve genel sağkalım üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle yeni tedavi protokollerine dahil edilmiş önemli bir tedavi yöntemidir. Kanser hücrelerini tanıyıp yok etmek üzere vücudun kendi savunma sistemine ait mekanizmaların kullanılması prensibine dayanmaktadır. Burada temel amaç, tümör hücrelerinin inaktive ettiği immün sistemin negatif regülatörlerinin etkinliğini inhibe ederek bağışıklık sistemini yeniden aktif hale getirerek ve kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını sağlanarak tümörlerin eliminasyonu amaçlanmaktadır. İmmunoterapötik yaklaşımlar arasında, monoklonal antikorlar, kimerik antijen reseptörü hücre tedavisi (CAR-T), immun

kontrol noktası inhibitörleri (İKNi) ve tümör aşıları gibi farklı immunoterapi yöntemleri bulunmaktadır (Yang, 2015; Higano ve ark, 2009). İmmunoterapi, bazı hastalarda sağ kalım artışına neden olmasının yanı sıra, bazı hastalarda ise etkisiz kalmıştır. Ayrıca immunoterapide immun sistemin aktive edilmesi amaçlandığından, immun hiperaktivitenin getirdiği bazı yan etkiler de tedaviyi olumsuz etkilemekte ve ciddi advers etkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle kanser mikroçevresinde oluşan immun yanıtın altında yatan mekanizmaların aydınlatılarak bu bağlamda gelişen olumsuz özelliklerin ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi ile yeni terapötik ajanların geliştirilmesi kanser immunoterapisinin başarısı açısından oldukça önem arz etmektedir (Tan ve ark, 2020).

2.3.1. İmmun Kontrol Noktaları Moleküler Biyolojisi

Kanser hücrelerinin kendine has bir immun döngüsü bulunmaktadır. Bu döngüde birçok bağışıklık hücresi önemli görevler almaktadır. Döngünün ilk basamağında kanser hücrelerinin oluşturduğu ve kanser hücresine özgü olan veya kanser hücresiyle ilişkili olan antijenler, bu hücrelere özgü antijen sunan hücreler (Antigen presenting cells, APC) tarafından tutularak, büyük doku uyuşum kompleksine (Major histocompatibility complex, MHCI-II) sunulmaya hazır hale getirilir. APC'lerde sunuma hazır hale getirilen antijenler T hücre reseptörüne bağlanarak döngünün ilk basamağı gerçekleşmiş olur. Bu basamağın gerçekleşmesi ile T hücrelerinin aktivasyonu için gerekli olan ilk sinyal sağlanır. Daha sonra ikinci bir sinyal olan gerçekleşmesi için APC'lerde bulunan CD80 ve CD86 ligandları ile T hücrelerinde bulunan CD28 reseptörünün bağlanması gerçekleşerek ikinci sinyalin oluşması tamamlanır. Bu şekilde T hücreleri aktif hale gelerek interlekin 2, 4, ve 7 (IL-2,4,7) gibi hücre çoğalmasını uyaran sitokinlerin çoğalması kendiliğinden stimülasyonla gerçekleşir. Etkin hale gelen ve sayıca artan T hücreleri, kanser hücrelerinin bulunduğu tümör alanına giderek bu bölgedeki kanser hücrelerini tespit eder ve hücrelere infiltre olur. Perforin ve granzim enzimlerinin aktivitesi sayesinde hücreler apoptoza uğrayarak kontrollü hücre ölümü gerçekleşmiş olur. Parçalanmış kanser hücrelerinin sağlanan antijenler yeniden APC'ler tarafından tanınarak yeniden T hücrelerine sunulur ve böylece döngünün sürdürülmesi gerçekleştirilir (Chen ve Flies, 2013; Cogdill ve ark, 2017; Chen ve Mellman, 2013).

Kanser hücrelerinin artışı sağlayan çeşitli mekanizmalardan biri de immun kontrol noktalarının aktivasyonunun inhibe edilerek bağışıklık sisteminden kaçabilmelerini ve vücutta kolayca çoğalabilmelerini sağlayan mekanizmalardır (Chen ve Flies, 2013). Kanser oluşum süreçlerinin yanı sıra çeşitli hücrelerel olaylarda da T hücreleri düzenli olarak antijenler tarafından düşük düzeyde stimüle edildiğinde, T hücreleri varlığını sürdür ancak etkinliği azalmaktadır. Negatif regülatörler olan immun kontrol noktaları, bağışıklık sisteminin fazla aktivasyonunu engelleyerek, vücutta istenmeyen immun reaksiyonları önlemektedir. Bu sayede kanser hücreleri de immun sistemin gözetiminden kaçarak çoğalabilmekte ve vücutta yayılmaları gerçekleşebilmektedir.

2.3.1.1. PD-1/PD-L1 Sinyal İletimi

Bağışıklık sisteminin negatif düzenleyicilerinden olan Programlı Ölüm Ligandı-1 (PD-L1) tümör hücrelerinin bazı tiplerinde oldukça fazlaca ifade edilebilen bir ligand olup, bu ligandın reseptörü ise T hücreleri üzerinde ifade edilen Programlı ölüm-1 (PD-1) reseptörüdür. İmmun kontrol noktalarında bu reseptörün ligandıyla etkileşimi sonrasında T hücre stimülasyonu azalmakta ve böylece CD8+ T hücreleri olan sitotoksik T hücrelerinin çoğalması ve etkinliği azalmaktadır. PD-1 ve PD-L1'e uygun olarak üretilmiş olan ICi'lerinin, etkinliği azalmış olan T hücrelerinin aktivasyonlarının sağlanarak çeşitli sitolitik enzimlerin salgılanarak tümör hücrelerinin parçalanmasının gerçekleştirilmesi ile kanser hücrelerinin bertarafı ve yayılmaları azaltılmış olacaktır (Waldman ve ark, 2020; Patel ve Kurzrock, 2015).

2.3.1.2. CTLA4 Sinyal İletimi

Sitotoksik T lenfosit İlişkili Protein 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 CTLA-4), T hücrelerinin aktivasyonunu düzenleyen bir protein reseptörüdür. Aktivasyon sonrasında, CTLA-4, APC'lerin yüzeyinde bulunan CD80/86 reseptörlerine bağlanarak CD28 reseptörü ile rekabet eder. CD28 reseptörü, T hücrelerinin aktivasyonunu artıran bir sinyal sağlarken, CTLA-4 sinyali ise T hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu baskılar. Böylece, CTLA-4 sinyali, T hücrelerinin aşırı aktivasyonunu ve aşırı yanıtını kontrol ederek bağışıklık tepkisini dengeler. Bu mekanizma, bağışıklık sisteminin hiperaktivasyonunu önleyerek ve dokulara zarar vermemesini sağlar. CTLA-4 inhibitörleri (örn, ipilimumab), bağışıklık sistemi aracılığıyla kanser hücrelerine yönelik yanıtı artırmak için kullanılan

immunoterapide kullanılmaktadır (Waldman ve ark, 2020; Hossen ve ark, 2023, Wykes ve Lewin, 2018).

2.3.1.3. LAG3 Sinyal İletimi

Lenfosit Aktivasyon Geni 3 (LAG-3, CD223), T hücrelerinde bulunan ve bağışıklık sistemini düzenleyen önemli bir hücre yüzey reseptörüdür. Bu reseptör, bağışıklık yanıtını kontrol etmek için çeşitli mekanizmalara etki eder. Özellikle, LAG-3, hücre proliferasyonunu ve aktivasyonunu inhibe ederek, T hücrelerinin aşırı yanıtını önler. Aynı zamanda, LAG-3, sitokin salgısını inhibe ederek bağışıklık yanıtını düzenler ve aşırı immün aktiviteyi kontrol altında tutar. Bu özelliklerinden dolayı, LAG-3, immün kontrol noktası olarak tanımlanır ve anti-kanser tedavilerinde hedeflenen önemli bir moleküldür. Kanser hücrelerine karşı immün yanıtı artırmak ve kanserle mücadelede etkili olmak için LAG-3'e yönelik terapiler geliştirilmiştir. PD-1/PD-L1 ve CTLA-4 ile, LAG-3, kanser immünoterapisinde hedeflenen en önemli immün kontrol noktalarından biridir. Bu nedenle, LAG-3'e yönelik terapiler, kanser tedavisinde potansiyel olarak önemli bir rol oynayabilmekte ve bağışıklık sisteminin kanserle mücadelesinde yeni ve etkili stratejiler sunabilme potansiyeline sahiptir (Chocarro ve ark, 2021).

2.3.2. Meme Kanseri Tedavisinde İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri

Onkolojide bağışıklık sistemini hedef alan tedavilerin kullanımı son yıllarda artış göstermiştir. Özellikle İKni 'lerinin solid tümörlerdeki başarısı, bu ajanların tedavideki kullanımlarının artmasına yol açmıştır (Shiravand ve ark, 2022). Meme kanseri tedavisinde çeşitli İKni'leri oldukça fazla klinik çalışmalarda araştırılmaktadır. Meme kanseri, diğer solid tümörler arasında daha düşük immunojenik olmaları nedeniyle soğuk tümörler olarak bilinmektedir (Zhang ve ark, 2022; Schmid ve ark, 2018). Diğer meme kanseri tiplerinde göre daha fazla PDL1 eksprese eden bunun yanında tümöre infiltre eden lenfositlerin (TİL) ve tümör mutasyon yükü fazla olan daha immunojenik yapıya sahip olan üçlü negatif meme kanseri hastalarında, PD1/PDL1 inhibitörlerinin klinikte kullanılmaktadır. 2019

yılında Dünya Sağlık Örgütü (FDA) tarafından ÜNMK’de ilk immünoterapi onayı verilmiştir. Buna göre PD-L1 inhibitörü Atezolizumab ile nab-paklitakselin kombine kullanımının etkinliği klinik çalışmalarla gösterilmiştir (Miles ve ark, 2021). Buna karşın, başka bir klinik çalışmada, daha önceki yapılan klinik çalışmalarla çelişen başka sonuçlar paylaşılmıştır (Kwapisz, 2021). Onkolojide immünoterapi uygulamalarında her ne kadar genel sağkalım üzerinde pozitif etkisinin belirlendiği çalışmalar mevcut olsa da, halen bu ajanların kullanımında seçilecek hasta grubunun standardizasyonu ile ilgili sorunlar bulunmaktadır. Bu nedenle tedavi etkinliğinin önceden öngörülebilmesini sağlayan belirteçlerin geliştirilmesi oldukça önem arz etmektedir. İmmünoterapi etkinliğini belirleyen en önemli etkenlerden biri, İKN moleküllerinin, kanser immun mikroçevresine göre değişen ekspresyon profilleridir. İKNi’lerinin duyarlılığını artırmak ve İKN’lerinde görevli genlerin ekspresyon profillerinin belirlenmesi ve moleküler patogenezinin aydınlatılarak hedefe yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır.

2.4. miRNA’lar

MikroRNA’lar (miRNA) 20-22 nt uzunluğunda olan küçük kodlanmayan RNA molekülleridir. Hedef genlerden transkribe edilen mRNA ile bağlanarak, mRNA’nın parçalanması ve translasyonun inhibisyonu sağlamakta ve bu şekilde post transkripsiyonel süreçte hedef genin ifadesini düzenlemektedir. MiRNA’lar, bir genin ekspresyonunu, translasyonu yapılmayan 3' bölgesine (3' UTR) doğrudan bağlanarak veya ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan diğer genleri hedefleyerek düzenleyebilmektedir. Hücre döngüsü, farklılaşması, proliferasyonu, invazyon ve metastazının dışında ilaç direnci gibi çok önemli hücresel mekanizmalarda rol oynayarak metabolizma, bağışıklık ve hastalık gibi birçok biyolojik süreci etkilemektedir (Bartel, 2004).

2.4.1. miRNA’lar ve Kanser

MiRNA’ların anormal düzeydeki ekspresyonlarının kanser, nörolojik bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer birçok hastalık ile ilişki içerisinde (Karnati ve ark, 2015; Ardekani ve Naeini, 2010; Zhou ve ark, 2018; Smolarz ve ark, 2022). Kanser gelişimi ve ilerlemesinde, tümör baskılayıcı veya kanserin ilerlemesine neden olacak şekilde onkogen olacak şekilde iki yönlü olarak etki etmektedir. Bu

etkiler, miRNA genlerinin amplifikasyon, delesyon, miRNA biyogenezindeki sorunlar, miRNA'ların anormal transkripsiyonu, epigenetik değişiklikler gibi birçok mekanizma üzerinden oluşmaktadır. Bu mekanizmalar sonucunda değişen miRNA karakteristiği ile kanser hücrelerinin immün gözetimden kaçınarak proliferasyonunu devam ettirmelerini, hücre ölümüne direnme ve proliferasyonu indüklemeye, ayrıca anjiyogenezin indüklenerek migrasyon, invazyon özelliklerini geliştirmektedir. Ayrıca, miRNA'lar sadece kanser hücreleri üzerinde değil, aynı zamanda tümör mikroçevresinde de etkiye sahiptir. MiRNA'lar, terapötik bir hedef olmalarının dışında, diagnostik ve prognostik belirteç olarak da kullanılabilir. Ayrıca miRNA profillemesinin, hastalıkların altında yatan moleküler patogenezin aydınlatılarak malign transformasyona katkısını belirlemek, yeni hedef tedavi modellerinin geliştirilmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Kwapisz, 2021, Peng, ve Croce, 2016; Smolarz ve ark, 2022).

2.4.2. İmmün Kontrol Noktaları ve miRNA Regülasyonu

İmmün kontrol noktaları, kanser hücrelerinin immün gözetimden kaçmalarında ve tümör mikro ortamının oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. MiRNA'ların ekspresyonundaki farklılıkların, PD-1/PD-L1 gibi immün kontrol noktaları sinyal iletiminde önemli değişikliklere neden olabileceğini, bu yolları direkt veya indirekt olarak etkileyebildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarla, bazı miRNA'ların, PD1/PD-L1 ekspresyonunu direkt olarak veya JAK/STAT (Janus kinaz-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon proteinlerinin aktivatörü), PI3K/AKT (Fosfatidilinositol 3-kinaz/Protein kinaz B), MAPK/ERK (Mitojen-aktif protein kinaz/ ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz) gibi sinyal yollarının regülasyonu yoluyla etkileyebildiği bildirilmiştir (Wang ve ark, 2017). Melanoma hücrelerinden salgılanan sekretomların, miR-155 aracılığıyla post transkripsiyonel olarak CTLA4 mRNA'sının ifadesini azaltırken aynı zamanda Treg hücrelerinde FOXP3 (Forkhead Box P3) ekspresyonunu artırarak Treg hücrelerinin proliferasyonunu ve baskılayıcı fonksiyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Vaddi ve ark, 2023). miR-105, miR-487a-3p ve miR-9'un doğrudan CTLA-4'ü hedeflediği ve ekspresyonunu azalttığı, bununla birlikte CTLA-4 ekspresyonunu dolaylı olarak etkileyen bazı miRNA'ların, CTLA-4 transkripsiyonu için önemli bir faktör olan FOXP3 seviyesini etkileyerek yaptığı, Ayrıca aşırı eksprese edilen miR-95'in dolaylı yoldan FOXP3 ekspresyonunu

indüklediği gösterilmiştir (Fayyad-Kazan ve ark, 2012). miR-126'nın Treg hücrelerindeki ifadesinin azalması, hem FOXP3 hem de CTLA-4 ekspresyonunun baskılanmasına yol açarak bu hücrelerin baskılayıcı aktivitesinin bozulmasına yol açmıştır (Qin ve ark, 2013). miR-4717 ve miR-28'in PD-1'in ekspresyonunu doğrudan hedeflediği ve ifadesini azalttığı, ayrıca T hücrelerine bir miR-28 inhibitörü eklendiğinde, PD-1'in yanında TIM-3 (T hücre İmmünoglobulin ve Mucin-domain içeren protein 3) ve BTLA (B ve T-lenfosit Zayıflatıcı) gibi ko-inhibitör moleküllerin ifadesinde artışa neden olmuştur (Li ve ark, 2016).

Günümüzde mikroRNA'lar ile İKN'larında rol alan ko-inhibitör moleküllerin prognostik rolleri veya bu molekülleri hedef alan antikorlarının terapötik etkileri arasındaki korelasyonu araştıran çalışmalar giderek artmaktadır. Bu çalışmalar, hem bağışıklık sistemiyle ilgili hastalıkların anlaşılmasına hem de kanser gibi hastalıkların tedavisine odaklanan araştırmalar için de önemli bir alan oluşturmaktadır.

Gereç ve Yöntem

3.1. Olgu Seçimi ve Çalışma Dizaynı

Çalışmamız, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'nun vermiş olduğu 29.06.2021 tarihli E.209614 sayılı etik kurul onayı ile gerçekleştirildi. Sağlık Bakanlığı Üniversitesi Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi'nde takipleri yapılan, 18 yaş ve üstü, tek taraflı veya çift taraflı meme kanseri hikayesi olan, cerrahi, radyoterapi veya kemoterapi de dahil olmak üzere herhangi bir tedavi almış veya almamış gönüllü kadın hastalar çalışmaya dahil edildi. Olgularda evre ve/veya grade farkı gözetilmemiştir. Kontrol grubu ise, son 1 yıl içerisinde mamografi çekilmiş ve memesinde kitle bulunmayan gönüllü kişilerden oluşmuştur.

Araştırmanın güç analizi, *G*Power 3.0.8* programı ile yapılmıştır. Etki büyüklüğü orta düzeyde 0,50 alınarak %80 güç ve 0.05 hata ile her bir grupta 50 hasta ve 50 sağlıklı kontrol grubu olmak üzere (toplamda 100 kişi) ile analizler gerçekleştirildi.

3.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya dahil olan her bireyden 5 ml periferik kan toplandı -80°C'de saklandı.

3.3. Total RNA ve miRNA İzolasyonu

3.3.1. Total RNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarından alınan kan örneklerinden total RNA izolasyonları *Hybrid-R Blood RNA (Cat # 305-101, GeneAll Biotechnology)* kiti manüeline göre gerçekleştirildi. Buna göre aşağıda belirtilen basamaklar uygulandı.

RNA izolasyon Basamakları;

- 250 µl tam kan örneği, 750 µl RiboEx™ ile 1,5 ml lik ependorfa alınarak vortekslendi ve 23°C'de 2 dk inkübasyona bırakıldı. Fenol ve guanidyum tuzu içeren monofazik bir çözelti olan RiboEx™ ile hücreler parçalanmış ve nükleazlar etkisiz hale gelmiştir.

- 0.2 ml kloroform eklenerek 15 sn çalkalandı ve 2 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 4°C’de 12000g de 15 dk boyunca santrifüj edilerek faz ayrılması sağlandı.
- 3 faza ayrılan karışımın üst fazı (yaklaşık 450 µl) EzPure™ filtreli tüpe alınarak DNA ve diğer kan kalıntılarından filtrelenmesi sağlandı ve daha sonra oda sıcaklığında 10000g’de 30 sn santrifüj edildi.
- Toplama tüpüne 900 µl RB1 tamponu eklendi ve pipetaj yapılarak karışım iyice homojenize edildi.
- Yaklaşık 700µl karışım W Tipi kolona aktarıldı ve oda sıcaklığında 10000g’de 30 sn santrifüj edildi.
- Numunenin kalanı için de bir önceki basamakta yapılan işlemler tekrar edildi.
- Mini kolona 500 µl RBW tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 10000g’de 30 sn santrifüj edildi. Kolondan geçen sıvı atılarak mini kolona tekrar 500 µl RBW tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 10000g’de 30sn santrifüj edildi.
- Kolonu yıkama tamponunun kalıntılarından arındırmak amacı ile oda sıcaklığında 10000g’de 1dk daha santrifüj edildi.
- Mini kolona 50 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 10000g’de 1dk santrifüj edildi.
- Saflaştırılmış RNA, analiz edilene kadar -20°C’de saklandı.

3.3.2. miRNA İzolasyonu

Olgu ve kontrol grubu örneklerinden miRNA izolasyonu için *Hybrid-R miRNA mini 5* (Cat # 325-150, GeneAll Biotechnology) kiti manüeline göre gerçekleştirildi. Buna göre aşağıda belirtilen basamaklar uygulandı.

miRNA izolasyon Basamakları;

- 250 µl tam kan örneği, 750 µl RiboEx™ ile 1,5 ml lik ependorfa alınarak vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi. RiboEx™, fenol ve guanidyum tuzu içeren monofazik bir çözeltilidir. Hücrelerin parçalanmasını ve nükleazların etkisiz hale gelmesine neden olmaktadır.

- Her 500 µl RiboEx™'e 100 µl kloroform eklenerek kuvvetli olarak 15 sn çalkalandı ve 2 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 4°C'de 12000 g de 15 dk boyunca santrifüj edilerek faz ayrılması sağlandı.
- Renksiz üstte kalan sıvı faz (yaklaşık 450 µl) başka bir tüpe alındı.
- 450 µl %50 lik etanol eklenerek karışım kuvvetlice çalkalandı.
- 700 µl karışım bir mini spin kolona aktarıldı ve oda sıcaklığında 10000 g'de 30 sn santrifüj edildi.
- Büyük RNA molekülleri kolona bağlanırken, toplama kabında bulunan sıvıda miRNA'lar bulunmaktadır.
- Toplama kabında bulunan sıvıya 1 hacim %100'lük etanol eklendi ve pipetaj yapılarak karışım iyice homojenize edildi.
- Mini spin kolonuna bu karışımın 650 µl'si aktarıldı ve oda sıcaklığında 10000g'de 30 sn santrifüj edildi.
- Numunenin kalanı için de bir önceki basamaktaki işlemler tekrar edildi.
- Mini spin kolona 500 µl RBW tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 10000 g'de 30 sn santrifüj edildi. Kolondan geçen sıvı atılarak mini kolona tekrar 500 µl RBW tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 10000 g'de 30sn santrifüj edildi. Bu işlem 1 kez daha tekrar edildi.
- Kolonu yıkama tamponunun kalıntılarından arındırmak amacı ile oda sıcaklığında 10000 g'de 1dk daha santrifüj edildi.
- Mini kolona 50 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 10000g'de 1dk santrifüj edildi.
- Saflaştırılmış miRNA'lar, analiz edilene kadar -20°C'de saklandı.

3.3.3. RNA Miktar ve Saflık Ölçümü

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık kontrolleri için her bir örnekten 1-1,5 µl alınarak, Nanodrop cihazı ile 260/280 nm ve 230/260 nm dalga boylarında absorbansları ölçüldü. Buna göre, 1.8-2.2 absorbans aralığındaki RNA örnekleri kullanılarak ileri analizler gerçekleştirildi.

3.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Uygun miktar ve saflıkta olan kalıp RNA'lerden *cDNA Synthesis Kit (High Capacity)* (Cat # C03-01-05, A.B.T. Laboratory Indust.) kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak Roche Light Cycler 480 PCR cihazında ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Her bir RNA numunesi için reaksiyon karışımı Tablo 1'ye göre hazırlandı ve Tablo 2'de belirtilen termal profilde cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Kit protokolüne göre;

- 1- Tablo 1'de belirtilen kit bileşenleri belirtilmiş miktarlarda ependorfta karıştırıldı.
- 2- İçeriğin homojen olarak karışması amacıyla santrifüj edildi.
- 3- Tablo 2'de belirtilen termal döngü profiline uygun olarak kalıp RNA dan cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 1. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı

Kit İçeriği	Miktar
10X Reaksiyon Buffer	2 µl
Random hexamer (50 µM)	2 µl
dNTP (2,5 mM)	1 µl
Reverse Transkriptaz (200 U/µl)	1 µl
RNaz İnhibitörü	0,5 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	3,5 µl
Kalıp RNA	10 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 2. cDNA Termal Döngü Profili

İşlem Basamağı	Termal Profil
Hazırlanma	10 dk- 25°C
Reverse Transkripsiyon (RT) Aktivasyonu	120 dk- 37°C
Reverse Transkripsiyon (RT) İnaktivasyonu	5 dk-85°C
Soğuma	∞- 4°C

3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

cDNA sentezini takiben, ekspresyon analizi için seçilmiş immün kontrol noktası ko-inhibitör molekülleri hedef genlerinden PD1, PDL1, CTLA-4, LAG3'ün hedef bölgelere özgü primerleri ile bu hedef genlerin regülasyonunda rol oynadığı in silico olarak (TargetScan; Release 7.2) belirlenen 21 adet miRNA'nın primer dizileri kullanılarak mRNA ve miRNA seviyesindeki transkript miktarı belirlendi. mRNA ve miRNA primer dizileri Tablo 5 ve Tablo 6'de belirtilmiştir. Referans miRNA olarak SNORD48 primeri, referans mRNA olarak da beta aktin kullanıldı. cDNA, primerler ve BlasTaq 2X qPCR MasterMix (*ABM Catalog #G891*) Sybr Green) ile her gen için Tablo 3'de verilen reaksiyon karışımı hazırlanarak Tablo 4'de belirtilen termal profile göre Lightcycler 480 cihazında q-RT-PCR analizi gerçekleştirildi.

Tablo 3. qRT-PCR analizlerinde hazırlanan reaksiyon karışımı

İçerik	Miktar
Mastermix	10 µl
cDNA	100 ng
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	Değişken
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 4. qRT-PCR analizi termal döngü profili

İşlem Basamağı	Termal Profil	Döngü Sayısı
Enzim Aktivasyonu	3 dk- 95°C	1
Denatürasyon	15 sn.- 95°C	40
Bağlanma/Uzama	1 dk- 60 °C	
Erime Eğrisi	72 – 95 °C	

Tablo 5. Kullanılan genlerin primer dizileri

Gen İsimleri	Primer Dizileri
PD-1 (NM_005018.3)	F; 5'-TGACAGAGAGAAGGGCAGAAGT-3' R; 5'-TCCCCATAGTCCACAGAGAACA-3'
PD-L1 (NM_014143.4)	F; 5'-AGACCACCACCACCAATTCC-3' R; 5'-TGGAGGATGTGCCAGAGGTA-3'
CTLA4 (NM_005214.5)	F; 5'-GATTCTGACTTCCTCCTCTGGAT-3' R; 5'-TCTGTTGGGGGCATTTTCACA-3'
LAG3 (NM_001414176.1)	F; 5'-TGCTCCTTTTGGTGACTGGA-3' R; 5'-TATTTGGACTGGGCTGCTGA-3'
Beta Actin (NM_001101)	F; 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' R; 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

Tablo 6. Kullanılan miRNA'ların primer dizileri

miRNA İsimleri	Primer Dizileri
hsa-miR-6748-3p	F; 5'-TCCTGTCCCTGTCTCCTACAG-3'
hsa-miR-6756-3p	F; 5'-TCCCCTTCCTCCCTGCCCAG-3'
hsa-miR-874-3p	F; 5'-CTGCCCTGGCCCGAGGGACCGA-3'
hsa-miR-372-3p	F; 5'-AAAGTGCTGCGACATTTGAGCGT-3'
hsa-miR-302e	F; 5'-TAAGTGCTTCCATGCTT-3'
hsa-miR-302c-3p	F; 5'-TAAGTGCTTCCATGTTTCAGTGG-3'
hsa-miR-520e-5p	F; 5'-CTCAAGATGGAAGCAGTTTCTG-3'
hsa-miR-520d-3p	F; 5'-AAAGTGCTTCTCTTTGGTGGGT-3'

miRNA İsimleri	Primer Dizileri
hsa-miR-520b-5p	F; 5'-CCTCTACAGGGAAGCGCTTTC-3'
hsa-miR-6838-5p	F; 5'-AAGCAGCAGTGGCAAGACTCCT-3'
hsa-miR-373-3p	F; 5'-GAAGTGCTTCGATTTTGGGGTGT-3'
hsa-miR-302a-3p	F; 5'-UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA-3'
hsa-miR-302b-3p	F; 5'-UAAGUGCUUCCAUGUUUAGUAG-3'
hsa-miR-302d-3p	F; 5'-UAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGU-3'
hsa-miR-520a-3p	F; 5'-AAAGUGCUUCCCUUUGGACUGU-3'
hsa-miR-15a-5p	F; 5'-UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG-3'
hsa-miR-195-5p	F; 5'-UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC-3'
hsa-miR-424-5p	F; 5'-CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA-3'
hsa-miR-15b-5p	F; 5'-UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA-3'
hsa-miR-16-5p	F; 5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'
hsa-miR-497-5p	F; 5'-CAGCAGCACACUGUGGUUUGU-3'

3.6. İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. RT-qPCR ile tespit edilen hedef genlerin mRNA ve miRNA ekspresyon seviyeleri, olgu ve kontrol grupları karşılaştırılarak, $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülüne göre hesaplandı ve istatistiksel olarak anlamlılığı SPSS 25.0 (IBM) yazılımında $p < 0.05$ 'in önemi referans alınarak Mann-Whitney U Test ve Wilcoxon W testi ile değerlendirildi.

Bulgular

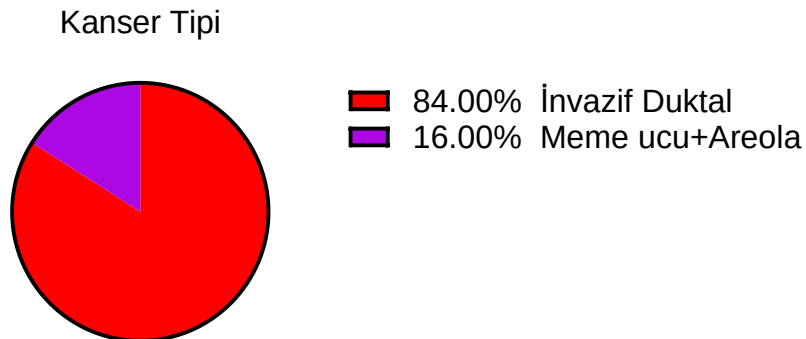
4.1. Olgu ve Sağlıklı Kontrol Grubuna Ait Demografik ve Klinik Özellikler

Çalışmaya 50 hasta ve 50 sağlıklı kontrol grubu olmak üzere toplam 100 kişi katılmıştır. Hem hasta hem de kontrol grubunun tamamı kadınlardan oluşmaktadır. Hasta grubunun yaş ortalaması $53,68 \pm 6,14$, kontrol grubunun yaş ortalaması ise $47,9 \pm 4,02$ olarak belirlendi. 50 hastadan 42'si (%84) invazif duktal karsinom, ve 8'i (%16) meme başı+areola karsinomu olarak belirlendi (Tablo 7, Grafik 1). Hastaların, 23'ünde (%46) hormon reseptörü pozitifliği mevcutken, 27'sinde (%54) hormon reseptörü negatifliği mevcuttu (Tablo 7, Grafik 2).

Tablo 7. Olguların demografik ve klinik özellikleri

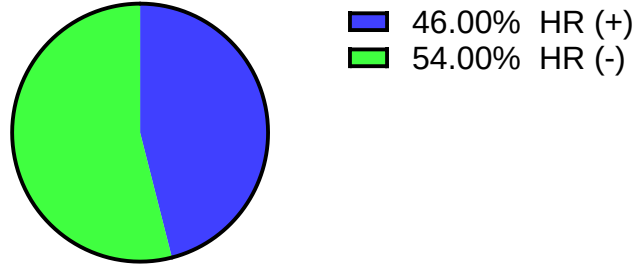
Yaş	Kanser Tipi		Hormon Reseptör Ekspresyonu (HR)	
	ID	MU+A	HR+	HR-
$53,68 \pm 6,14$	42(%84)	8 (%16)	23(%46)	27 (%54)

ID; İnvazif Duktal, MU+A; Meme Ucu+ Areola



Grafik 1. Olguların kanser tipine göre dağılımları

Hormon Reseptörü Ekspresyonu



Grafik 2. Olguların hormon reseptörü ekspresyon durumlarına göre dağılımları

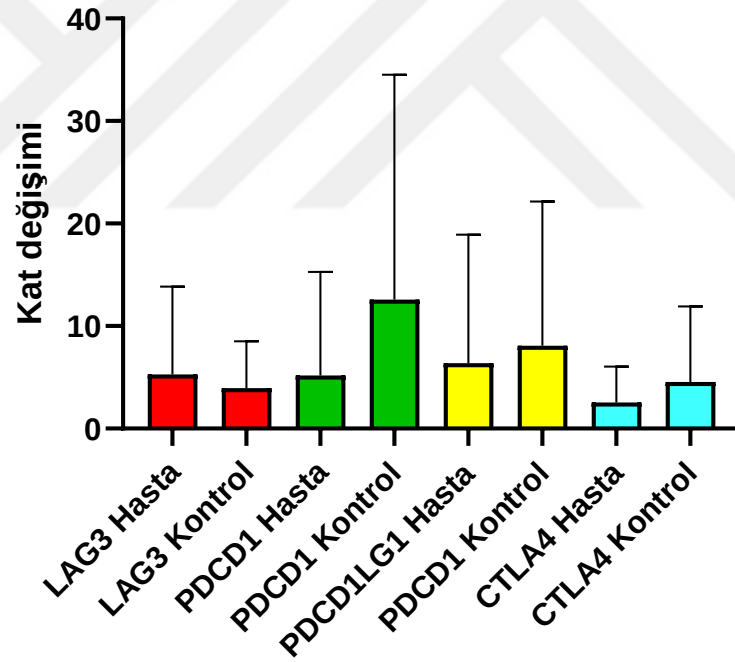
4.2. Olgu ve Sağlıklı Kontrol Grubunda mRNA VE miRNA Ekspresyon Düzeyleri

4.2.1. Olgu ve Sağlıklı Kontrol Grubunda mRNA Ekspresyon Düzeyleri

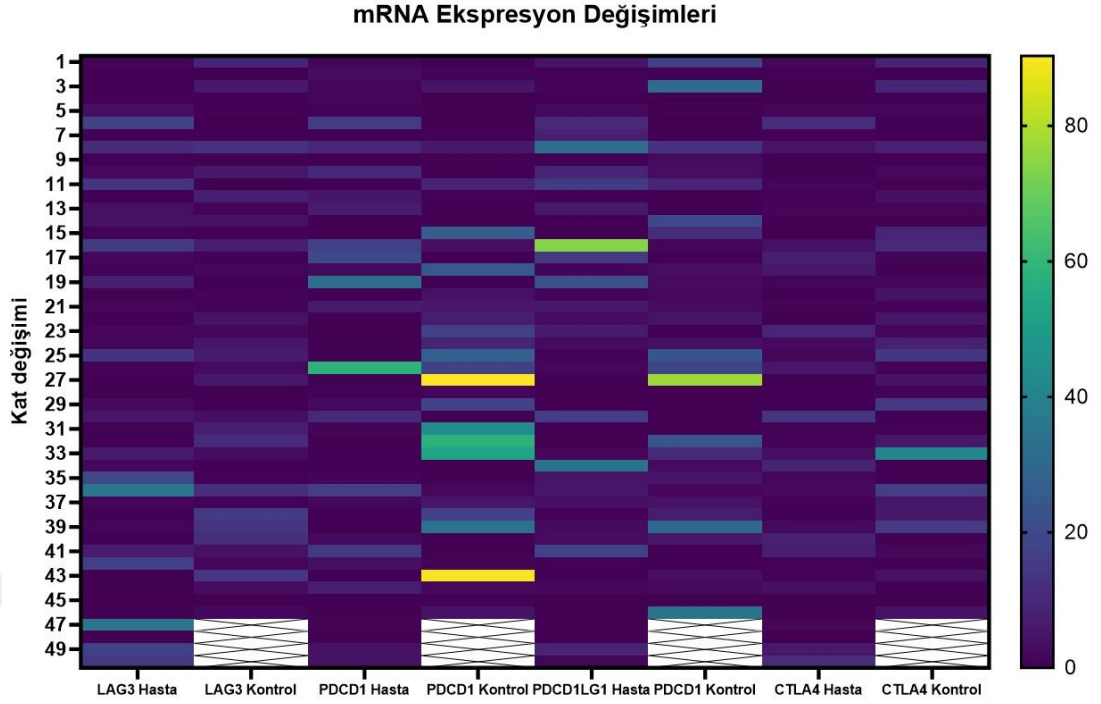
Hasta ve kontrol grubundan alınan örneklerinde RT-qPCR yöntemi ile belirlenen PDCD1, CTLA4, PDCD1LG1 ve LAG3 genlerine ait ekspresyon verilerine göre; PDCD1 geninin kat değişimi hasta grubunda 5.44 ± 10.10 , kontrol grubunda 12.59 ± 21.93 , CTLA4 geninin kat değişimi hasta grubunda 2.39 ± 3.48 , kontrol grubunda ise 4.56 ± 7.34 , PDCD1LG1 geninin kat değişimi hasta grubunda 6.74 ± 12.52 , kontrol grubunda ise 8.0841 ± 14.05 ve son olarak LAG3 geninin kat değişimi hasta grubunda 5.29 ± 8.55 , kontrol grubunda ise 3.95 ± 4.57 olarak belirlendi. Elde edilen bu verilere dayanarak, hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$, Tablo 8, Grafik 3 ve 4).

Tablo 8. Olgu ve sağlıklı kontrol grubunda mRNA gen ekspresyon düzeyleri

Gen	KONTROL	HASTA
	Kat Değişimi	Kat Değişimi
PDCD1	12.59±21.93	5.44±10.10
CTLA4	4.56±7.34	2.39±3.48
PDCD1LG1	8.08±14.05	6.74±12.52
LAG3	3.95±4.57	5.29±8.55



Grafik 3. Olgu ve sağlıklı kontrol grubunda mRNA gen ekspresyonlarının değişimi



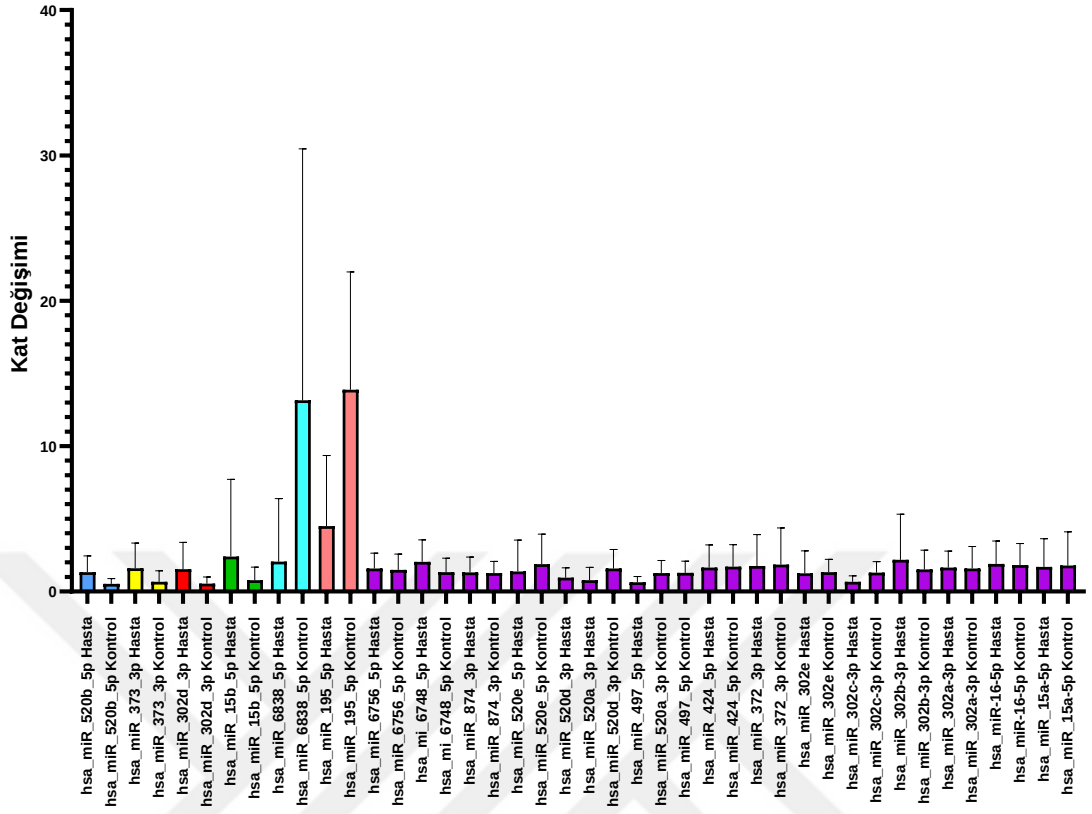
Grafik 4. Olgu ve sağlıklı kontrol grubunda mRNA gen ekspresyon düzeyleri ısı haritası

4.2.2. Olgu ve Sağlıklı Kontrol Grubunda miRNA Ekspresyon Düzeyleri

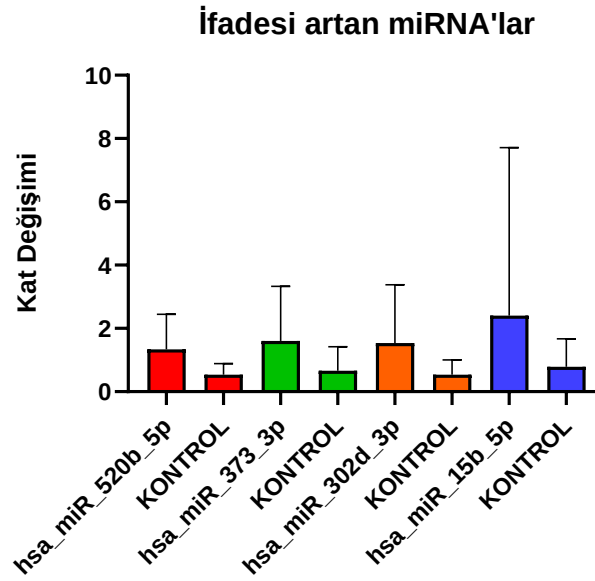
Hasta ve kontrol gruplarından alınan örneklerde in silico PD-1, PDL-1, CTLA-4 ve LAG-3 genlerinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen 21 farklı miRNA'nın RT-qPCR ile ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Buna göre, hasta grubuna ait ekspresyon verileri kontrol grubuna göre kıyaslandığında, analiz edilen 21 miRNA'dan 6 tanesinin ekspresyonlarının değişen düzeylerde artış veya azalma sergilediği belirlendi (Tablo 9, Grafik 5). Buna göre, miR-195-5p ifadesinin ise kontrol grubuna kıyasla, -3.09 kat daha düşük ifade edildiği ($p < 0.0001$) saptanmışken; miR-6838-5p ekspresyonunun kontrol grubuna göre -6.93 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.0001$). Kontrol grubuna kıyasla, miR-520b ailesinden olan miR-520-5p ifadesinin 2.46 kat ($p < 0.0001$), miR-302d-3p ifadesinin 2.83 kat ($p < 0.0001$), miR-15b-5p nin 3.08 kat ($p < 0.0001$), miR-373-3p nin ise 2.40 kat ($p < 0.0001$) olgu grubunda daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 9, Grafik 5). Sağlıklı kontrol grubuna göre olgu grubunda ifadesinde artış görülen miRNA'lar Grafik 6 ve Grafik 7'de, azalış görülenler ise Grafik 8 ve Grafik 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Olgu ve sağlıklı kontrol grubunda miRNA ekspresyon düzeyleri

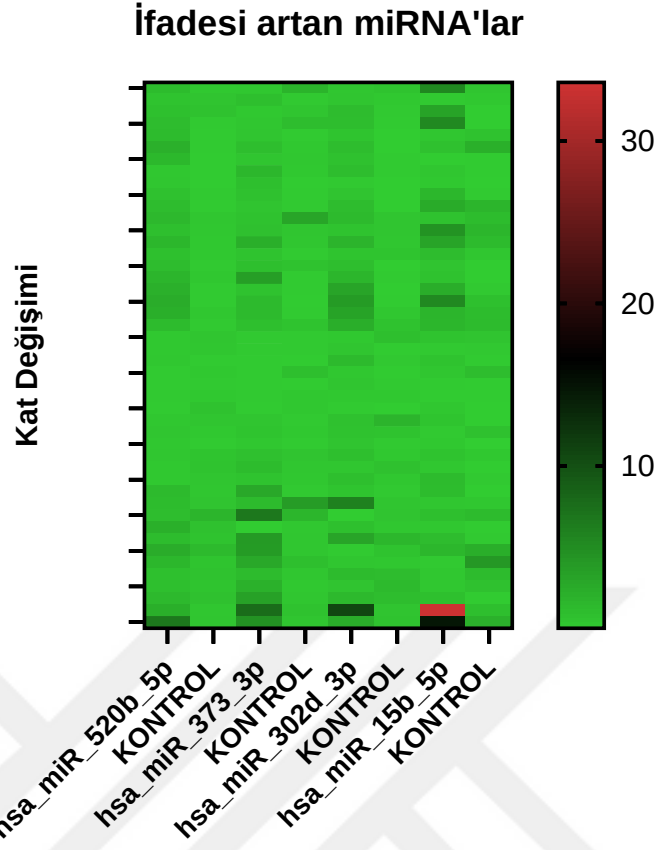
miRNA	$2^{-\Delta\Delta CT}$	
	Hasta $\pm$ ss Kat Değişimi	Kontrol $\pm$ ss Kat Değişimi
hsa_miR_6838_5p****	2.05 $\pm$ 4.34	13.16 $\pm$ 17.28
hsa_miR_6756_3p	1.49 $\pm$ 1.08	1.58 $\pm$ 1.05
hsa_miR_6748_5p	1.33 $\pm$ 0.97	2.04 $\pm$ 1.51
hsa_miR_874_3p	1.27 $\pm$ 0.80	1.31 $\pm$ 1.05
hsa_miR_520e_5p	1.89 $\pm$ 2.06	1.37 $\pm$ 2.16
hsa_miR_520d_3p	1.58 $\pm$ 1.32	0.96 $\pm$ 0.67
hsa_miR_520b_5p****	1.33 $\pm$ 1.11	0.54 $\pm$ 0.35
hsa_miR_520a_3p	1.27 $\pm$ 0.87	0.78 $\pm$ 0.89
hsa_miR_497_5p	1.29 $\pm$ 0.81	0.63 $\pm$ 0.40
hsa_miR_424_5p	1.72 $\pm$ 1.51	1.64 $\pm$ 1.56
hsa_miR_373_3p****	1.61 $\pm$ 1.72	0.67 $\pm$ 0.76
hsa_miR_372_3p	1.86 $\pm$ 2.52	1.75 $\pm$ 2.17
hsa_miR_302e	1.33 $\pm$ 0.89	1.26 $\pm$ 1.53
hsa_miR-302d-3p****	1.53 $\pm$ 1.85	0.54 $\pm$ 0.46
hsa_miR_302c-3p	1.30 $\pm$ 0.76	0.67 $\pm$ 0.40
hsa_miR_302b-3p	1.53 $\pm$ 1.31	2.19 $\pm$ 3.13
hsa_miR_302a-3p	1.59 $\pm$ 1.51	1.66 $\pm$ 1.13
hsa_miR-195-5p****	4.50 $\pm$ 4.86	13.89 $\pm$ 8.11
hsa_miR-16-5p	1.82 $\pm$ 1.47	1.90 $\pm$ 1.57
hsa_miR 15b-5p ****	2.40 $\pm$ 5.31	0.78 $\pm$ 0.89
hsa_miR_15a-5p	1.79 $\pm$ 2.32	1.79 $\pm$ 1.93



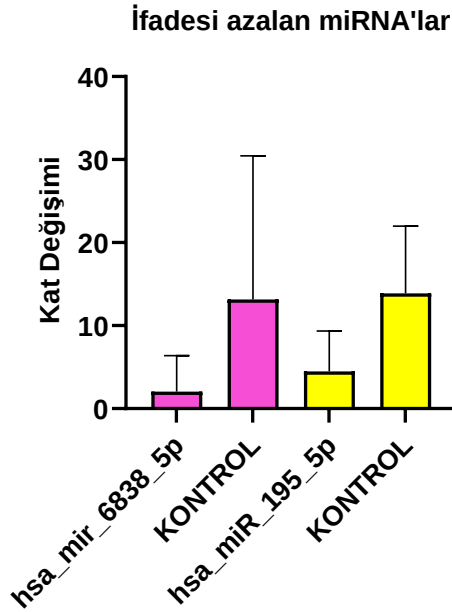
Grafik 5. Olgu ve sağlıklı kontrol grubunda miRNA ekspresyon düzeyleri sütun grafiği



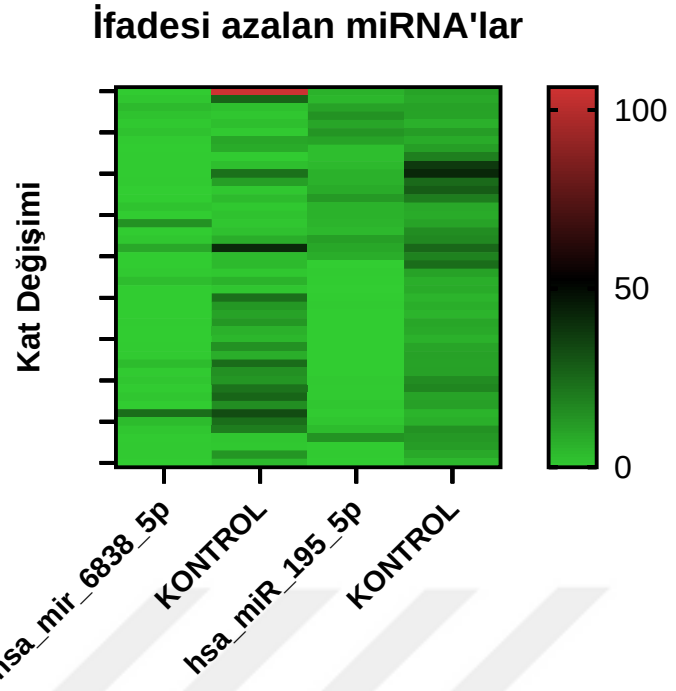
Grafik 6. Sağlıklı kontrol grubuna göre olgularda ifadesi artan miRNA'ların grafiği



Grafik 7. Sağlıklı kontrol grubuna göre olgularda ifadesi artan miRNA'ların ısı haritası



Grafik 8. Sağlıklı kontrol grubuna göre olgularda ifadesi azalan miRNA'ların sütun grafiği



Grafik 9. Sağlıklı kontrol grubuna göre olgularda ifadesi azalan miRNA'ların ısı haritası

Tartışma

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. 2020 yılında dünyada 2.3 milyon yeni meme kanseri vakasının olduğu tahmin edilmekte olup, bu sayı kadınlardaki tüm yeni kanser vakalarının yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır. İnsidans oranları bölgeye göre büyük farklılık göstermekle birlikte daha gelişmiş ülkelerde daha yüksek oranlara sahiptir (WHO, 2020; Marschner ve ark, 2020). Meme kanserinin erken teşhisi ile etkili bir tedavi uygulanması sağkalım süresinin artmasını sağlayarak hastalığın tedavisini mümkün kılmaktadır. Erken teşhisin yanı sıra, kanser hücrelerinin tipi ve yayılma derecesi de tedavinin etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerdendir. Hastalığın alt tiplerine göre tedavi seçenekleri değişebilmekle birlikte tedavide genel yaklaşım genellikle cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavisinin ve bunların kombinasyonlarının yanı sıra uygun hastalarda hedefe yönelik tedavilerdir. Vücudun kendine ait bağışıklık sisteminin aktive edilmesi ve bu sayede kanser hücrelerinin öldürülmesinde etkili olan immunoterapi yöntemleri, immun kontrol noktası inhibitörlerinin keşfiyle son yıllarda melanoma başta olmak üzere birçok kanser türünde kullanılmaya başlanmıştır (Zhang Y. Ve Zhang Z, 2020; Ralli ve ark, 2020). 2019 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), immun kontrol noktası inhibitörlerinden PD-L1 inhibitörü Atezolizumab ile Nab-paklitaksel içeren Abraxane kombinasyonu, diğer meme kanseri türlerine göre daha agresif ve tedavisi daha zor olan üçlü negatif meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır (Miles ve ark, 2021). Ancak, yenilikçi ve umut verici bir yaklaşım olan immunoterapinin etkinliği tümör immun mikroçevresine göre değiştiğinden, her hasta için uygun olmamaktadır. Bu nedenle meme kanserinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına ve tedaviye yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesi önem taşımakta, bu bağlamda daha etkili immunoterapi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik olarak da klinik çalışmalar hızla artmaktadır.

mikroRNA'lar (miRNA), gen ifadesinin düzenlenmesinde kritik rol oynayan kodlanmayan 20-22 nükleotidlik kısa RNA molekülleridir. Bu moleküller hedef genin 3'UTR bölgesine bağlanarak gen ifadesini değiştirmektedir. Değişen gen ifadesi ile kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, invazyon, metastaz oluşturma kabiliyetlerinin yanı sıra tümör baskılayıcı veya onkogen özelliği gösteren genlerin ifadesinin düzenlenmesinde etkinlik göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı miRNA'lar, kanserin patogenezinde ve prognozunda önemli rol oynamaktadır (Lee ve

Dutta, 2009). miRNA'ların stabilitelerinin yüksek olması ve vücutta tespit edilebilmeleri nedeniyle de iyi birer biyogösterge olarak da büyük potansiyele sahiptir (Xu ve ark, 2020).

Literatürde miRNA'ların ifade düzeylerinin, klinikopatolojik özelliklerle ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunların yanı sıra bazı miRNA'ların bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini ve advers etkilerini düzenlediği de bildiren çalışmalar bulunmakla birlikte (Marschner ve ark, 2020), meme kanseri özelinde, bağışıklık kontrol noktası genlerini hedefleyen miRNA'ların etkinliğini araştıran çalışmalar sınırlıdır.

Bu amaçla bu tez çalışmasında, meme kanseri tanısı almış ancak henüz tedavi başlanmamış olgularda ve sağlıklı kontrollerden alınan kan örneklerinde, immün kontrol noktalarında görevli olan PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3 genlerinin mRNA seviyesindeki ekspresyonları ve bu genleri regüle edebileceği *in silico* olarak öngörülen 21 adet miRNA'nın q-RT-PCR ile ifade düzeyleri belirlenmiştir. Ekspresyon analizi sonucuna göre, olguların PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin, kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılık göstermediği saptanmıştır. Meme kanseri hücrelerinin hem hücre tipi hem de immunojenite açısından heterojen olması, en immunojenik tipin üçlü negatif meme kanseri olması ve bu tipte bile PD-L1 ekspresyon düzeyinin ortalama %20 olması, çalışmamız kapsamında ise üçlü negatif meme kanseri hastası bulunmaması nedeniyle immün kontrol noktası genlerinin ifade düzeyinde farklılık saptanmadığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, analizi yapılan 21 adet miRNA'dan, 6 tanesinin ifadesinin ise kontrol grubuna göre anlamlı ekspresyonel regülasyon sergilediği belirlenmiştir. Buna göre, miR-195-5p ifadesinin ise kontrol grubuna kıyasla, -3.09 kat daha düşük ifade edildiği ($p<0.0001$) saptanmışken; miR-6838-5p ekspresyonunun kontrol grubuna göre -6.93 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). Kontrol grubuna kıyasla, miR-520b ailesinden olan miR-520-5p ifadesinin 2.46 kat ($p<0.0001$), miR-302d-3p ifadesinin 2.83 kat ($p<0.0001$), miR-15b-5p nin 3.08 kat ($p<0.0001$), miR-373-3p nin ise 2.40 kat ($p<0.0001$) olgu grubunda daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 9, Grafik 6).

Olgu grubunda ekspresyonel düşüş saptadığımız miR-6838-5p ile yapılan çalışmalara bakıldığında, literatürde de benzer ve daha kapsamlı fonksiyonel çalışmaların da bulunduğu görülmektedir. Buna göre, üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) hücre

hatlarında miR-6838-5p'nin etkinliğini araştıran bir çalışmada ise miR-6838-5p'nin, WNT3A'nın ifadesini düşürerek ÜNMK'nde hücre çoğalmasını, metastazı ve epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecini baskıladığını gösterilmiştir (Liu ve ark, 2019).

miR-6838-5p'in, yüksek mortalite oranlarına sahip olan renal hücre karsinomu (RCC) dokularında ve hücre hatlarındaki rolünü araştıran bir başka çalışmada, Caki-1, ACHN, 786p ve 786-O RCC hücre hatlarındaki ekspresyon düzeyi HK-2 ve 293T insan renal epitelyal hücre hatları ile karşılaştırıldığında daha yüksek düzeyde eksprese edildiği, RCC dokularındaki ekspresyon düzeyinin bu dokulara komşu olan RCC hücreleri içermeyen dokular ve sağlıklı böbrek dokuları ile karşılaştırıldığında ise benzer düzeyde bir ekspresyon artışı olduğu rapor edilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda miR-6838-5p'nin RCC hücrelerinde DMTF1'e bağlanabildiğini ve ekspresyonunu düşürebileceğini, ayrıca DMTF1'in aşırı ifadesinin miR-6838-5p'nin ARF-p53 sinyal yolundaki ana proteinleri aktive edebildiği gösterilerek, miR-6838-5p'nin aşırı ifadesinin, RCC hücrelerinin çoğalma ve invazyonunu aktive ettiği bildirilmiştir. (Zhai ve ark, 2021).

MiRNA süngerleri olarak bilinen, endojen kodlamayan RNA grubundan olan sirküler RNA (circRNA)'lar, miRNA'ların hedefi olarak fonksiyonlarını inhibe ederek ve bunların gen ekspresyonunu düzenlediği hücresel işlevleri etkilemektedir. Gen ekspresyonunun yanında translasyon ve protein sentezinin regülasyonunda da rol almaktadır. Oldukça malin bir kanser türü olan osteosarkom (OS) patogenezinde, halkasal RNA circRASSF2 ile insulin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF1R) arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir başka çalışmada, SAOS-2, U2OS ve HOS OS hücrelerinde, hFOB1.19 osteoblast hücrelerine kıyasla miR-6838-5p düzeyinin düşük, circRASSF2 düzeyinin ise yüksek olduğu bulunmuştur. MiR-6838-5p, IGF1R/PI3K/AKT'yi hedefleyerek, OS hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği, circRASSF2'nin ise miR-6838-5p'yi hedefleyerek IGF1R ifadesini artırdığını, bu durumun da OS hücrelerinde proliferasyonu, invazyonu ve metastazı artırdığı öne sürülmüştür. Yüksek ifade edilen circRASSF2 ise, OS hücrelerinde invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir (Wang ve ark, 2021).

Bir başka çalışmada ise meme kanseri hücreleri ve dokularında circ_0001667'nin miR-6838-5p'nin hedefi olarak etkinliğini azalttığı, bununla birlikte birçok kanser tipinde hastalığın gelişimi ve prognozu ile ilişkili olan CXC süper ailesinden

CXCL10'un ise miR-6838-5p tarafından inhibe edilerek hücre proliferasyonu ve anjiyogenezin azaldığı bildirilmiştir (Zhang ve ark, 2023).

Hem hasta grubunda hem de mide kanseri hücre hatlarında yapılan başka bir çalışmada ise miR-6838-5p'yi regüle eden circ-0008434'ün kanser gelişiminde rol oynayan Ubikitin-spesifik peptidaz 9X (USP9X) ekspresyonunu artırarak gastrik kanser hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu artırdığı gösterilmiştir (Xu ve ark, 2021). Benzer şekilde, miR-6838-5p'in mide kanseri hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolunu inaktive ettiği ve GPRIN3'ü hedefleyerek hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu inhibe ederek hücre döngüsü duraklamasına yol açtığını bildirilmiştir (Zhou ve ark, 2020). Servikal karsinoma hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada ise miR-6838-5p'nin, Forkhead proteini 2 (FOXP2)'nin ifadesini artırarak hücre proliferasyonu ve invazyonu artırdığı bildirilmiştir (Yan ve ark, 2023).

Ekspresyonel düşüş saptadığımız miR-195 ailesinden biri olan miR-195-5p'in oldukça fazla sayıda kanserde, hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon ve ilaç direnci ile ilişkili süreçlerde rol oynadığını bildiren birçok çalışma bulunmaktadır (Xu ve ark, 2022). Bunun yanı sıra, meme kanserli hastalarda miR-195-5p ifadesinin azalmasının, kanser derecesi, lenf nodu metastazı ve hastaların klinik durumları ile anlamlı bir ilişkide olduğu ortaya konulmuştur (Nadeem ve ark, 2017).

İnsan normal meme epitel hücreleri MCF-10 A ile ÜNMK olan ve olmayan 5 adet kanser hücre hattında yapılan ekspresyon analizine göre miR-195-5p'nin MCF-10 A hücrelerine kıyasla meme kanseri hücrelerinde daha düşük oranda eksprese edildiği, en düşük ekspresyonun ise ÜNMK hücrelerinde görüldüğü bildirilmiştir. miR-195-5p'nin yüksek oranda ekspresyonunun ÜNMK hücrelerinin malin davranışını inhibe ettiği, yara iyileşmesi ve invazyon testi sonucunda hücre migrasyonunu ve invazyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Wang ve ark, 2023).

Bir başka çalışmada ise, miR-195-5p'nin meme kanseri dokusundaki düzeyinin ve kanserin progresyonu üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 40 hastadan alınan meme dokusu ile kanser dokusuna komşu olan ve kanser hücresi içermeyen dokuların q-RT-PCR ile ekspresyon analizleri sonucunda, miR-195-5p'nin meme kanseri örneklerindeki ekspresyon düzeyinin, aynı mikroçevredeki komşu normal meme dokularına göre daha düşük düzeyde eksprese edildiği saptanmıştır. Ayrıca MDA-MB-231 ÜNMK

hücre hattında da sitotoksiste, koloni oluşumu, invazyon testi ile hücre döngüsü testleri gerçekleştirilmiş ve miR-195-5p nin aşırı ifadesinin hücre proliferasyonunu engellediği, koloni oluşumunu azalttığı, invazyon ve migrasyonu baskıladığı ve hücre döngüsünde G1 fazında hücre birikimine neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre, bulgularımıza paralel şekilde miR-195-5p nin meme kanserinde tümör baskılayıcı işlev gördüğü öne sürülmüştür (Luo ve ark, 2014).

HER2-pozitif meme kanserli hastalarda trastuzumaba yanıtın tahmin edilmesinde miRNA ların rolünü inceleyen bir başka çalışmada ise trastuzumaba dirençli BT-474 meme kanseri hücrelerinde ve 40 meme kanser hastasından elde edilen plazma örneklerinde miR-196-5p nin ekspresyon düzeyinin kontrole göre azaldığı ve bununla birlikte trastuzumab direnci ile ilişkili genlerin ifadelerinin de değiştiği saptanmıştır (Rezaei ve ark, 2023). Kanser hücrelerinin proliferasyonunda ve migrasyonunda rol oynadığı düşünülen kinesin ailesinin bir üyesi olan KIF23'ün ÜNMK'nde yüksek oranda eksprese edilmektedir. Yapılan bir çalışmada miR-195-5p'nin MDA-MB-231 ve BT549 ÜNMK hücrelerinde düşük oranda eksprese edildiği, miR-195-5p'nin KIF23'ün 3'UTR'sine bağlanarak inhibisyonuna sebep olabileceği, böylece hücre proliferasyonu ve invazyonunun azalmasına sebep olabileceği bildirilmiştir Jian ve ark, 2021).

Olgu ve kontrol grubu arasında anlamlı ekspresyonel farklılık sergileyen bir diğer miRNA olan miR-520b, miR-302/372/373/520 ailesinin bir üyesidir. Bu ailedeki bazı üyelerin kanserlerle ilişkili olduğu; örneğin, miR-373 ve miR-520c/h nin meme ve yemek borusu kanseri hücrelerinde onkogenik özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Lee ve ark, 2009; Su ve ark, 2016).

Biyoinformatik analizlerle PTEN bağlanma noktalarına sahip olabileceği düşünülen miR-520b'nin, meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada, meme kanseri hastalarından alınan tümör dokusunda miR-520b'nin, tümör dokusuna bitişik ,olan ve tümör içermeyen hücrelere kıyasla daha yüksek oranda ifade edildiği, buna karşın miR-520b'nin PTEN'e bağlanarak ifadesini düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca, dalaktan izole edilen CD4+ ve CD8+ hücrelerinin MCF-7 ile kültüre edilmiş ve miR-520b'in PTEN'e bağlandığı ve CD4+ T hücrelerinin Th1 ve Treg'e farklılaşması esnasında, Th1 inhibe olup; Treg ise aktif hale geldiği belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca 5 haftalık BALB/c farelere miR-520 inhibitörü uygulandığında ise, miR520 ekspresyonunun azalmasıyla birlikte, tümör süpresör gen PTEN' in ifadesinin

arttığı; buna bağlı olarak tümöral büyüme ve proliferasyonun baskılandığı, T hücre aktivasyonunun artmasına bağlı olarak makrofaj polarizasyonunun M1'e çevrilmesi nedeniyle de tümör büyümesinin azaldığı rapor edilmiştir (Zhu ve ark, 2021).

miR-520b' nin Hippo/YAP sinyal yolağını aracılığıyla meme kanseri hücrelerinin köklülüğü üzerine etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, GEO (Gene expression omnibus) veri tabanında yapılan *in silico* analizlerde, meme kanseri tümör dokusunda miR-520b ifadesinin, tümör içermeyen dokulara göre daha yüksek olduğu, TCGA (Cancer genome Atlas)'dan elde edilmiş olan verilerde ise yüksek düzeyde miR-520 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir. MCF-7 VE MDA-MB-231 hücre hatlarından elde edilen meme kanseri kök hücrelerinde de aynı ekspresyon profili saptanmıştır. Ayrıca, meme kanseri hücrelerinde LATS2 (Tumor Suppressor Kinase 2) mRNA düzeyinin ve YAP fosforilasyonunun, miR-520b aracılığıyla anlamlı düzeyde azalırken, nuklear YAP protein düzeyinin arttığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, miR-520b'nin meme kanserinde Hippo/YAP sinyal yolağının aktive ederek, tümör büyümesini tetiklediğini desteklemektedir (Zhang ve ark, 2019).

Cerrahi öncesinde neoadjuvan tedavisini tamamlamış meme kanseri hastalarından iğne biyopsisi ile alınmış tümör örneklerinin incelendiği bir başka çalışmada, miR-520b'nin yüksek düzeyde ifade edildiği, bununla birlikte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, adriamisine dirençli MCF-7/ADR ve MDA-MB-231/ADR hücrelerinden daha yüksek eksprese edildiği, ayrıca PI3K/AKT sinyal yolu ile ilişkili proteinlerin yanı sıra; Bcl-2 ekspresyonu inhibe edilirken; Bax ekspresyonunda artış olduğu rapor edilmiştir (Zhang ve ark, 2021). Bu bulguyu destekleyici bir başka çalışma olarak meme kanseri hücrelerinde miR-520b ifadesinin ilaç direncinin kırılması ve kemosenitivitenin geri kazanılması ile ilişkili olabileceği de raporlanmıştır (Lou ve ark, 2018).

Çalışmamızın sonuçlarına göre olgu ve kontrol grupları arasında anlamlı ekspresyonel farklılık sergileyen miR 302d-3p ile yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile MCF-10A sağlıklı meme hücreleri ile meme kanseri hastalarının tümör içeren dokuları ile tümör içermeyen dokuları arasındaki miR-302d-3p ve TMBIM6 (Transmembran Bax İnhibitör Motif İçeren Protein 6) ekspresyon farklılıklarının değerlendirildiği bir çalışmada, meme kanseri hücre hatlarında miR-302d-3p'nin düşük düzeyde ifade edildiği, bunun yanı sıra, miR-302d-3p'nin hücre canlılığını ve migrasyonunu azaltarak apoptozu

indükleyebileceği belirtilmiştir. TMBIM6'nın ise hem meme kanseri hücre katlarında hem de tümör hücreleri içeren dokularda daha yüksek düzeyde ifade edildiği, miR-302d-3p'nin yüksek ifadesiyle TMBIM6 hedeflenerek ERK (Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz) fosforilasyonunun inhibisyonu ile hücre canlılığının ve migrasyonunun engellenerek apoptozun tetiklendiği bildirilmiştir (Liao ve ark, 2021).

miR-302 ailesinden miR-302b-3p/302c-3p/302d-3p miRNA'larının, HEC-1A ve Ishikawa endometrial hücre hatlarında düşük düzeyde ekspresyonu ile epitelyal-mezenkimial geçiş (EMT) süreçlerini değiştirdiğini rapor eden bir çalışma bulunmaktadır. Endometrial kanserinde tümör supresor olarak tanımlanabilecek bir miRNA olarak, miR 302d-3p'nin endometrial kanserlerin tedavisinde yeni bir hedef olabileceği rapor edilmiştir (Li ve ark, 2018). Bunun yanı sıra, servikal skuamöz hücre karsinoması (CCNO) dokularında yapılan ekspresyon analizine göre ise, miR-302b/c/d-3p ekspresyon düzeyinin düşük olduğu, bununla beraber miR-302b/c/d-3p yüksek düzeyde ifadesinin, CSCC hücrelerinde *in vitro* olarak apoptozis ve hücre proliferasyonunu artırırken, *in vivo* olarak ise CCNO 'nun hedeflenerek tümör büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Wang ve Chen, 2020).

Birçok hastalığın patogenezinde rol aldığı rapor edilen miR-15b-5p, MİR15B geni tarafından düzenlenmekte olup hem onkojenik hem de tümör baskılayıcı etki gösterebildiği, iki yönlü rolünün olduğu çalışmalar yayınlanmıştır. Mesane kanseri, meme kanseri, mide kanseri, oral skuamöz hücreli karsinom ve prostat kanserinde miR-15b-5p, onkojenik bir miRNA olarak tanımlanırken; baş ve boyun kanseri skuamöz hücreli karsinomlar, nöroblastom ve tiroid kanserinde düşük düzeyde ifade edilip, tümör süpresör özellik sergilediği rapor edilmiştir. Ayrıca, kolorektal kanseri ve hepatosellüler karsinomda yapılmış farklı çalışmalarda ise, çelişkili sonuçlar bildirmiştir (Ghafouri-Fard ve ark, 2022). Bunun dışında, hem fare (CT26 ve MC38) hem de insan (SW1116, HT29, SW480 ve SW620) kolon kanseri hücre hatlarında miR-15b-5p ifadesi, normal kolon hücre hatları ile kıyaslandığında düşük bulunmuş, CT26 ve MC38 kolon kanseri hücrelerinde miR-15b-5p'nin post transkripsiyonel düzeyde PD-L1'in protein ifadesini düşürmüştür (Liu ve ark, 2021). Başka bir çalışmanın bulgularına göre ise, Caco-2, T84 ve HCT-15 hücrelerinde miR-15b-5p ifadesinin kontrole göre düşük düzeyde olduğu rapor edilmiştir (Zhao ve ark, 2022).

miR-15b-5p ifadesi, AGS, BGC-823, SGC-7901 ve MGC-803 insan mide kanseri hücre hatlarında, GES-1 mide epitelial mukoza hücre hattı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (Zhao ve ark, 2017). Mortalite oranı oldukça yüksek olan 69 karaciğer kanseri hastasında ve HepG2, HCC-LM3, Huh-7 ve HEP3B hücre hatlarında sağlıklı kontrol grubuna göre miR-15b-5p düzeylerinin yüksek düzeyde ifade edildiği bildirilmiştir (Dong ve ark, 2019).

Meme kanseri bağlamında incelendiğinde bulgularımıza paralel olacak şekilde, miR-15b-5p ekspresyonunun meme kanseri tanımlı olguların tümör dokularında yüksek olduğu ve bu durumun kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte MCF-7 ve MD-MBA-231 meme kanseri hücrelerinde miR-15b-5p'nin baskılanmasının hücre proliferasyonunu ve invazyonunu azaltarak, apoptozu indüklediği de saptanmıştır (Wu ve ark, 2020).

Olgu grubunda ekspresyonel artışı olduğu saptanan miR-373-3p ile yapılan çalışmalara bakıldığında, bulgularımıza paralel yönde çalışmaların bulunduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, biyoinformatik analizler sonucunda elde edilen verilere göre, miR-373-3p nin meme kanseri kök hücre belirteci olan CD44 ve CD24'e bağlanabildiği, ayrıca tümör invazyonunu ve metastazını artırdığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, meme kanseri olgularında miR-373-3p nin yüksek ifadesinin kötü prognoz ile ilişkili olabileceği de rapor edilmiştir (Monchusi ve Kaur, 2022). Bu nedenle bu miR-373-3p'nin hedeflenerek kanser hücrelerinin ilaçlara verdiği yanıtın değiştirilerek kanser tedavisinde fayda sağlanabileceği düşünülmektedir. Yeni tanı almış ve metastatik meme kanseri tanımlı olgulardan alınan plazma örneklerinde yapılan bir başka miRNA ekspresyon analizi çalışmasında yine benzer şekilde miR-373 ifadesinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (Eichelser ve ark, 2013). Buna karşın, meme kanseri özelinde yayınlanmış bir başka çalışmada, DNA tamir kapasitelerine göre sınıflandırılmış 27 meme kanseri tanımlı olgudan ve 26 sağlıklı kontrol grubundan alınan plazma örneklerinde DNA tamir kapasiteleri ölçülerek yüksek ve düşük tamir kapasitesine göre gruplandırılmış, sonrasında ise 40 adet miRNA'nın profillemesi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda, miR-373-3p'nin hem düşük hem de yüksek DNA tamir kapasitesine sahip kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki gruba göre daha fazla ifade edildiği bildirilmiştir. Düşük onarım kapasitesine sahip olgularda ise miR-373-3p'nin ifadesinin yüksek kapasiteye sahip olgulara göre çok daha fazla gerçekleşmiştir. Bu nedenle miR-373-

3p'nin DNA onarım kapasitesinin azalmasına neden olarak kanser oluşumunu destekleyebileceği düşünülmektedir (Encarnación-Medina ve ark, 2019).

Fare ve insan servikal kanser hücre hatlarında yapılan bir başka çalışmada, hücrelere miR-373-3p mimik transfekte edilmesini takiben, miR-373-3p'nin yüksek düzeydeki ifadesinin, hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttığı, tümör taşıyan farelerde de miR-373-3p'nin servikal kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, sağkalım kinazlarından biri olarak bilinen AKT1 geninin miR-373-3p tarafından hedeflenerek ifadesi üzerinde etkili olabileceği, mimik miR-373-3p'nin AKT1 mRNA ve protein ifadesini azaltırken, inhibitörünün ise artırdığı, böylece AKT1 yüksek ifadesinin miR-373-3p transfekte hücrelerde proliferasyonu artırdığı bildirilmiştir (Yu ve ark, 2021).

Hepatoselüler karsinoma (HCC) dokularında ve hücre hatlarında yapılan çalışmada miR-373-3p ekspresyon düzeyinin, sağlıklı doku ve hücrelere kıyasla daha düşük olduğu, miRNA ekspresyonu indüklendiğinde ise, HCC hücrelerinin çoğalmasını ve EMT'yi baskıladığı bildirilmiştir (Li ve ark, 2022). Buna karşın küçük hücre dışı akciğer kanseri dokularında ve hücre hatlarında miR-373-3p ekspresyonunun sağlıklı doku ve hücrelerle kıyaslandığında, daha yüksek düzeyde ifade edildiği; yüksek miR-373-3p'nin MMP9 ve MMP14 proteinlerinin ifadesini artırarak H1299 hücrelerinin migrasyon ve invazyon kabiliyetlerini artırdığı saptanmıştır (Wu ve ark, 2015).

Sonuç ve Öneriler

Dünyada ve ülkemizde meme kanseri görülme sıklığı giderek artarken, cerrahi tedaviler kemoterapi, radyoterapi gibi geleneksel tedavilerin yanı sıra immunoterapinin de dahil olduğu hedefe yönelik tedavi yöntemleri de ivme kazanmaktadır. Geleneksel tedavi yöntemlerinin kısıtlılıklarına rağmen, meme kanseri hücrelerinin ve hastalığın patogenezinde rol alan moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ile, hedefe yönelik tedavilerin etkinliğini artacağı düşünülmektedir. Kanser immünoterapisi, bağışıklık hücrelerinin etkinliğinin artırılması yolu ile kanser hücrelerinin spesifik olarak tanınmasını ve yok edilmesi esasına dayanan bir tedavi yöntemidir. İmmünoterapi; hedefe yönelik olması, uzun süreli etkileri ve iyileşmeye olan katkıları sayesinde, kanser tedavisindeki kullanım alanları giderek artmaktadır. Meme kanserinde ise immunoterapinin etkinliği, kanser hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen immun kontrol noktası ligandlarının ve tümör immun mikroçevresinde bulunan bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen immun kontrol noktası reseptörlerinin ifade düzeylerine göre değişmektedir.

MiRNA'lar, gen ifadesini düzenleyerek birçok biyolojik hücresel süreçlerde rol oynamaktadır. Kanser patogenezinde rol alan fazla sayıda miRNA tanımlanmış olmakla birlikte, immun kontrol noktası moleküllerini hedefleyen miRNA sayısı oldukça azdır. Tez çalışmamıza dahil olan meme kanseri hasta grubunda yapılan miRNA analizleri ile 21 miRNA'dan özellikle 2 tanesinin ifadesinin kontrole göre oldukça güçlü düzede bir azalışın olması, meme kanseri prognozu üzerinde etkili olabilecek önemli hedef olma potansiyeli taşımaktadır. Bu miRNA'ların, immun kontrol noktası molekülleri üzerindeki etkilerini araştıran ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi ve bu yollarda etkin olduğunun tanımlanması ile kanser tedavisinde immünolojik açıdan soğuk olarak bilinen tümörlerin immunoterapiye duyarlı hale getirilmesine olanak sağlayacaktır. miRNA bazlı terapötik ilaçların geliştirilmesi, kanser tedavisinde kötü prognozu tersine çevirebilecek potansiyele sahip yaklaşımlar olarak düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Ardekani, A. M., & Naeini, M. M. (2010). The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 2(4), 161–179.
- Ban, K. A., & Godellas, C. V. (2014). Epidemiology of breast cancer. *Surgical oncology clinics of North America*, 23(3), 409–422. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2014.03.011>
- Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
- Chen, D.S., Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle, *Immunity*, Volume 39, Issue 1, 2013, Pages 1-10, ISSN 1074-7613, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co inhibition. *Nature reviews. Immunology*, 13(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chocarro, L., Blanco, E., Zuazo, M., Arasanz, H., Bocanegra, A., Fernández-Rubio, L., Morente, P., Fernández-Hinojal, G., Echaide, M., Garnica, M., Ramos, P., Vera, R., Kochan, G., & Escors, D. (2021). Understanding LAG-3 Signaling. *International journal of molecular sciences*, 22(10), 5282. <https://doi.org/10.3390/ijms22105282>
- Cogdill, A., Andrews, M. & Wargo, J. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *Br J Cancer* 117, 1–7 (2017). <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.136>
- Dong, Y., Zhang, N., Zhao, S., Chen, X., Li, F., & Tao, X. (2019). miR-221-3p and miR-15b-5p promote cell proliferation and invasion by targeting Axin2 in liver cancer. *Oncology letters*, 18(6), 6491–6500. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11056>

- Eichelser, C., Flesch-Janys, D., Chang-Claude, J., Pantel, K., & Schwarzenbach, H. (2013). Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clinical chemistry*, 59(10), 1489–1496. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.205161>
- Eliyatkin, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *Journal of Breast Health*, 11: 59-66 <https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669>
- Encarnación-Medina, J., Ortiz, C., Vergne, R., Padilla, L., & Matta, J. (2019). MicroRNA Expression Changes in Women with Breast Cancer Stratified by DNA Repair Capacity Levels. *Journal of oncology*, 2019, 7820275. <https://doi.org/10.1155/2019/7820275>
- Erel, S., & KemalAtahan, M. (2019). Memenin Anatomisi Fizyolojisi ve Değerlendirilmesi. In *Genel Cerrahi* (pp. 395–410). Akademisyen Kitabevi.
- Eryilmaz, M. A., Igci, A., Muslumanoglu, M., Ozmen, V., & Koc, M. (2012). Male breast cancer: a retrospective study of 15 years. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 17(1), 51–56.
- Fayyad-Kazan, H., Rouas, R., Fayyad-Kazan, M., Badran, R., El Zein, N., Lewalle, P., Najar, M., Hamade, E., Jebbawi, F., Merimi, M., Romero, P., Burny, A., Badran, B., & Martiat, P. (2012). MicroRNA profile of circulating CD4-positive regulatory T cells in human adults and impact of differentially expressed microRNAs on expression of two genes essential to their function. *The Journal of biological chemistry*, 287(13), 9910–9922. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.337154>
- Ghafouri-Fard, S., Khoshbakht, T., Hussen, B. M., Jamal, H. H., Taheri, M., & Hajiesmaeili, M. (2022). A Comprehensive Review on Function of miR-15b-5p in Malignant and Non-Malignant Disorders. *Frontiers in oncology*, 12, 870996. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.870996>

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Türkiye Kanser İstatistikleri 2018. (Erişim tarihi. 26.06.2024)
<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/>

Higano, C. S., Schellhammer, P. F., Small, E. J., Burch, P. A., Nemunaitis, J., Yuh, L., Provost, N., & Frohlich, M. W. (2009). Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer*, 115(16), 3670–3679.
<https://doi.org/10.1002/cncr.24429>

Hossen, M. M., Ma, Y., Yin, Z., Xia, Y., Du, J., Huang, J. Y., Huang, J. J., Zou, L., Ye, Z., & Huang, Z. (2023). Current understanding of CTLA-4: from mechanism to autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*, 14, 1198365.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1198365>

Jian, W., Deng, X. C., Munankarmy, A., Borkhuu, O., Ji, C. L., Wang, X. H., Zheng, W. F., Yu, Y. H., Zhou, X. Q., & Fang, L. (2021). KIF23 promotes triple negative breast cancer through activating epithelial-mesenchymal transition. *Gland surgery*, 10(6), 1941–1950. <https://doi.org/10.21037/gs-21-19>

Karnati, H. K., Panigrahi, M. K., Gutti, R. K., Greig, N. H., & Tamargo, I. A. (2015). miRNAs: Key Players in Neurodegenerative Disorders and Epilepsy. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 48(3), 563–580. <https://doi.org/10.3233/JAD-150395>

Kelsey, J. L., & Berkowitz, G. S. (1988). Breast cancer epidemiology. *Cancer research*, 48(20), 5615–5623.

Kohler, B. A., Sherman, R. L., Howlader, N., Jemal, A., Ryerson, A. B., Henry, K. A., Boscoe, F. P., Cronin, K. A., Lake, A., Noone, A. M., Henley, S. J., Ehemann, C. R., Anderson, R. N., & Penberthy, L. (2015). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(6), djv048.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djv048>

- Kwapisz D. (2021). Pembrolizumab and atezolizumab in triple-negative breast cancer. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 70(3), 607–617. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02736-z>
- Lee KH, Goan YG, Hsiao M, et al. MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer. *Exp Cell Res.* 2009;315(15):2529–2538. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.06.001
- Lee, Y. S., & Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*, 4, 199–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222>
- Li, H., Wang, N., Xu, Y., Chang, X., Ke, J., & Yin, J. (2022). Upregulating microRNA-373-3p promotes apoptosis and inhibits metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Bioengineered*, 13(1), 1304–1319. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2014616>
- Li, Q., Johnston, N., Zheng, X., Wang, H., Zhang, X., Gao, D., & Min, W. (2016). miR-28 modulates exhaustive differentiation of T cells through silencing programmed cell death-1 and regulating cytokine secretion. *Oncotarget*, 7(33), 53735–53750. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10731>
- Li, Y., Huo, J., Pan, X., Wang, C., & Ma, X. (2018). MicroRNA 302b-3p/302c-3p/302d-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition and promotes apoptosis in human endometrial carcinoma cells. *OncoTargets and therapy*, 11, 1275–1284. <https://doi.org/10.2147/OTT.S154517>
- Liao, Y., Qiu, Z., & Bai, L. (2021). miR-302d-3p regulates the viability, migration and apoptosis of breast cancer cells through regulating the TMBIM6-mediated ERK signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 24(6), 853. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12493>

- Liu, C., Liu, R., Wang, B., Lian, J., Yao, Y., Sun, H., Zhang, C., Fang, L., Guan, X., Shi, J., Han, S., Zhan, F., Luo, S., Yao, Y., Zheng, T., & Zhang, Y. (2021). Blocking IL-17A enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy in microsatellite stable colorectal cancer. *Journal for immunotherapy of cancer*, 9(1), e001895. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001895>
- Liu, G., Wang, P., & Zhang, H. (2019). MiR-6838-5p suppresses cell metastasis and the EMT process in triple-negative breast cancer by targeting WNT3A to inhibit the Wnt pathway. *The journal of gene medicine*, 21(12), e3129. <https://doi.org/10.1002/jgm.3129>
- Lou, W., Liu, J., Ding, B., Xu, L., & Fan, W. (2018). Identification of chemoresistance-associated miRNAs in breast cancer. *Cancer management and research*, 10, 4747–4757. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S172722>
- Luo, Q., Wei, C., Li, X., Li, J., Chen, L., Huang, Y., Song, H., Li, D., & Fang, L. (2014). MicroRNA-195-5p is a potential diagnostic and therapeutic target for breast cancer. *Oncology reports*, 31(3), 1096–1102. <https://doi.org/10.3892/or.2014.2971>
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*, 10(10), 955–960. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>
- Marschner, D., Falk, M., Javorniczky, N. R., Hanke-Müller, K., Rawluk, J., Schmitt-Graeff, A., Simonetta, F., Haring, E., Dicks, S., Ku, M., Duquesne, S., Aumann, K., Rafei-Shamsabadi, D., Meiss, F., Marschner, P., Boerries, M., Negrin, R. S., Duyster, J., Zeiser, R., & Köhler, N. (2020). MicroRNA-146a regulates immune-related adverse events caused by immune checkpoint inhibitors. *JCI insight*, 5(6), e132334. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.132334>
- Meme Kanseri Korunma, Tarama, Tanı, Tedavi ve İzlem Klinik Rehberi (2020). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı

- Miles, D., Gligorov, J., André, F., Cameron, D., Schneeweiss, A., Barrios, C., Xu, B., Wardley, A., Kaen, D., Andrade, L., Semiglazov, V., Reinisch, M., Patel, S., Patre, M., Morales, L., Patel, S. L., Kaul, M., Barata, T., O'Shaughnessy, J., & IMpassion131 investigators (2021). Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 32(8), 994–1004. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.05.801>
- Monchusi, B., & Kaur, M. (2022). miRNAs as Modulators of Cholesterol in Breast Cancer Stem Cells: An Approach to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Current drug targets*, 23(6), 656–677. <https://doi.org/10.2174/1389450122666211008140811>
- Nadeem, F., Hanif, M., Ahmed, A., Jamal, Q., & Khan, A. (2017). Clinicopathological features associated to MiRNA-195 expression in patients with breast cancer: Evidence of a potential biomarker. *Pakistan journal of medical sciences*, 33(5), 1242–1247. <https://doi.org/10.12669/pjms.335.13008>
- Noyan, A. (2004). Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 15. Ed., (pp. 1138-1141). Meteksan AŞ.
- Patel, S. P., & Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Molecular cancer therapeutics*, 14(4), 847–856. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0983>
- Peng, Y., Croce, C. The role of MicroRNAs in human cancer. *Sig Transduct Target Ther* 1, 15004 (2016). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Qin, A., Wen, Z., Zhou, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, J., Ren, T., & Xu, L. (2013). MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17(2), 252–264. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12003>

- Ralli, M., Botticelli, A., Visconti, I. C., Angeletti, D., Fiore, M., Marchetti, P., Lambiase, A., de Vincentiis, M., & Greco, A. (2020). Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. *Journal of immunology research*, 2020, 9235638. <https://doi.org/10.1155/2020/9235638>
- Rezaei, Z., Dastjerdi, K., Allahyari, A., ShahidSales, S., Talebian, S., Maharati, A., Zangoie, A., Zangouei, A. S., Sadri, F., & Sargazi, S. (2023). Plasma microRNA-195, -34c, and - 1246 as novel biomarkers for the diagnosis of trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer patients. *Toxicology and applied pharmacology*, 475, 116652. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116652>
- Sasco, A. J., Lowenfels, A. B., & Pasker-de Jong, P. (1993). Review article: epidemiology of male breast cancer. A meta-analysis of published case-control studies and discussion of selected aetiological factors. *International journal of cancer*, 53(4), 538–549. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910530403>
- Schlenz I, Kuzbari R, Gruber H, Holle J. The sensitivity of the nipple-areola complex: an anatomic study. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Mar;105(3):905-9. doi: 10.1097/00006534200003000-00012. PMID: 10724249.
- Schmid, P., Adams, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Diéras, V., Hegg, R., Im, S. A., Shaw Wright, G., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Funke, R., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S., Emens, L. A., & IMpassion130 Trial Investigators (2018). Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *The New England journal of medicine*, 379(22), 2108–2121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809615>
- Shiravand, Y., Khodadadi, F., Kashani, S. M. A., Hosseini-Fard, S. R., Hosseini, S., Sadeghirad, H., Ladwa, R., O'Byrne, K., & Kulasinghe, A. (2022). Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 29(5), 3044–3060. <https://doi.org/10.3390/curroncol29050247>

- Smolarz, B., Durczyński, A., Romanowicz, H., Szyłło, K., & Hogendorf, P. (2022). miRNAs in Cancer (Review of Literature). *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2805. <https://doi.org/10.3390/ijms23052805>
- Su CM, Wang MY, Hong CC, et al. miR-520h is crucial for DAPK2 regulation and breast cancer progression. *Oncogene*. 2016;35(9):1134–1342. doi: 10.1038/onc.2015.168
- Tan, S., Li, D., & Zhu, X. (2020). Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 124, 109821. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109821>
- Tryggvadóttir, L., Tulinius, H., Eyfjord, J. E., & Sigurvinsson, T. (2001). Breastfeeding and reduced risk of breast cancer in an Icelandic cohort study. *American journal of epidemiology*, 154(1), 37–42. <https://doi.org/10.1093/aje/154.1.37>
- Vaddi, P. K., Osborne, D. G., Nicklawsky, A., Williams, N. K., Menon, D. R., Smith, D., Mayer, J., Reid, A., Domenico, J., Nguyen, G. H., Robinson, W. A., Ziman, M., Gao, D., Zhai, Z., & Fujita, M. (2023). *CTLA4* mRNA is downregulated by miR-155 in regulatory T cells, and reduced blood *CTLA4* levels are associated with poor prognosis in metastatic melanoma patients. *Frontiers in immunology*, 14, 1173035. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1173035>
- Violet, J. A., & Harmer, C. (2004). Breast cancer: improving outcome following adjuvant radiotherapy. *The British journal of radiology*, 77(922), 811–820. <https://doi.org/10.1259/bjr/44576710>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Waldman, A.D., Fritz, J.M. & Lenardo, M.J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 20, 651–668 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>

- Wang, F., Sun, H., Li, K., Yang, K., Xiang, Y., & Tian, X. (2022). CircRASSF2 promotes IGF1R and osteosarcoma metastasis via sponging miR-6838-5p. *Annals of translational medicine*, 10(1), 11. <https://doi.org/10.21037/atm-21-6123>
- Wang, H., Fang, Q., You, S., Wu, Y., & Zhang, C. (2023). miRNA-195-5p/PSAT1 feedback loop in human triple-negative breast cancer cells. *Genes & genomics*, 45(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s13258-022-01327-9>
- Wang, J., & Chen, S. (2020). RACK1 promotes miR-302b/c/d-3p expression and inhibits CCNO expression to induce cell apoptosis in cervical squamous cell carcinoma. *Cancer cell international*, 20, 385. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01435-0>
- Wang, Q., Lin, W., Tang, X., Li, S., Guo, L., Lin, Y., & Kwok, H. F. (2017). The Roles of microRNAs in Regulating the Expression of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2540. <https://doi.org/10.3390/ijms18122540>
- World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020. <https://gco.iarc.fr/> ; 2020 [cited 2023 March 9].
- Wu, A., Li, J., Wu, K., Mo, Y., Luo, Y., Ye, H., Shen, X., Li, S., Liang, Y., Liu, M., & Yang, Z. (2015). *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*, 18(7), 427–435. <https://doi.org/10.3779/j.issn.1009-3419.2015.07.07>
- Wu, B., Liu, G., Jin, Y., Yang, T., Zhang, D., Ding, L., Zhou, F., Pan, Y., & Wei, Y. (2020). miR-15b-5p Promotes Growth and Metastasis in Breast Cancer by Targeting HPSE2. *Frontiers in oncology*, 10, 108. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00108>
- Wykes, M., Lewin, S. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 18, 91–104 (2018). <https://doi.org/10.1038/nri.2017.112>

- Xu, J., Wu, K. J., Jia, Q. J., & Ding, X. F. (2020). Roles of miRNA and lncRNA in triple-negative breast cancer. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 21(9), 673–689. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900709>
- Xu, Q., Xu, J. L., Chen, W. Q., Xu, W. X., Song, Y. X., Tang, W. J., Xu, D., Jiang, M. P., & Tang, J. (2022). Roles and mechanisms of miR-195-5p in human solid cancers. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 150, 112885. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112885>
- Xu, X., Wang, S., Wang, H., Pan, C., Yang, W., & Yu, J. (2021). Hsa_circ_0008434 regulates USP9X expression by sponging miR-6838-5p to promote gastric cancer growth, migration and invasion. *BMC cancer*, 21(1), 1289. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09052-4>
- Yan, K., Hu, C., Liu, C., Chu, G., Wang, X., Ma, S., & Li, L. (2023). LncRNA CERS6-AS1, sponging miR-6838-5p, promotes proliferation and invasion in cervical carcinoma cells by upregulating FOXP2. *Histology and histopathology*, 38(7), 823–835. <https://doi.org/10.14670/HH-18-555>
- Yang Y. (2015). Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *The Journal of clinical investigation*, 125(9), 3335–3337. <https://doi.org/10.1172/JCI83871>
- Yu, M. M., Wang, G. J., Wu, K. H., Xue, S. L., Ju, L. L., Li, Q. R., Xiong, A. W., & Yin, G. P. (2021). MicroRNA-373-3p inhibits the growth of cervical cancer by targeting AKT1 both in vitro and in vivo. *Acta biochimica Polonica*, 68(4), 611–617. https://doi.org/10.18388/abp.2020_5446
- Zhai, X., Wu, Y., Zhang, D., Li, H., Chong, T., & Zhao, J. (2021). MiR-6838-5p facilitates the proliferation and invasion of renal cell carcinoma cells through inhibiting the DMTF1/ARF-p53 axis. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 53(2), 191–202. <https://doi.org/10.1007/s10863-021-09888-2>

- Zhang, H., Lang, T. Y., Zou, D. L., Zhou, L., Lou, M., Liu, J. S., Li, Y. Z., Ding, D. Y., Li, Y. C., Zhang, N., Zheng, X. D., Zeng, X. H., Zhou, Q., & Li, L. (2019). miR-520b Promotes Breast Cancer Stemness Through Hippo/YAP Signaling Pathway. *OncoTargets and therapy*, 12, 11691–11700. <https://doi.org/10.2147/OTT.S236607>
- Zhang, H., Zheng, X. D., Zeng, X. H., Li, L., & Zhou, Q. (2021). miR-520b Inhibits IGF-1R to Increase Doxorubicin Sensitivity and Promote Cell Apoptosis in Breast Cancer. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 141(3), 415–426. <https://doi.org/10.1248/yakushi.20-00160>
- Zhang, J., Pan, S., Jian, C., Hao, L., Dong, J., Sun, Q., Jin, H., & Han, X. (2022). Immunostimulatory Properties of Chemotherapy in Breast Cancer: From Immunogenic Modulation Mechanisms to Clinical Practice. *Frontiers in immunology*, 12, 819405. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.819405>
- Zhang, X., Huang, J., Wang, J., Li, Y., Hu, G., & Li, H. (2023). Circ_0001667 accelerates breast cancer proliferation and angiogenesis through regulating CXCL10 expression by sponging miR-6838-5p. *Thoracic cancer*, 14(10), 881–892. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14820>
- Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular & molecular immunology*, 17(8), 807–821. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>
- Zhao, C., Li, Y., Chen, G., Wang, F., Shen, Z., & Zhou, R. (2017). Overexpression of miR-15b-5p promotes gastric cancer metastasis by regulating PAQR3. *Oncology reports*, 38(1), 352–358. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5673>
- Zhao, S. Y., Wang, Z., Wu, X. B., Zhang, S., Chen, Q., Wang, D. D., & Tan, Q. F. (2022). CERS6-AS1 contributes to the malignant phenotypes of colorectal cancer cells by

interacting with miR-15b-5p to regulate SPTBN2. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 38(5), 403–414. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12503>

Zhou, Ss., Jin, Jp., Wang, Jq. *et al.* miRNAS in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 39, 1073–1084 (2018). <https://doi.org/10.1038/aps.2018.30>

Zhou, W., Ding, X., Jin, P., & Li, P. (2020). miR-6838-5p Affects Cell Growth, Migration, and Invasion by Targeting GPRIN3 via the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Gastric Cancer. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 87(6), 327–337. <https://doi.org/10.1159/000511691>

Zhu, Q., Yuan, J., He, Y., & Hu, Y. (2021). The Effect of *miR-520b* on Macrophage Polarization and T Cell Immunity by Targeting *PTEN* in Breast Cancer. *Journal of oncology*, 2021, 5170496. <https://doi.org/10.1155/2021/5170496>

Ekler

1-ETİK KURUL ONAY KARARI

2-BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

3-OLGU ONAM FORMU





T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-99166796-050.06.04-227659 - 601
Konu : Onay Kararı 21-7T/58

Doç.Dr. Burçin KAYMAZ
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız " Meme Kanseri Tanılı Olgularda İmmün Kontrol Noktası Genlerini Regüle Eden miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi " konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmaktadır.

Başvuru dosyası kapsamında, araştırma giderlerinin **Bilimsel Araştırma Proje Fonu (BAP)** tarafından karşılanacağına ilişkin sunulmuş bulunan belge doğrultusunda, araştırmanızın desteklendiğine dair belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir

Varsa **Biyolojik Materyal Transfer Formu'nun** imzaları tamamlanarak Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir. 10.04.2016 tarih ve 29680 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Tıbbi Laboratuvarlar Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmeliğin 34. maddesinde "**yurtdışına tetkik amaçlı numune gönderme yetkisi sadece ruhsatlı tıbbi laboratuvarlara aittir**" ifadesi yer almakta olup bu madde Klinik Araştırmalar için de yürürlüğe girmiştir. Gönderilen insan kaynaklı biyolojik materyal klinik araştırma için gönderilse bile ruhsatlı bir tıbbi laboratuvar aracılığı ile <http://numunetransfer.saglik.gov.tr> adresindeki numune transfer yazılımı kullanılarak gönderilmesi konusuna dikkat edilmelidir.

Yazımınızın bir örneğinin diğer araştırma merkezlerine ve destekleyiciye iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Güzide AKSU
Kurul Başkanı

Ek:İlgili Etik Kurul Kararı (1 Adet aslı gibidir örneği elden gönderilecektir)

Bu belge gsm, elektronik imza ile onaylanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSCH2H12P2

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/ege-universitesi>

Adres:Ege Üniversitesi Rektörlüğü Gençlik Cnd. No:12 35040 Bornova/İzmir
Telefon:+90 (232) 311 21 10 Faks:+90 (232) 339 90 90

Bilgi için: Halide TATAN

Unvanı: Sor.



Microsoft Teams Programı ile Telekonusları gerçekleştirilmiştir.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Meme Kanseri Tanılı Olgularda İmmün Kontrol Noktası Genlerini Regüle Eden miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr. Burçin KAYMAZ
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Doktora Öğrencisi Mustafa Barış ZEYTUNLU, Araş. Gör Mesude ANGIN
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ	Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	-
	BİLGİLENDİRME FORMU	-
	VERİ İZLEME FORMU/ ANKET	☐
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒
	DİĞER	☐
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 21-77/38	Tarih: 08.07.2021
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağış bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu toplantıya katılan etik kurul üyelerince oy birliği ile karar verilmiştir.	

EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Güzide AKSU					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyelik	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişkili (%)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Güzide AKSU Başkan	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLINE KATILDI
Doç. Dr. Tolga AKŞİT (Başkan Yardımcısı)	Antrenörlük Eğitimi - Hareket ve Antrenman Bilimleri	Ege Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi Hareket ve Antrenman Bilimleri AD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLINE KATILDI
Dr. Öğr. Üyesi Aysun EKİNOĞLU Üye (Raportör)	Ebelik AD.	Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Anabilim Dalı	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLINE KATILDI
Prof. Dr. Zeliha KERRY Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLINE KATILDI
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU Üye	Halk Sağlığı AD	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLINE KATILDI

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/ Adı/Soyadı:
Prof. Dr. Güzide AKSU

Başvurusu Onay Belgesi

Sayfa

1/1

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU
LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!! Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.
Bu çalışmanın adı ne? Meme Kanseri Tanılı Olgularda İmmun Kontrol Noktası Genlerini Regüle Eden miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi
Bu çalışmanın amacı ne? Çalışmadan elde edilecek veriler ışığında, olgu ve kontrol grubunun kıyaslanması sonrasında onkogenik veya tümör süpresör potansiyelindeki aday miRNA' lar belirlenebilecek; ileri yapılacak çalışmalar ile bu miRNA' lardan biyobelirteç tanımlaması gerçekleştirilebilecektir.
Size nasıl bir uygulama yapılacaktır? Bu araştırma kapsamında sizden bir anket formu doldurmanız ve damardan kan vermeniz istenecektir.
Farklı tedaviler için araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı nedir? Herhangi bir tedavi söz konusu değildir.
Ne kadar zamanınızı alacaktır? Anketi doldurmanız yaklaşık 10 dakika, kan vermeniz yaklaşık 5 dakika olacaktır.
Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı kaçtır? Araştırmaya yaklaşık 100 gönüllünün katılması beklenmektedir.
Sizden alınacak biyolojik materyallere ne olacak ve analizler nerede yapılacaktır? (analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceğinin açıklanması), Kan örnekleri Ege Üniversitesi Tıbbi biyoloji moleküler laboratuvarında analizleri yapılacaktır.
Sizden beklenen nedir? Sizin sorumluluklarınız nelerdir? Sizden anketteki soruları doğru ve eksiksiz olarak doldurmanız beklenmektedir.
Çalışmaya katılmak size ne yarar sağlayacaktır? Yeni bir teröpatik ilacın bulunmasına büyük katkınız olacak.
Araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar nelerdir? Çalışmadan dışlanma kriterlerinin herhangi birinin tespit edilmesi.
Çalışmaya katılmak size herhangi bir zarar verebilir mi? Çalışmaya katılmak size herhangi bir zarar vermez.
Eğer katılmak istemezseniz ne olur?

3

Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayanmaktadır. Eğer istemiyorsanız çalışmaya katılmayabilirsiniz																
Size uygulanabilecek olan alternatif yöntemler nelerdir?																
Herhangi bir alternatif yöntem yoktur.																
Bu çalışmaya katıldığım için bana herhangi bir ücret ödenecek mi?																
Hayır, size bu çalışmaya katıldığınız için herhangi bir ücret ödenmeyecektir.																
Bu çalışmaya katıldığım için ben herhangi bir ücret ödeyecek miyim?																
Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.																
Bilgilerin gizliliği: Tüm kişisel ve tıbbi bilgileriniz gizli kalacak, sadece bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.																
Bu çalışmanın sorumlusunun iletişim bilgileri																
1- Adı, soyadı: Mustafa Barış ZEYTUNLU 2- Ulaşılabilir telefon numarası: 3- Görev yeri: Menderes 2 nolu Görece ASM																
Çalışmaya Katılma Onayı: Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren formu okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasalara bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.																
Bilgilendirilmiş gönüllü olurunun imzalı ve tarihli bir kopyasının bana verileceğini biliyorum.																
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">GÖNÜLLÜNÜN</th> <th>İMZASI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ADI & SOYADI</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>ADRESİ</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>TELEFONU</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>TARİH</td> <td colspan="2"></td> </tr> </tbody> </table>		GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI	ADI & SOYADI			ADRESİ			TELEFONU			TARİH		
GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI														
ADI & SOYADI																
ADRESİ																
TELEFONU																
TARİH																
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının</th> <th>İMZASI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ADI & SOYADI</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>ADRESİ</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>TELEFONU</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>TARİH</td> <td colspan="2"></td> </tr> </tbody> </table>		Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının		İMZASI	ADI & SOYADI			ADRESİ			TELEFONU			TARİH		
Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının		İMZASI														
ADI & SOYADI																
ADRESİ																
TELEFONU																
TARİH																

EK 2:

OLGU RAPOR FORMU

PROTOKOL NO:

ADI SOYADI:

YAŞ:

CİNSİYET:

BOY:

KİLO:

ADRES:

TELEFON NUMARASI:

TEDAVİSİNİ YAPAN HASTANE/BÖLÜM/KLİNİK:

KAYITLI OLDUĞU AİLE HEKİMİ/İLÇE SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ:

KRONİK HASTALIKLARI:

KRONİK KULLANDIĞI İLAÇLAR:

MEME CA TİPİ/STAGE(EVRE)/GRADE(DERECE):

AİLE ÖYKÜSÜ:

KEMOTERAPİ,RADYOTERAPİ ÖYKÜSÜ:

CERRAHİ GEÇMİŞİ:

METASTAZ DURUMU:

KULLANILAN AKILLI İLAÇ:

İLAÇ DİRENCİ GELİŞİMİ:

EK NOTLAR:

TANI ALDIKTAN SONRA YILLARA GÖRE KULLANILAN İLAÇLAR VE UYGULANAN TEDAVİLER TABLOSU

AKILLIİLAÇ,KEMOTERAPİ,RADYOTERAPİ	1.YIL	2.YIL	3.YIL	4.YIL	5.YIL