



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ SİSTEM BİYOLOJİSİ ANABİLİM

**MEME KANSERİNDE 18-FDG PET/BT SONUCU İLE DOKUDAKİ MİR-22,
MİR-328-3P ve MİR-140 MİKRO RNA'LARININ EKSPRESYONLARININ
KORELASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF ÖZLEM GÖKÇE

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. MERVE MELİHA ÇİÇEKLİYURT

ÇANAKKALE – 2022



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TIBBİ SİSTEM BİYOLOJİSİ ANABİLİMDALI

**MEME KANSERİNDE 18-FDG PET/BT SONUCU İLE DOKUDAKİ MİR-22,
MİR-328-3P ve MİR-140 MİKRO RNA'LARININ EKSPRESYONLARININ
KORELASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif Özlem GÖKÇE

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Meliha Merve ÇİÇEKLİYURT

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyonu Birimi kurumu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: TYL-2022-3842

ÇANAKKALE – 2022



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Elif Özlem GÖKÇE tarafından Doç. Dr. Meliha Merve ÇİÇEKLİYURT yönetiminde hazırlanan ve **29/08/2022** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**MEME KANSERİNDE 18-FDG PET/BT SONUCU İLE DOKUDAKİ MİR-22, MİR-328-3P ve MİR-140 MİKRO RNA’LARININ EKSPRESYONLARININ KORELASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tıbbi Sistem Biyolojisi Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS YETERLİK TEZİ** olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Doç. Dr. Meliha Merve ÇİÇEKLİYURT

(Danışman)

Prof. Dr. Özlem YAYINTAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Levent ELMAS

.....

.....

.....

Tez No : 10489302

Tez Savunma Tarihi : 29/08/2022

Doç. Dr. Yener PAZARCIK
Enstitü Müdürü

29/08/2022

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Elif Özlem GÖKÇE

10/08/2022

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bana yol gösterici olan, bilgi birikimi ile çalışmama katkı sağlayan, beraber çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. Merve Meliha ÇİÇEKLİYURT'a, emeği geçip bizi bilgileri ile aydınlatan sayın hocalarıma ve Tıbbi Sistem Biyolojisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özlem YAYINTAŞ'a, çalışmamda desteklerini esirgemeyen Doç.Dr. Kenan ÇETİN'e ve genel cerrahi araştırma görevlilerine, ayrıca çalışmam boyunca beni cesaretlendiren, yardımlarını esirgemeyen sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi Oruç Numan GÖKÇE'ye , biricik kızım Elif Maria GÖKÇE'ye , manevi desteğini esirgemeyen her anımda yardımcı olan sevgili aileme ve çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

Elif Özlem GÖKÇE
Çanakkale, Ağustos 2022

ÖZET

MEME KANSERİNDE 18-FDG PET/BT SONUCU İLE DOKUDAKİ MİR-22, MİR-328-3P ve MİR-140 MİKRO RNA'LARININ EKSPRESYONLARININ KORELASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Elif Özlem GÖKÇE

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Sistem Biyolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Meliha Merve ÇİÇEKLYURT

29.08.2022, 59

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitedir. Kanser yayılımında metastaz yapmaya yol açan yollar arasında kan yolu ve lenfatik sistem vardır. Cinsiyet, yaşlanma, östrojen, aile öyküsü, gen mutasyonları, sağlıklı yaşam tarzı gibi meme kanserini gelişim riskine etkisi olan faktörler vardır.

Kötü huylu hücrelerin yüksek glukoz gereksinimleri ve artan glukoz alımına ihtiyacı olduğu bilinmektedir. Kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcı (GLUT) proteinleri glukoz metabolizmasında glukozun hücre zarından taşınmasında aracılık eder. GLUT1' in aşırı ekspresyonu yapılan çalışmalarda zayıf sağkalım ile ilişkilendirilmiştir.

Mikroribonükleik asit'ler (miRNA) transkripsiyonel, translasyonel ve epigenetik süreçlerin müdahalesi yolu ile gen ekspresyonlarını düzenleyen küçük, kodlanmayan RNA larıdır. Çalışmalarda miRNA'ların onkojenik veya onkosupresör yollara müdahale ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda miR-22, miR-328 ve miR-140 aşırı ekspresyonu kanser hücresi büyümesi ve proliferasyonu ile doğrudan ilişkili olabileceğini gösterilmiştir. Yine bu miRNA'lar GLUT1 üzerine'de etki ederler.

Glukoz analogu olan 18F-fluorodeoxyglukoz (18-FDG) pozitron emisyon tomografisi (PET) ile kombine edilerek kanserlerin takibinde, evrelemede ve tespitinde kritik bir araçtır ve günümüzde pek çok kanserde kullanılmaktadır. 18-FDG'nin hücre içine alınmasında görevli proteinler arasında GLUT1'de vardır.

Çalışmamızda RNA elde edilmesi ve miRNA ölçümü için hastanın taze tümör dokusu ve eş zamanlı olarak normal dokusundan örnek alındı, RT-PCR: terstranskripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu ile miRNA'lar değerlendirildi. Ayrıca çalışmaya katılan hastaların PET/BT sonuçları değerlendirildi.

Kanserin evresi ile GLUT1 arasında ters orantı gösterilmiştir. Ancak 18-FDG PET/BT tutulumu ile GLUT1 kodlanmasında etkili mikroRNA'lar arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma tarafımızca tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda kanserli dokularda mir-22, mir-328 ve mir-140 ekspresyonlarının sağlıklı dokulara göre downregüle gösterilmiştir, ancak bu değişimin PET/BT sonuçları korelasyon göstermemiştir.

Anahtar Kelimeler: miR-22, miR-328, miR-140, Meme Kanseri, PET/BT, GLUT

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CORRELATIONS OF 18FDG PET/CT RESULT AND EXPRESSIONS OF MIR-22, MIR328-3P and MIR-140 MICRO RNA'S IN BREAST CANCER TISSUE

Elif Özlem GÖKÇE

ÇanakkaleOnsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Medical Systems Biology

Advisor/Supervisor: Doç. Dr. Meliha Merve ÇİÇEKLYURT

29.08.2022, 59

Breast cancer is the most common malignancy in women. Among the pathways that lead to metastasis in cancer spread are the haematologic and the lymphatic system. There are factors that affect the risk of developing breast cancer, such as gender, aging, estrogen, family history, gene mutations, and unhealthy lifestyle.

It is known that malignant cells need high glucose requirements and increased glucose uptake. The facilitator glucose transporter (GLUT) proteins mediate glucose metabolism by transporting glucose across the cell membrane. Overexpression of GLUT1 has been associated with poor survival in studies.

Microribonucleic acids (miRNAs) are small, non-coding RNAs that regulate gene expression through interference with transcriptional, translational, and epigenetic processes. Studies have shown that miRNAs interfere with oncogenic or oncosuppressor pathways. Studies have shown that overexpression of miR-22, miR-328 and miR-140 may be directly related to cancer cell growth and proliferation. Again, these miRNAs also act on GLUT1.

The glucose analog, 18 F-fluorodeoxyglucose (18-FDG), combined with positron emission tomography (PET), is a critical tool in the follow-up, staging and detection of cancers and is used in many cancers today. Among the proteins involved in the uptake of 18-FDG into the cell is GLUT1.

In our study, samples were taken from the patient's fresh tumor tissue and simultaneously from normal tissue for RNA extraction and miRNA measurement, and

miRNAs were evaluated by RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction. In addition, PET/CT results of the patients participating in the study were evaluated.

An inverse correlation has been shown between the stage of cancer and GLUT1. However, we have not found a study showing the relationship between 18-FDG PET/CT uptake and microRNAs that are effective in coding GLUT1.

In our study, miR-22, miR-328 and miR-140 expressions in cancerous tissues were shown to be down-regulated compared to healthy tissues, but the correlation of this change with PET/CT results could not be demonstrated.

Keywords: miR-22, miR-328, miR-140, Breast cancer, PET/CT, GLUT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
BİRİNCİ BÖLÜM	
GİRİŞ	
1.1. Giriş ve Amaç	1
İKİNCİ BÖLÜM	
KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	
2.1. Meme Kanseri Hakkında Genel Bilgiler	3
2.2. Meme Kanserinde Risk Faktörleri	3
2.2.1. Genetik Olmayan Risk Faktörleri	3
2.2.2. Genetik Faktörler	4
2.2.3. Meme Kanseri ile İlişkili Genler	5
2.2.4. Meme Kanserinde GLUT Genlerinin Önemi	7
2.3. MikroRNA	8
2.3.1 Genel Özellikleri	8
2.3.2. MikroRNA'nın Biyogenezi	9
2.3.3. Oncomir, Onkosupresörmir	13
2.3.4. miR-22	13
2.3.5. miR-140	14
2.3.6. miR-328-3P	15

2.4.	Meme Kanserinde Görüntüleme Yöntemleri	15
2.4.1.	PET/BT	16

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM

19

3.1.	Araştırmanın Türü	19
3.2.	Araştırma Evreni ve Örneklem Seçimi	19
3.3.	Veri Toplama	19
3.4.	Etik	19
3.5.	Malzeme ve Laboratuvar Ekipmanları.....	20
3.5.1.	Cihazlar ve Teknik Malzemeler	20
3.5.2.	Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	20
3.5.3.	Kullanılan Sarf Malzemeleri	21
3.6.	Doku örneklerinden RNA izolasyonu.....	21
3.7.	Elde edilen RNA'ların Nükleik Asit Miktar ve Kalite Tayini	22
3.8.	miRNAPoly (A) Tail Oluşturma İşlemi	23
3.9.	miRNASTem-LoopReverse Transkriptaz (cDNA) İşlemi	24
3.10.	Gerçek Zamanlı Real -Time PCR (qPCR) Çalışması	24
3.11.	PET/BT Çekimi	26
3.12.	İstatistiksel Analiz	27

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

28

4.1.	Bulgular.....	28
4.1.1.	Demografik Veriler	28
4.1.2.	Tümör Evrelemesi	29
4.1.3.	PET/BT Sonuçlar	29
4.1.4.	mikroRNA değerleri	30

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ ve ÖNERİLER

45

5.1.	Tartışma	45
------	----------------	----

5.2. Sonuç	47
KAYNAKÇA	49
EKLER	I
EK 1. ETİK KURUL ONAYI.....	II



SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

18-FDG	18F-fluorodeoksiglukoz
PET	Pozitron emisyon tomografisi
BT	Bilgisayarlı tomografi
GLUT	Glukoz transporter proteinleri
GLUT1	glukoztransporter (taşıyıcı) ailesinden olan glukoz transporter 1
miRNA	mikroribonükleik asit
miR-22	mikroribonükleik asit 22
miR-328	mikroribonükleik asit 328
miR-140	mikroribonükleik asit 140
SNP	Single nucleotid polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
BRCA1	Meme kanseri yatkınlık geni1
BRCA2	Meme kanseri yatkınlık geni2
DNA	Deoksiribonükleik asit
CBC	kontralateral meme kanseri
ER	Östrojen reseptörü
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
c-erbB-2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörüdür
HER3	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 3
HER4	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 4
HER1	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 1
c-erbB-1	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 1
HER	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
TGF- α	Transforming büyüme faktörü alfa
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz
Ras-Raf-	Sıçan sarkom virüsü -Hızla Hızlandırılmış Fibrosarkom-Mitojenle aktive
MAPK	olan protein kinaz
JNK	c-Jun N-terminal kinazlar

IBC	İnflamatuvar meme kanseri
PR	Progesteron reseptörü
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
bHLH/LZ	Temel Helix-Loop-HelixLösün Fermuar
HAT:	Histon asetiltransferazları
Myc	Myc proteini
c-Myc	hücreseleMyc
MTA1	Metastazla ilişkili protein1
hTERT	İnsan Telomeraz ters transkriptaz
PEG10	PEG10 proteini
GTP	Guanozin trifosfat
BMI1	B lenfoma moloneymurin lösemi virüsü ekleme bölgesi-1
miRNA	Mikroribonükleik asitler
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı RNA
RBP	RNA bağlayıcı protein
HveE	Hematoksilen ve eozin boyası
ITC	İzole tümör hücreleri
IHC	İmmünohistokimya
RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
TNM	Tümör, düğüm, metastaz
AJCC	Amerikan Ortak Kanser Komitesi (American jointcommittee on cancer)
UICC	Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği
2D	2 boyutlu
3D	3 boyutlu

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Poly-A Polimeraz deney protokolü	23
Tablo 2	miRNASTem-loopReverse Transkriptaz (cDNA) protokolü	24
Tablo 3	Mix hazırlama protokolü	25
Tablo 4	Prob Tabanlı Hidroliz mikro RNA deteksiyonu protokolü	25
Tablo 5	Thermocycler prosedürü	25
Tablo 6	Hasta demografik bilgileri	28
Tablo 7	Hastaların evrelemeleri	29
Tablo 8	Hastaların Evrelerine göre SUV _{max} değerleri	30
Tablo 9	Sağlıklı ve tümör dokusunda miR-22 değerleri	31
Tablo 10	miR-22 için sağlıklı ve kanserli dokuda ROC analizi	33
Tablo 11	miR-22 için AUC	34
Tablo 12	Sağlıklı ve tümör dokusunda miR-140 değerleri	35
Tablo 13	miR-140 için sağlıklı ve kanserli dokuda ROC analizi	37
Tablo 14	miR-140 için AUC	38
Tablo 15	Sağlıklı ve tümör dokusunda miR-328 değerleri	39
Tablo 16	miR-328 için sağlıklı ve kanserli dokuda ROC analizi	41
Tablo 17	miR-328 için AUC	42
Tablo 18	Patoloji Sonuçlarına Göre miR-22, miR-140 ve miR-328 karşılaştırmaları (T-Test)	43
Tablo 19	miR-22, miR-140 ve miR-328 ile PET/BT sonuçları arasındaki korelasyon	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	miRNA biyogenezi	12
Şekil 2	miR-22'nin sağlıklı ve tümörlü dokudaki dağılımı	32
Şekil 3	miR-22 için ROC eğrisi	34
Şekil 4	miR-140'ın sağlıklı ve tümörlü dokudaki dağılımı	36
Şekil 5	miR 140 için ROC eğrisi	38
Şekil 6	miR-328'in sağlıklı ve tümörlü dokudaki dağılımı	40
Şekil 7	miR 328 için ROC eğrisi	42
Şekil 8	miR-22, miR-140 ve miR-328'in sağlıklı ve tümörlü dokuda birbirlerine oranları	43

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1.1.Giriş ve Amaç

Meme kanseri ikinci sıklıkta görülen kanser türüdür. Görülen tüm kanserlerin yaklaşık %12'lik oranı ile dünya çapında 1,7 milyon bireyi etkiler. Normal hücrelerde ve anormal şekilde artmış glukoz alımı ve kullanımı olan kanserli hücrelerinin büyüme ve gelişmesinde glukoz metabolizması önemli role sahiptir (Li vd., 2019).

MikroRNA'lar (miRNA'lar) küçük düzenleyici RNA molekülleridir. Boyutları yaklaşık 18-25 nükleotid tir ve gen ekspresyonunu post transkripsiyonel olarak modüle ederler. Çalışmalarda miRNA'ların onkojenik (kanseri kolaylaştırıcı) veya supresör (baskılayıcı) yolları modüle edebileceği veya ekspresyonlarının onkogenler veya tümör supresör genler tarafından düzenlenebilecekleri gösterilmiştir (Tang vd, 2012). miRNA'lar hücre metabolizmasına, protein ürünleri metabolik yolları doğrudan etkileyen genlerin ekspresyonunu düzenleyerek ya da düzenleyici olarak görev alan enzimlerin regülatörlerin modülasyonu ile dolaylı olarak müdahil olurlar. Örnek olarak Glukoz transporter proteinleri (GLUT) ve hexokinaz ekspresyonuna etki ederek glukoz uptake'ini (hücreye alımın) ve glikolizi baskılayan miRNA'lar vardır (Chen vd., 2014).

Hücre yüzeyi glukoz transporter (taşıyıcı) ailesinden olan glukoz transporter 1 (GLUT1) glukozun taşınmasında kolaylaştırıcı fonksiyona sahiptir. GLUT1'in overekspresyonu (fazla ifade edilmesi) çeşitli malign tümörlerde tanımlanmıştır, GLUT1 overekspresyonunun kötü diferansiye meme kanserinde yüksek çoğalma aktivitesi, artmış invazyon (yayılma) ve agresif davranışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hussein vd., 2011). GLUT1 üzerine etkisi olan miRNA'lar arasında miR-22 (Chen vd., 2015), miR-328 (Yi vd., 2020) ve miR-140 (He vd., 2019) vardır. miR-22'nin overekspresyonu meme kanser hücrelerinin proliferasyonunu, koloni oluşumunu, invazyonunu inhibe eder (baskılar) ve apoptozu GLUT1 aracılığı ile indükler, meme kanserinde GLUT1 ekspresyonu miR-22 ekspresyonu ile ters orantılıdır. miR-22 düzeyleri meme kanserli dokuda, kanser olmayan dokuya göre anlamlı daha azdır (Chen vd., 2015). miR-328-3p aralarında meme kanserinin de bulunduğu pek çok kanserde downregüledir. GLUT1 mir-328-3p için doğrudan bir

hedefdir (Yi vd., 2020). miR-140-5p doğrudan GLUT1' hedefler, invaziv meme kanserinde anlamlı şekilde downregüledir ve klinik evre arttıkça ekspresyonu daha da azalmaktadır. miR-140-5p meme kanserinde glikolizi baskılar (He vd., 2019).

Pozitron emisyon tomografisi (PET) çekiminde radyoaktif işaretli bir glukoz analogu olan 18F-fluorodeoxyglukoz (18-FDG) kullanılır. PET Kanser takibinde, evrelemesinde ve tespitinde kritik bir araçtır ve günümüzde pek çok kanserde kullanılmaktadır (Zang vd., 2016). 18-FDG PET tümörlerin aralarında glukoz transporter proteinlerinin de bulunduğu metabolik enzimlerinin ekspresyonuna dayanır, GLUT1 bunlardan biridir (Chang ve Kundranda, 2017). GLUT1'de olan bir tek nükleotid değişimi (SNP) 18-FDG PET tutulumuna olan etkisi araştırıldığında; Xbal G>T SNP'nin 18 FDG tutulumunda artış ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Grabellus vd., 2010). Meme kanserinde 18-FDG PET'nin X-ışını bilgisayarlı tomografi ile kullanımı (PET/BT) çokça çalışılmıştır. PET/BT mediastinal, aksiller ve internal mammarial lenf nodlarına metastazları tespit edebilir (Paydary vd., 2019).

RNA elde edilmesi ve miRNA ölçümü için kullanılan yöntemler arasında aynı hastadan taze tümör dokusu alınması ve eş zamanlı olarak normal doku alınması vardır. Yapılan bir çalışmada ameliyat esnasında çıkarılan kısımda tümörden en uzak olan alan normal doku olarak kullanılmıştır (Santassusagna vd., 2018).

18-FDG PET/BT kanser tutulumunda takipte kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem kanserli hücrelerin glukoz kullanımı ile çalışır. Kanser hücrelerinde glukozun hücre içine alınmasında önemli görevi olan GLUT1'i düzenleyen mikroRNA düzeyleri değişebilmekte. Kanser evresi ile GLUT1 arasında ters orantı gösterilmiştir. Ancak 18-FDG PET/BT tutulumu ile GLUT1 kodlanmasında etkili mikroRNAlar arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma tarafımızca tespit edilmemiştir. Amacımız bu ilişkinin varlığını göstermektir.

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Meme kanseri hakkında genel bilgiler

Meme kanseri kadınlardaki en sık malign kanserdir (Zhang vd., 2021). Bu ölümlerin %60'ı gelişmiş ülkelerde olup, tahmini sağkalım 5 yılda gelişmiş ülkelerde %80 iken, gelişmekte olan ülkelerde ise %40'ın altındadır (Coleman vd., 2008). Malign hastalıklar arasında meme kanserinin menopozdan sonra kadınlarda meydana gelen ölüm nedenlerinin %23'ünü oluşturmaktadır (Akram vd., 2017).

Kanser yayılımında metastaz yapmaya yol açan yollar arasında kan yolu ve lenfatik sistem vardır. Bu yollardan en sık etkin olanı lenfatik sistemdir, bu nedenle lenf nodu metastazı evreleme, tedavi planlanması ve prognoz belirlemede kritik role sahiptir (Zhang vd., 2021). Muhtemelen başarılı bir tedavi tasarlamada önemli bir faktör, tanı anında tümörün boyutunu tam olarak belirlemektir. Klinisyenler arasında en yaygın kullanılan kanser evreleme sistemi, American joint committee on cancer (AJCC) ve uluslararası kanser kontrolü birliği (UICC) tarafından benimsenen TNM sistemidir (Edge ve Compton, 2010). Çalışmamızda AJCC'nin 8. sürümü kullanıldı.

2.2. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

2.2.1. Genetik olmayan risk faktörleri

Cinsiyet, yaşlanma, östrojen, sağlıklı bir yaşam tarzı gibi birçok risk faktörü meme kanseri geliştirme riskini artırabilir (Majeed vd., 2014). Yaş, diğer birçok kanserde olduğu gibi meme kanserinde de yaygın bir risk faktörüdür. Aslında, yaşa özel insidans oranları için kabul edilen bir kodlama modeli kapsamlı bir şekilde varsayılmaktadır (Armitage ve Doll, 2004). Meme kanserleri çoğunlukla kadınlarda görülür, cinsiyete göre oranlandığında kadınlarda vaka sayısı erkeklere göre 100 kat daha fazladır (Siegel vd., 2017). Kadınlarda meme kanserinin yaşa özgü dağılımını gösteren eğri 50 yaş civarında Clemmesen'in çentiği

denilen bir dalgalanma gösterir (Clemmesen, 1948). Bu dalgalanma menapoz ile ilişkilendirilir (Gleason vd., 2012).

Östrojen

Meme kanseri riski ile endojen ve eksojen östrojenler ilişkilidir. Yumurtalık tarafından menapoz öncesi kadınlarda endojen östrojen üretilir ve yumurtalıkların çıkarılması meme kanseri riskini azaltabilir (Key vd., 2013).

Yaşlanma

Cinsiyetle birlikte, meme kanseri insidansı yaşla güçlü bir şekilde ilişkili olduğundan, yaşlanma meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir (Brewer vd, 2017).

Üreme faktörleri

İlk adet döngüsünün erken olması, geç yaşta gebelik ve menapoz gibi faktörler meme kanseri riskini artırabilir. Her 1 yıllık menopozda gecikmenin meme kanseri riskini arttırdığı fakat her yapılan doğum ve menarştaki yıllık gecikmelerde meme kanserinin %5 - %10 oranında azaldığını tespit edilmiştir (Sun vd., 2017). Çalışmalarda doğum yaşının 20 yaşından önce ve 35 yaşından sonra olmasının etkisine bakılmış ve her iki yaş grubunda risk artışı tespit edilmiştir (Horn vd., 2013).

2.2.2.Genetik Fakörler

Meme kanserine yatkınlık genleri, BRCA1 ve BRCA2 1990'ların ortalarından sonra keşfedildi (Miki vd., 1994; Wooster vd., 1995). BRCA1 ve BRCA2 hücre büyümesi, hücre bölünmesi ve DNA onarımında görev alır. Bu gendeki mutasyonlar DNA hasarının onarılmadan birikmesine neden olur. Ailesinde meme kanseri öyküsü bulunan bireylerde bu genlerdeki kalıtsal mutasyonlar görülürken, 80 yaşına kadar bu mutasyonun görülme sıklığı fazladır (Kuchenbaecker vd., 2017).

BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki patojenik mutasyonlar meme, yumurtalık ve kontralateral meme kanseri (CBC) riski taşır. BRCA1 ve BRCA2 taşıyıcılarındaki kanser

riskleri tanı anındaki yaşa veya hastada kanserin bulunduğu yere, aile öyküsüne, mutasyonun tipine ve yerine göre değişir. Ayrıca, güçlü aile öyküsü olan bireylerdeki artmış risk genetik değiştiricilerin veya riski etkileyen diğer ailesel faktörlerin varlığı ile tutarlıdır. Son zamanlarda, geniş retrospektif çalışmalarda *BRCA1* ve/veya *BRCA2* taşıyıcıları için meme kanseri riski ile ilişkili birkaç yaygın alelin olduğu bildirilmiştir. Tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) her biri kanser riski ile ilişkilendirildiğinde etkileri küçüktür, ancak bu aleller kombinasyon halinde bireyleri farklı risk kategorilerine ayırmada faydalı olabilir (Mavaddat vd., 2013).

Aile öyküsü

Meme kanseri vakalarının yaklaşık dörtte biri aile öyküsü ile ilgilidir (Brewer vd., 2017). Yakın çevresinde meme kanseri olan kadınlarda meme kanseri sık görülür. Yapılan çalışmalarda yakın akrabalarında meme kanseri olan kadınların, herhangi bir akrabası meme kanseri olmayan kadınlara oranla hastalığa yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca, meme kanseri olan iki veya daha fazla birinci derece akrabası olan kadınlarda risk daha yüksek olur (Brewer vd., 2017).

2.2.3. Meme Kanseri ile İlgili Genler

BRCA1 ve BRCA2 Geni

BRCA1 ve *BRCA2* meme kanseri riski ile ilişkili olan anti-onkogendir. Her ikisi de tümör baskılayıcı proteinleri kodlar. *BRCA1* eksikliği, hücre döngüsü kontrol noktasının düzensizliğine, anormal sentrozom duplikasyonuna, genetik kararsızlığa ve muhtemelen sonunda apoptoza yol açar (Deng, 2006; Dine ve Deng, 2013).

BRCA1 ekspresyonu, p130, p107 gibi "cep proteinleri" ve retinoblastoma proteinini tarafından, transkripsiyon faktörü kodlayan bir gen olan E2F'ye bağlı bir şekilde bastırılır. *BRCA* geninin kendi promotörü ile etkileşimler yoluyla bu genin ekspresyonunu düzenleyen promotör, intronlar ve terminatör bölgeler arasında bir döngü oluşturduğu gösterilmiştir (Sun vd., 2017). *BRCA2* proteini, DNA çift zincir kırıklarında rekombinasyonel onarımı düzenler. *BRCA2* ile ilişkili meme kanserlerinin yüksek dereceli invaziv duktal karsinom olma olasılığı daha yüksektir. Bir birey *BRCA1* veya *BRCA2* genlerinde zararlı mutasyonları kalıtsal olarak alırsa meme kanseri riski büyük ölçüde artabilir. *BRCA1/2*

genlerindeki mutasyonlar, otozomal dominant bir şekilde kalıtılır. Toplamda, kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %20-25'i ve tüm meme kanserlerinin %5-10'u BRCA1/2 mutasyonlarından kaynaklanır (Balmaña vd., 2011).

HER2

c-erbB-2 olarak da bilinen insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2, meme kanserinde önemli bir onkogendir ve insan kromozomu 17'nin (17q12) uzun kolunda bulunur. *HER2* geninin ekspresyonu, esas olarak gen amplifikasyonu ve yeniden düzenlenmesi yoluyla aktive edilir. HER2 proteini, tirozin kinaz ailesinin bir epidermal büyüme faktörü reseptörüdür (EGFR) ve Her3 ve Her4 gibi diğer ligand-bağlı EGFR ailesi üyeleri ile heterodimerler oluşturur, böylece aşağı akım sinyal yollarını aktive eder (Harbeck ve Gnant, 2017).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), HER1

İnsanlarda *c-erbB-1* veya *Her1* olarak da bilinen *EGFR*, kromozom 7'nin (7p12) kısa kolunda bulunur. EGFR proteini, tirozin kinaz ailesinin bir hücre yüzeyi glikoproteinidir ve HER ligandları olan EGF, TGF- α , amphiregulin, betacellulin ve benzerlerine bağlanarak aktive edilir. EGFR sinyal sistemi olan PI3K, Ras-Raf-MAPK ve JNK dahil olmak üzere EGFR'nin aşağı akış sinyal yolları, hücre proliferasyonunu, hücre istilasını, anjiyogenezi teşvik etmek ve hücreleri apoptoza karşı korumak için tetiklenir (Ali ve Wendt, 2017; Appert-Collin vd., 2015).

Meme kanserinin çok agresif bir alt tipi olan inflamatuvar meme kanseri (IBC) vakalarının %30'dan fazlasında EGFR'nin aşırı ekspresyonu, bulunur (Alanazi ve Khan, 2016; Zhang vd., 2009).

Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonunun yokluğu ile karakterize edilen üçlü negatif meme kanseri (TNBC) vakalarının yarısından fazlasında EGFR aşırı ekspresyonu da vardır (Kim vd., 2017).

c-Myc Geni

Bu gen, kromozom 8'in (8q24) uzun kolunda bulunur ve bHLH/LZ (temel Helix-Loop-Helix Lösün Fermuar) alanını içeren bir transkripsiyon faktörü olan Myc proteinini kodlar. Genom çapında tarama, tüm genlerin %15'inin, esas olarak E-box konsensüsüne (CACGTG) bağlanma ve histon asetil transferazları (HAT'ler) veya DNAmetiltransferazları

iş e alma yoluyla Myc proteini tarafından düzenlendiğini gösterir (Green vd., 2016). MTA1, hTERT ve PEG10 gibi Myc tarafından düzenlenen genlerin bazıları meme kanserinin başlaması ve ilerlemesinde hayati roller oynar. c-Myc'nin aşırı ekspresyonu ağırlıklı olarak meme karsinomlarının yüksek dereceli, invaziv aşamasında gözlenirken, iyi huylu dokularda c-Myc amplifikasyonu saptanmamıştır (Chen ve Olopade, 2008; Jung vd., 2017).

Ras

Ras gen ailesinde üç üye vardır: sırasıyla 11 (11p15), 12 (12p12) ve 1 (1p22) kromozomunda yer alan H-ras, K-ras ve N-ras'dır. Bu genler tarafından kodlanan proteinler son derece homologdur ve küçük guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı protein (G proteini) ailesine aittir (Pylayeva-Gupta vd., 2011). Nokta mutasyonları yaygın olarak bu üç insan *Ras* geninin aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir ve çoğu GTP bağlanması için kodlama alanında bulunan yanlış anlamlı (mismatch) mutasyonlardır. Ras proteinlerinin mutasyonları meme kanserinde seyrek olarak (<5%) olmasına rağmen, Ras sinyal iletim yolunun anormalliği hem iyi huylu hem de kötü huylu meme dokularında gözlenir (Siewertsz van Reesema vd., 2016).

H-ras, çoğalmayı, invazyonu teşvik etmek ve meme kanseri hücrelerinde apoptozu inhibe etmek için B lenfoma moloney murin lösemi virüsü ekleme bölgesi-1 (BMI1) ile iş birliği yapabilir. H-ras aşırı ekspresyonu hem birincil hem de ileri meme kanseri hastalarında tespit edilir, bu da kötü bir prognozu gösterir (Fernández-Medarde ve Santos, 2011; Ray ve Ray, 2015).

2.2.4. Meme Kanserinde GLUT Genlerinin Önemi

Kötü huylu hücrelerin hızlandırılmış metabolizmaya, yüksek glukoz gereksinimlerine ve artan glukoz alımına sahip olduğu bilinmektedir. Glukozun memeli hücrelerinin plazma zarı boyunca taşınması, glukoz metabolizması için ilk hız sınırlayıcı adımdır ve kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcı (GLUT) proteinleri aracılık eder. Malign hücrelerde artan glukoz taşınması, karakteristik bir özellik olan GLUT1'in aşırı ekspresyonu ile glukoz taşıyıcı proteinlerin artan ve düzensiz ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Kültürlenmiş memeli hücrelerinin onkojenik transformasyonu, GLUT1 promotör arttırıcı elementler ile

etkileşim yoluyla glukoz taşınmasında ve GLUT1 ekspresyonunda hızlı bir artışa neden olur. İnsan çalışmalarında, tümörlerde yüksek seviyelerde GLUT1 ekspresyonu, zayıf sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Macheda v.d., 2005).

2.3. MikroRNA

miRNA ilk olarak Ambros ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Yuvarlak solucan *Caenorhabditis elegans*'ın genetik taramasında bir gen, lin-4, bir proteini değil, bunun yerine 22 nükleotid küçük bir RNA'yı kodladığı keşfedildi (Reinhart vd., 2000). Bunlar gelişim eksikliğine neden olan mutantlardı (Lee v.d., 1993). Ancak lin-4 yakın ilişkili bir tür bulunamadı ve genomik bilgi ve taramanın başarısız olduğu sadece *C.elegans*'a özgü bir mekanizma olduğu kabul edildi. let-7 sinek ,fare ve insanda keşfedildi. 2000 yılında *C. elegans*'ta başka bir 22 nükleotid miRNA, let-7 keşfedildi (Pasquinelli vd., 2000; Reinhart vd., 2000). Let-7'nin insanlar ve diğer türler arasında korunduğu bulundu ve bu da önemli bir biyolojik işlevi olduğunu düşündürdü (Pasquinelli vd., 2000). Lin-4 ve let-7'ye benzer birçok küçük düzenleyici RNA, hemen hemen tüm çok hücreli organizmalarda tanımlandı ve miRNA'lar olarak adlandırıldı (Lagos-Quintana v.d., 2001). İnsanlardaki miRNA'ların birbirinin homoloğu olduğu anlaşıldı (Lee vd., 1993).

2.3.1. Genel Özellikleri

Mikroribonükleik asitler (miRNA'lar), aynı kökenli dizilerin tanınması ve transkripsiyonel, translasyonel veya epigenetik süreçlerin müdahalesi yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyen küçük kodlamayan RNA'lardır (Chen vd., 2019). MikroRNA'lar (miRNA'lar), mesajcı RNA'nın (mRNA) transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinen ~22 nt küçük kodlamayan RNA'lardır (Ali Syeda vd., 2020). miRNA'lar, insan genomunda mRNA'ya baz eşleşmesi şeklinde bağlanarak, transkripsiyonun üçte birini düzenlediği düşünülmektedir (Berti vd., 2019). MikroRNA'lar (miRNA'lar), genellikle haberci RNA'nın (mRNA) 3' UTR'sine bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu transkripsiyon sonrası baskılayan, saç tokası türevli RNA'lardır (Ebert ve

Sharp, 2012). miRNA'lar, mesajcı RNA (mRNA) translasyonunu inhibe ederek veya mRNA azalmasına teşvik ederek transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu modüle etme kabiliyetine sahiptir (Correia de Sousa vd., 2019).

Kanser, kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar da dahil olmak üzere sayısız fizyolojik süreç ve patolojinin sonucu büyük ölçüde miRNA'lara dayanır (Correia de Sousa vd., 2019).

miRNA'lar tarafından mRNA ekspresyonunun düzenlenmesi sıklıkla hücre/organa özgüdür; organizmanın stresine ve metabolik durumuna yüksek oranda bağımlı ve genellikle miRNA ekspresyon seviyeleri ile ilişkilidir (Correia de Sousa vd., 2019).

Genetik polimorfizmler, miRNA promotörlerinin metilasyonu, asimetric miRNA iplik seçimi, RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler) veya diğer kodlayıcı/kodlayıcı olmayan RNA'lar ile etkileşimler dahil miRNA etkisini modüle etmek için çeşitli mekanizmalar tarif edilmiştir (Correia de Sousa vd., 2019).

2.3.2. mikroRNA'nın biyogenezi

MikroRNA'lar (miRNA'lar), genetik bilginin proteinlere dönüştürülme hızını şekillendirmek için transkripsiyon sonrası gen düzenlemesine rehberlik eden küçük kodlamayan RNA'lardır. Bu nedenle miRNA'lar, bitki ve hayvanlarda normal gelişim ve fizyoloji için gerekli olan gen ekspresyon modellerinin oluşturulmasına katkıda bulunur (Kim vd., 2009).

miRNA'lar intron ve eksonlarda ya bağımsız olarak miRNA genlerinden kopyalanır ya da diğer kopyalardan üretilir (Rodriguez v.d., 2004). Hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası mekanizmalar miRNA biyogenezini düzenler (Siomi ve Siomi, 2010).

miRNA'lar, RNA polimeraz II tarafından kopyalanır. RNA polimeraz II, bağımsız geneomik transkripsiyon birimlerinden protein kodlamayan genlerin intronlarından uzun pri-miRNA üretilir (Rodriguez vd., 2004). miRNA genlerinin uzun birincil transkripti (pri-miRNA), 5' ucu 7-metilguanozin (m7Gppp) ile kapatılır ve 3' ucu poliadenile edilir. Pri-

miRNA daha sonra çekirdekteki RNase III enzimi Drosha tarafından pre-miRNA'ya işlenir (Ameres ve Zamore, 2013).

Kanonik biyosentetik yolda, bir birincil miRNA (pri-miRNA) kopyalanır, çift sarmallı RNA'ya özgü endoribonükleaz (DROSHA) enzimleri ve DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8 (DGCR8) dahil olmak üzere bir mikroişlemci kompleksi tarafından tanınır ve bölünür. Bir öncü miRNA (pre-miRNA) oluşturur. Pre-miRNA, Ekspörtin-5 (XPO5) ile çekirdekten sitoplazmaya aktarılır ve DICER tarafından bölünür. Ortaya çıkan küçük RNA dubleks, tercihen diğer zinciri çıkararak olgun miRNA'nın yalnızca bir sarmalını tutan Argonaute (AGO) proteinine yüklenir. MiRNA yüklü AGO, GW182 (TNRC6A olarak da bilinir) dahil olmak üzere diğer kofaktörlerle birleşir ve RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) olarak adlandırılan efektör kompleksi oluşturur (Correia de Sousa vd., 2019).

RNase III enzimi Drosha, pri-miRNA'yı keserek ~60 nükleotid kök-ilmek yapıda pre-miRNA oluşturur. Drosha, pri-miRNA bir veya daha fazla pre-miRNA'yı kesip çıkarır. Böylece, pri-miRNA'lar birkaç pre-miRNA üretebilir. Polisistronik miRNA'lar, tek bir promotörün birden fazla miRNA'nın birlikte ekspresyonunu sürmesine izin verir ve bazı durumlarda, tek bir yolda hedef faktörlerin koordineli ekspresyonuna aracılık eder. Pre-miRNA'lar daha sonra DICER enzimi ve protein kinaz R'nin protein aktivatörü (PACT) veya Trans-aktivasyon yanıtı RNA bağlayıcı protein (TRBP) gibi ko-faktörler tarafından daha fazla işlenmek üzere Ekspörtin-5 ile sitoplazmaya aktarılır (Denli vd., 2004; Gregory vd., 2004; Lee vd., 2003).

Drosha, daha büyük bir kompleksin, mikroişlemcinin bir bileşeni olarak hareket eder. Bu kompleksin en az iki biçimde var olduğu görülmektedir; işlevi bilinmeyen bir ~ 600 kDa kompleksi ve memelilerde DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8 (DGCR8) ve diğer hayvanlarda Pasha adlı Drosha ve onun dsRNA bağlayıcı proteinini içeren daha küçük bir heterodimerdir (Han vd., 2006; Landthaler vd., 2004; Yeom vd., 2006).

Pasha'nın Drosha ile iş birliği, küçük RNA biyogenezinde genel bir paradigmayı tanımlar: dsRNA bağlayıcı proteinler, işledikleri substratları kısıtlamak, bir substrat için afinitelerini artırmak veya bölünme bölgesi doğruluğunu geliştirmek için RNase III enzimleriyle ortakdır. miRNA üreten enzimlerin ve bunların substratlarının hücre altı dağılımı, hayvan pri-miRNA'larının çekirdekte kırıldığını, oysa pre-miRNA'ların

sitoplazmasında işlendiğini bilinmektedir (Lund vd., 2004; Yi vd., 2003; Zeng ve Cullen, 2004).

EXP5, yüküne ve çekirdekdeki kofaktör Ran'ın GTP'ye bağlı formuna iş birliği içinde bağlanır ve sitoplazmada RanGTP taşıma reseptörleri ile pre-miRNA'lar uçlarını ve gövdesini tanıyarak çekirdekten sitoplazmaya geçer. (Bohnsack vd., 2004; Kim vd., 2009).

Sitoplazmada, ikinci bir RNase III enzimi olan Dicer, pre-miRNA'dan bir ~22 nükleotid miRNA-miRNA dubleksini serbest bırakır (Bernstein vd., 2001).

Bazı organizmalar, farklı Dicer izotiplerinin farklı rollere sahip olduğu birden fazla Dicer homologu içerir (Lee vd., 2004; Xie vd., 2004)

Dicer-1 pre-miRNA'ları parçalarken, Dicer-2 siRNA'ları üretir. Drosha gibi, Dicer-1 de tanımlanmış RNA yapılarını tanıyarak ve daha sonra pre-miRNA gövdesinin tabanından sabit bir mesafede bölünerek ~ 22 nükleotid olgun miRNA-miRNA dubleksleri üretmek için halkayı keser (Pase vd., 2009).

İnsanda Dicer, TRBP (TAR RNA bağlayıcı protein; TARBP2 olarak da bilinir) ve PACT (PRKRA) olarak da bilinen yakından ilişkili iki protein ile etkileşime girer. RNA kaynaklı susturma kompleksinin oluşumuna, RISC, katkıda bulunuyor (Chendrimada vd., 2005; Haase vd., 2005).

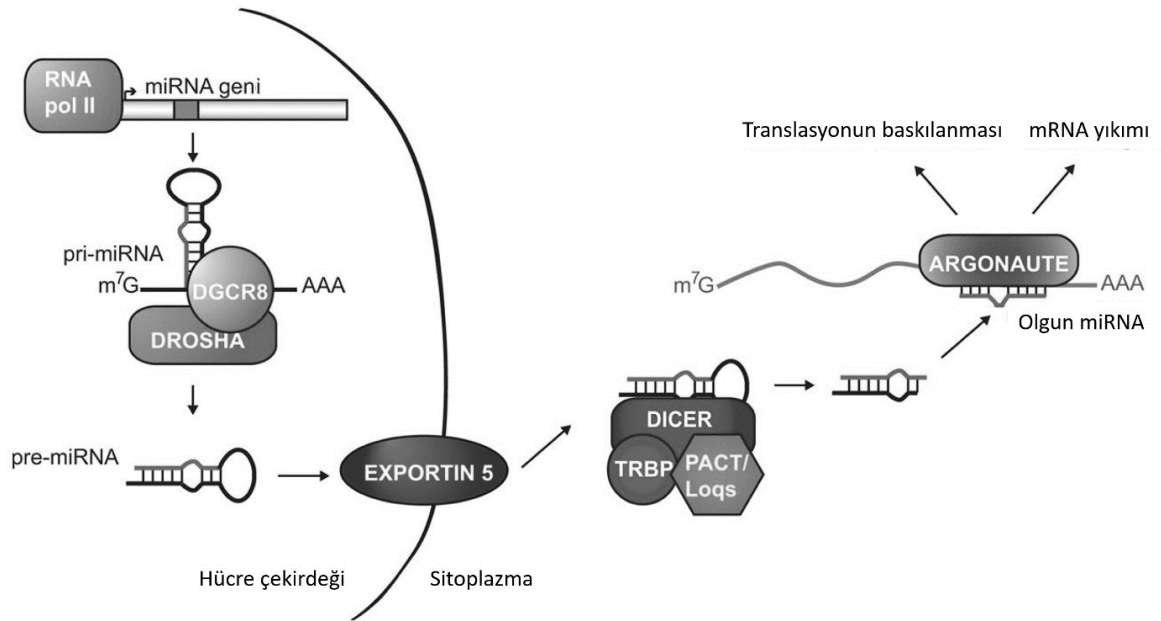
Dicer bölünmesini takiben, ortaya çıkan ~ 22-nt RNA dubleksi, efektör kompleksi RISC'yi oluşturmak için bir Ago proteinine yüklenir. ~ 22-nt RNA dubleksinin bir ipliği AGO'da olgun bir miRNA (kılavuz iplik veya miRNA) olarak kalırken diğer iplik (yolcu iplik veya miRNA) bozulur. siRNA dubleksleri üzerinde yapılan çalışmalar, dubleksin iki ucunun nispi termodinamik stabilitesinin, hangi ipliğin seçileceğini belirlediğini gösterir. (Aza-Blanc vd., 2003; Khvorova vd., 2003; Schwarz vd., 2003).

Pri-miRNA'ların kırılması gibi, pre-miRNA'ların 'kübiklenmesi' de atlanabilir. Hairpin yapısı Dicer tarafından tanınmayacak kadar kısa ise bunun yerine, AGO2 tarafından olgun bir miRNA daha fazla işlenmek üzere doğrudan RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) yüklenir. Çoğu miRNA spesifik dsRNA bağlayıcı proteinlerle ortak olan özel ribonükleaz III (RNase III) enzimleri tarafından sırayla daha kısa ara ürünlere bölünen daha uzun, molekül içi çift sarmallı RNA'lardan (dsRNA'lar; birincil pri-miRNA'lar) olarak adlandırılır (Kim vd., 2009).

Olgun miRNA dubleksini nihayet bir multi-protein kompleksine yüklenir, RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) ve seçilen bir miRNA zinciri (-5p veya -3p), kompleksi kendi haline yönlendiren Argonaute (AGO) proteinine bağlanır (Correia de Sousa vd., 2019).

miRNA'ların biyogenezi ve olgunlaşması, hücrelerin ve çevrelerinin fizyopatolojik durumlarına duyarlı çoklu hücrel faktörlerin kontrolü altında çok daha karmaşık ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş süreçler gibi görünmektedir. DNA düzeyinde, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) ve DNA/histonların klasik asetilasyon/metilasyon mekanizmaları yoluyla transkripsiyonun epigenetik kontrolü, onların eylemlerini yöneten miRNA düzenlemesinin birinci seviyesini temsil eder (Correia de Sousa vd., 2019).

MiRNA'ların biyosentezi ve olgunlaşması, DROSHA/DGCR8/DICER ve RISC kompleksi gibi bu süreçlerde anahtar enzimlerle etkileşime girebilen RNA bağlayıcı proteinlerden (RBP'ler) de etkilenebilir (Correia de Sousa vd., 2019).



Şekil 1 miRNA biyogenezi (Finnegan ve Pasquinelli, 2013)

2.3.3. Oncomir, Onkosupresörmir

Çalışmalarda miRNA'ların onkojenik (kanseri kolaylaştırıcı) veya supresör (baskılayıcı) yolları modüle edebileceği veya ekspresyonlarının onkogenler veya tümör supresör genler tarafından düzenlenebilecekleri gösterilmiştir (Tang vd., 2012).

Özellikle miRNA aracılı gen ekspresyon kontrolü, açlık, hipoksi, oksidatif stres ve DNA hasarı gibi çevresel streslere verilen hücresel yanıt için kritiktir ve bu nedenle kanser gibi insan hastalıklarında rol oynar. Gerçekten de, sayısız miRNA onkogenler ("oncomiR'ler" olarak anılır) veya tümör baskılayıcılar ("onkosupresör miR'ler") olarak işlev görebilir ve miRNA ekspresyonunun düzensizliği, kanserin başlaması, ilerlemesi ve metastaz ile yakından ilişkilidir (Ali Syeda vd., 2020).

Normal fizyolojik koşullarda hücre proliferasyonu, hücre metabolizması ve protein sentezi gibi hücresel süreçlerin uygun şekilde düzenlenmesini sürdürmek için miRNA'lar gerektiğinden, deregülasyonları tümör gelişimine, ilerlemesine ve progresyonuna katkıda bulunan hücrelerin anormal büyümesine ve biyosentezine yol açar. Metastaz sadece miRNA biyogenez makinelerinin genetik ve epigenetik düzensizliklerini değil, aynı zamanda miRNA'ların düzenleyici mekanizmalarını gösteren ortaya çıkan kanıtlar, kanserde miRNA ekspresyonunun düzenleyici mekanizmalarının önemini göstermiştir (Ali Syeda vd., 2020).

miRNA genomik lokuslarının genetik silinmesi veya amplifikasyonu ve epigenetik metilasyonu ve birincil miRNA'nın transkripsiyon faktörü aracılı düzenlemesi, kanserde miRNA ekspresyonunun manzarasını sıklıkla değiştirir (Ali Syeda vd., 2020).

2.3.4. miR-22

miR-22 aşırı ekspresyonunun kanser hücresi büyümesi ve proliferasyonu ile doğrudan ilişkili olmayabileceğini gösterir. Büyüme bağlamının çok önemli olduğu meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edildiğinde miR-22 işlevselliğinin ilgi çekici bir alanı gözlemlendi. Sadece miR-22'yi aşırı eksprese eden hücreler üç boyutlu kültürlerde büyütüldüğünde büyümede bir artış gözlemlendi. 3D ortamda büyütülen hücreler, daha fazla

fizyolojik gen ekspresyon profiline ve komşu hücrelerin reseptörleri ile daha fazla etkileşime sahiptir. 3D kültürler ayrıca hücre göçünü ve transkripsiyonel düzenlemeyi düzenleyen hücre dışı matris ile farklı etkileşimler sergiler. Bu, miR-22'nin kendi içinde meme kanserinin büyümesini teşvik etmek için yeterli olmadığına işaret eder, ancak yalnızca 3D kültürlerde farklı şekilde ifade edilebilen henüz keşfedilmemiş diğer yardımcı faktörlerin yardımını gerektirir (Vesuna vd., 2021).

Değişmiş ekspresyon gösteren miRNA'lar arasında miR-22 metastatik klonlarda aşağı regüle edilmiştir. miR-22'nin öngörülen hedeflerinin metastatik bölgeye özgü diferansiyel protein ekspresyonu modelini ve metastatik hücrelerde miR-22'nin azaltılmış seviyelerinin onkojenik yolların aktivasyonuna yol açtığı yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Patel vd., 2011).

Yapılan çalışmalarda, miR-22'nin düşük ekspresyonunun geç TNM evresi, lenf nodu metastazı, lokal nüks ve uzak metastaz ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur. miR-22'nin düşük ekspresyonu, lenf nodu alt gruplarında kısa sağkalım ve kötü prognoz ile anlamlı şekilde ilişki tespit edilmiştir (Shao vd., 2019).

miR-22, meme kanseri hastalarında kötü bir prognostik faktördür ve TNBC (Triple-negative breast cancer) hücre dizilerinde aşırı eksprese edilir ve hücre istilasını ve metastazı destekler (Pandey vd., 2015).

2.3.6. miR-140

miR-140 ekspresyonunun tümör hücrelerinin fenotipik değişikliklerine aracılık ettiğini göstermiştir (Fangvd., 2017).

miR-140 ekspresyonu, büyümeyi ve meme kanseri kök hücre kendini yenileme potansiyelini önemli ölçüde bastırır (Livd., 2014). Meme kanserinde önceki çalışmaların sonuçlarına dayanarak, miR-140, önemli ölçüde azaltılmış miRNA'lardan biri olarak kabul edilmiştir (Shahabi vd., 2020).

miR-140 ekspresyonu, komşu normal dokulara kıyasla meme kanseri tümör dokularında önemli ölçüde azalmış ve miR-140 ekspresyonunun meme kanserli hastaların kötü prognozunu öngördüğü bulunmuştur (Zhou vd., 2019).

2.3.5. miR-328-3p

miR-328-3p'nin aşırı ekspresyonu, hücre proliferasyonu, G1-S geçişi, göçü ve istilası üzerinde inhibitör etkiler gösterdiği yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. miR-328-3p hücre göçü yeteneklerinde bir azalmaya neden olabilir, hücre döngüsünün durdurulmasını tetiklediğinden kanserli davranışları inhibe ettiğini gözlenmiştir (Ma vd., 2020).

miR-328-3p, mRNA ve protein seviyelerini azaltır (Al-Momany vd., 2021). Meme kanseri dokularında ve hücrelerinde miR-328-3p ekspresyonunun kontrol örneklerine kıyasla önemli ölçüde azaldığını gözlenmiştir. miR-328-3p kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, proteinleri aşırı eksprese eden hücre kolonilerinin sayısında artışa yol açtı. Transwell göç deneyinde, miR-328-3p göç eden hücrelerin azalmasına karşı koydu (Xiao vd., 2019).

2.4. Meme Kanserinde Görüntüleme Yöntemleri

İlk tanı konulduktan sonra hastalığın yaygınlığını belirlemek veya tedaviye yanıtı değerlendirmek ya da evreleme/yeniden evreleme amacı ile X-ışını çalışmaları, ultrasonografi (USG), Bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MR) ve 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glukoz pozitron emisyon tomografisi/X-ışını bilgisayarlı tomografi (PET/BT) ile yaygınlık araştırması yapılmaktadır (Paydary et al., 2019)

2.4.1. PET/BT

Nükleer Tıp ve Moleküler Derneği, moleküler görüntülemeyi şu şekilde tanımlamıştır: Biyolojik süreçlerin insanlarda ve diğer canlı sistemlerde moleküler ve hücresele düzeylerde görselleştirme, karakterizasyon ve ölçümüdür. Moleküler görüntüleme tipik olarak 2 boyutlu (2D) veya 3 boyutlu (3D) görüntüleme ile zaman içinde nicelleştirmeden oluşur. Pozitron emisyon tomografisi (PET) ile 2-[18F]fluoro-2-deoksi-D-glukoz (FDG) bunun temelini oluşturur (Basu vd., 2014).

Hibrit PET/bilgisayarlı tomografi (PET/BT)'nin ticari olarak bulunabilirliği klinik kullanımın yaygınlaşmasına yol açmıştır ve insan ile ilişkili tüm ana sağlık alanlarında klinik kullanım bulmasının yanı sıra nöroloji, onkoloji, kardiyoloji ve enfeksiyon/inflamasyon alanlarında da araştırma amaçları ile kullanılmaktadır (Basu vd., 2014).

Pozitron emisyon tomografisi (PET) invivo olarak biyolojik aktiviteyi gösteren bir görüntüleme tekniğidir. PET'te çeşitli biyomolekülleri işaretlemek için genellikle fluorine-18 (¹⁸F) ve farklı pozitron nükleotidleri kullanılır. Bu işaretleme ile sayesinde marker moleküllerin biyolojik karakteristikleri ve fonksiyonlarının bütünlüğü biyolojik işlevleri görüntülerken korunur, böylece hastalık nedeni ile oluşan genetik, metabolik ve fonksiyonel değişiklikler tanı için tespit edilebilir (Zhang vd., 2021). PET'in yüksek sensitivite ve spesifitesi meme kanseri ve lenf nodu metastazı tanısına olanak sağlar ve tedavi seçimi için bir temel oluştururken tedaviye yanıtın izlenmesine de olanak verir (Zhang vd., 2021).

Meme kanserinde 2-deoxy-2-[¹⁸F] fluoro-D-glukoz pozitron emisyon tomografisi/X-ışını bilgisayarlı tomografi (PET/BT) yaygın olarak çalışılmıştır. Bu çalışmalara göre her ne kadar PET/BT sadece primer meme kanseri tanısında rutin olarak kullanılmamaktadır. PET/BT mediastinal, aksiller ve internal mammaryial lenf nodlarına olan metastazları tespit edebilir (Paydary vd., 2019).

Son yıllarda pozitron emisyon tomografisi/bilgisayarlı tomografisinin (PET/BT) çeşitli kanserlerin tanı, evreleme, takip ve tedavisindeki önemi tüm dünyada artmıştır (Çelik vd., 2019).

PET/BT ileri evre hastalıktan şüphelenildiğinde, konvansiyonel yaklaşımlar yeteri kadar aydınlatıcı olmadığında tercih edilir. Yine PET/BT lokorejyonel rekürrenslerin (kendi

çevresinde) tespit edilmesinde oldukça duyarlı ve özgüdür ve tümör markırlarında artış olan asemptomatik hastalarda kullanılması önerilir (Paydary vd., 2019).

FDG/PET aralarında meme kanseri de olmak üzere, iyi ve kötü huylu tümörlerin ayırımında yerleşmiş bir tetkiktir (Kumar vd., 2006).

PET/BT görüntüleri kalitatif ve yarı kantitatif olarak değerlendirilirler. F-18 FDG'nin standardize uptake değeri (SUV) yarı kantitatif değerlendirmede en sık kullanılan parametredir. SUV değeri gram doku başına biriken radyoaktiviteyi temsil eder (Çelik vd., 2019).

PET kameralarda uzamsal çözünürlüğü sınırlayan “temel” etkiler dedektör genişliği, pozitron aralığı ve doğrusallıktır. PET kameraların çoğunda uzamsal çözünürlüğü bozan ek etkiler, tasarım, kod çözme hatası, dedektör halkasına nüfuz etme ve örneklemedir (Moses, 2011).

96 hastada yapılan bir çalışmada normal meme parankiminin maksimum ve ortalama SUV değerlerinin ortalamaları sırası ile 0.88 ± 0.32 ve 0.72 ± 0.29 bulunmuşken en yüksek değer 1,8 olarak tespit edilmiştir (Kumar vd., 2006).

Zhang vd. tarafından 40 hastada yapılan çalışmada normal aksiller alanda erken ve gecikmiş çekimlerde SUV_{max} değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı fark görülmemiştir ve eken faz SUV_{max} değerleri aksiller bölge için 0.282 ± 0.048 olarak tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom için erken ve geç fazlardaki SUV_{max} değerleri arasında istatistiki anlamlı fark tespit edilmemiştir (Zhang vd., 2021).

Tümör hücrelerinin artmış glikolitik aktiviteleri ve artmış FDG tutulumları olduğu bilinmektedir (Warburg etkisi), bu durum da patolojik odakların FDG PET/BT ile görüntülenmesini sağlamaktadır. FDG tutulumu yine mitotik endeks ve primer tümörün grade inden de etkilenebilir (Basu vd., 2014; Paydary vd., 2019).

Kimyasal farklılıklara rağmen, FDG'nin hücre içine alımı glukoza benzer. FDG glukoz taşıyıcıları (GLUT'lar) tarafından aracılık edilen kolaylaştırılmış taşıma yoluyla hücre zarını geçer. İnsan dokularında da GLUT'ların 4'ten fazla farklı izoformununun dağılım gösterdiği tanımlanmıştır (Macheda vd., 2005). GLUT1 insanlarda en yaygın glukoz taşıyıcısıdır ve GLUT3 ile birlikte birçok tümörde aşırı ifade edilir (Ganapathy vd., 2009).

GLUT1 ekspresyonu seviyeleri, tümör gelişimi ve olumsuz prognoz ile ilişkilidir (Szablewski, 2013).

FDG-fosfat hücre dışına çıkabilmesinin tek yolu heksokinazlar aracılığı ile katalize edilen resiprokal defosforilasyondur. Defosforilasyonglukoz-6-fosfataz tarafından katalize edilir ve sonuçta hücreyi GLUT'lar aracılığı ile kolaylaştırılmış difüzyon ile terk edebilen FDG oluşur. Kanser hücrelerinde Azaltılmış glukoz 6-fosfataz seviyeleri (normal hücreler ile karşılaştırıldığında) kanser hücrelerinde FDG-fosfat birikimine yol açar (metabolik tuzak) (Nelson vd., 1996; Yamada vd., 2012).

FDG kansere özgü değildir, enfeksiyon, iltihaplanma olan alanlarda ve ayrıca normal dokularda yüksek glukoz döngüsü olan alanlarda birikebilir (Basu vd., 2014).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Türü

Deneysel çalışma araştırması.

3.2. Araştırmanın Evreni ve Örneklem Seçimi

Bu araştırma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'ne başvuran meme kanseri tanısı almış, çalışmaya katılmayı kabul etmiş, 18 yaş ve üzeri 14 kadın hastadır. Hastalar cerrahi tedaviye uygun bireylerdir. Kanser grubu cerrahi ile çıkarılan memedeki kanser dokusundan alınan biyopsi materyali, kontrol grubu ise cerrahi rezeksiyon yapılan meme dokusunda kansere uzak sağlıklı dokudan alınan biyopsi materyalidir.

3.3. Veri Toplama

Doku örnekleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hastanesi Genel Cerrahi kliniğinde cerrahi tedavisi gerçekleştirilen hastaların ameliyat ile çıkarılan dokulardır. Kanserli ve sağlıklı dokulardan alınan biyopsiler qRT-PCR yöntemi ile incelendi. Hastaların PET/BT raporlarından kanserli doku SUV_{max} değerleri elde edildi.

3.4. Etik

Çalışmamız, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 20.10.2021 tarih ve Karar No: 2021-07 ile onay almıştır (Ek-1).

3.5. Malzeme ve Laboratuvar Ekipmanları

3.5.1. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

1. Mikro Santrifüj (ThermoScientific, SL8)
2. Mikro Santrifüj (Eppendorf, 5415-R)
3. Makro Santrifüj (Nüve, Seri No: 01-0158)
4. Real Time PCR (Roche Lightcycler, 480 II)
5. Spinner (Thermo Scientific, MySpin 6)
6. PCR (Eppendorf, Master Cycle Gradient)
7. Class II Biyogüvenlik Kabini
8. Buzdolabı (Arçelik, No-frost ev tipi buzdolabı)
9. Freezer (Sanyo Biomedical Freezer)
10. Spektrofotometre (Thermo Scientific)
11. Pipet seti (Gilson 0.2-2, 20-100, 1-10, 100-1000 µl)
12. Pipet seti (Thermo Scientific 1-10, 2-20, 10-100, 100-1000 µl)

3.5.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

1. Hlzol Reaktifi (Diagen, Ankara)
2. Poly(A) Polymerase, Yeast (abm, USA)
3. OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit (abm, USA)
4. SensiFAST™ Probe No-ROX Kit (meridian bioscience, USA)
5. miR-22 kit (Diagen, Ankara)

6. miR-140 kit (Diagen, Ankara)
7. miR-328-3p kit (Diagen, Ankara)
8. MİRNA RNU6 kit (Diagen, Ankara)

3.5.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

1. Steril Mikro Pipet Uçları (10-100-1000 μ L)
2. Ependorf (1,5 mL- 2 mL)
3. PCR tüpü (0,2 μ L)
4. Parafilm
5. Piko Real PCR Plate
6. Adhesive Film

3.6. Doku örneklerinden RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu, trizol (Hizolreaktifi, DIAGEN) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 2 ml tüplere alınan doku örneklerinin üzerine, 1 ml trizol solüsyonu eklenerek tüpler 45 saniye vortekslenmiştir. Trizol; içeriğindeki fenol ve guanidin tiosiyanat bileşenleri yüksek kalitede total RNA elde edilmesini sağlayan pembe bir solüsyondur. Trizolün reaksiyondaki görevi, homojenizasyon sırasındaki fiziksel parçalamaya ek olarak kimyasal parçalamanın sağlanması ve nükleazları denatüre ederek işlem sırasında numunedeki RNA ve DNA'nın bütünlüğünü korumasıdır. Dokular seramik boncuklar kullanılarak homojenize edilmiştir. İşlem sonrasında vortekslenme sırasında ısınan tüpler tüpler 5 dakika buzda, sonrasında ise 5 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Homojen hale gelen dokularda faz oluşumunu sağlamak için her tüpe 200 μ l kloroform eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika daha beklenmiştir. Bu işlem sonrasında tüplerin içerisinde RNA, DNA ve protein örnekleri elde edilmiştir. Tüpler 12.000 rpm'de 4°C'de 20

dakika santrifüj yapılarak 3 ayrı faz oluşumu sağlanmış ve her fazda DNA, RNA ve protein ayrı ayrı elde edilmiştir.

Santrifüj sonunda 3 faz oluşacaktır:

Faz I: (Sulu faz): RNA içerir (Renksiz).

Faz II: DNA içerir (Beyaz renkli).

Faz III: (Organik faz): Protein içerir (Kırmızı renkli)

RNA izolasyonu için renksiz üst faz kullanılmıştır. Renksiz olan 1. faz yeni tüpe aktarılmış ve üzerine 500 µl izopropanol eklenerek, RNA, DNA ve diğer moleküllerden arındırmak için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda 12.000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernatant atılmıştır. Oluşan pellet üzerine 1 ml %75'lik Etil alkol (EtOH) eklenerek, 7.500 x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj sonrasında süpernatant atılarak 60°C'de EtOH uçurulacak ve kalan pellet (çökelek) 50-100 µl RNAz içermeyen su eklenerek pipetaj yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometre ile belirlenmiştir.

3.7. Elde edilen RNA'ların Nükleik Asit Miktar ve Kalite Tayini

RNA örneklerinin konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanlarında ölçüm gerçekleştirilip, izole edilen RNA'ların saflığı A260/A280 oranı ile (1,8-2,0 ideal) kontrol edilmiştir. Total RNA numunelerinin nükleik asit yükleri 2 ng değerine qPCR aşamasında sonuçların tutarlılığı için sabitlenmiştir.

3.8. miRNA Poly (A) Tail Oluşturma İşlemi

miRNA dizileri, olgun formu “21 baz” büyüklüindedir. Bu kısa zincirli yapının, Poly (A) Polimeraz ile Poly (A) zinciri eklenerek kararlı bir yapıya dönüştürülmesi gerekir. Bu amaçla ticari kit (abmPoly-A Polymerase, Yeast) kullanılmıştır. Bu amaçla, buz üzerinde Tablo 1’de görülen bileşenler kısa bir spin atılarak karıştırılmış ve 37 °C’de 20 dk inkübe edilmiş ve reaksiyon, sıcaklığın 65°C’ye yükselterek 20dk sonra sonlandırılmıştır. Bu reaksiyon sonunda, mikroRNA’lar -80°C’de saklanmıştır

Tablo 1
Poly-A Polimeraz deney protokolü

Bileşenler	Miktar
RNA	10 µL
ATP (10nM)	1,25 µL
Poly (A) Polimeraz, Yeast (1U/µl)	5 µL
5xPoly (A) Polymerase, Yeastreak. buffer	5µL
25 mM MnCl ₂	2,5µL
Nuclease –free H ₂ O	5.25 5µL

3.9. miRNA Stem-LoopReverse Transkriptaz (cDNA) İşlemi

cDNA sentezi ticari olarak üretilen cDNA sentez kiti (OneScript® Plus), termal stabilite elde etmek için RNase H aktivitesini ortadan kaldırmak için genetik modifikasyonlara sahip bir Moloney-Murine Lösemi Virüsü Ters Transkriptaz içerir. Bu mutant enzim, daha yüksek cDNA verimleri, 12 kb’ye kadar daha uzun cDNA sağlayıp yüksek sıcaklıklarda (50°C - 55°C) çalışmamızı sağlar. GC açısından zengin RNA şablonlarıyla ilişkili ikincil yapıların ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır.

Üretici firmanın protokolünü uygun şekilde çalışmamızı gerçekleştirecektir. Tablo-2’de gösterilen kit içeriği buz üzerinde karıştırılıp, primer denatürasyonu için 25°C de 10 dakika, 50°C’de 15 dakika, 85°C de 5 dakika bekletilmiştir. Yeni sentezlenen cDNA, uygulama için veya -20°C ‘de depolama için hazır bulunmaktadır.

Tablo 2

miRNASTem-loopReverse Transkriptaz (cDNA) protokolü

Bileşen	Miktar
5XRT Buffer	4 µl
dNTP	1µl
Primers	1µl
Total RNA veya Poly (a)+mRNA	0,5µl
OneScript Plus RTase	1µl
Nucleas-free H ₂ O	4µl

3.10. Gerçek Zamanlı Real -Time PCR (qPCR) Çalışması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), modern moleküler biyolojide önemli roller oynar. Nicel gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR), çeşitli biyolojik örneklerden gen (RNA transkripti) ekspresyonunun doğru ölçümü ve karşılaştırılması için zaman açısından verimli ve güvenilir bir araçtır.

MikroRNA ekspresyon çalışması için gelen 14 sağlıklı, 14 kanserli dokuda mi-22, miR-140 ve miR-328 mikroRNA’ları için 28 numunenin real time PCR analizleri yapılmıştır. Deney uygulamalarında normalizatör olarak MİRNA RNU6 kullanılmıştır. Bu aşamada, SensiFast Prob No-Rox kiti ile gerçek zamanlı real –time PCR (qPCR) çalışması kit protokolüne uygun olarak Thermo Scientific Piko Real cihazı ile gerçekleştirildi. Kit TaqMan, Scorpions ve moleküler işaretli prob algılama teknoloji ile dizayn edilmiştir.

Tablo 3

Mix hazırlama protokolü.

Bileşen	Miktar
2xSensiFast Probe No-ROX mix	10 µl
10µ M Forward Primer	0,8 µl
10 µM Reverse Primer	0.8 µl
10 µM Probe	0,2 µl
Template	8.2µl
Nucleas-free H ₂ O	240 µl

Tablo 4

Prob Tabanlı Hidroliz MikroRNA Deteksiyonu protokolü

Bileşen	Miktar
MikroRNA mix (buffer)	10 µl
MikroRNA mix B (Primer/Probe - F ve R /P)	3,5 µl
cDNA	3 µl
Taq Polimeraz	0,2 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	3,5 µl

Tablo 5

Thermocycler prosedürü

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık/Derece	Tekrar
İlk Denatürasyon	Denatürasyon	95°C-5 dk	1
	Denatürasyon	95°C-5 sn	
PCR Aplikasyon	Bağlanma	55°C - 30 sn (Okuma)	40
	Polimerizasyon	72 °C - 10 sn	
Final	Soğutma	40 °C 30 sn	1

3.11. PET/BT Çekimi

Tüm hastalara rutin PET/BT görüntüleme protokolü uygulandı. Bu protokole göre, hastalardan görüntülemeden iki gün önce aşırı fiziksel egzersizden ve soğuğa maruz kalmaktan kaçınmaları ve en az altı saat aç kalmaları istendi. Görüntüleme öncesi tüm hastalarda kılcal kandan glukoz ölçümü yapıldı ve serum glukoz düzeyi 180 mg/dL'nin üzerinde olanlarda kan şekeri regülasyonu için F-18 FDG PET/BT görüntüleme ertelendi. Kan şekeri seviyesi uygun olan hastalara anjiyokat yardımıyla intravenöz 8-12 mCi F-18 FDG enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra radyofarmasötüğün biyodağılımını sağlamak ve ideal tümör alımını sağlamak için hastalar 45-60 dakika konuşmadan ve hareket etmeden sakin ve rahat bir ortamda dinlendirildi. Bekleme süresinin sonunda hastalar mesanelerini boşalttı ve PET/CT tarayıcı yatağına sırtüstü pozisyonda kollar yanlarda olacak şekilde yattı. İlk kılavuz topogram görüntüleri elde edildi, verteksten 1/3 proksimale kadar vücut bölgeleri için kontrastsız BT görüntüleri alındı, ardından PET görüntüleri alındı. Hastanın ortalama 7-8 yatak pozisyonunda ve 2 mm'lik kesitlerde PET/BT görüntüleri alındı ve yaklaşık 25 dakikada tamamlandı.

3.12. İstatistiksel Analiz

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR), gen ekspresyon seviyelerini ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. qPCR verilerini analiz etmek için iki strateji, mutlak ve göreceli nicelemedir. Standart bir eğriye bağlı olarak gen miktarını mutlak niceleme; bir referans numuneye göre gen ifadesindeki değişiklikleri göreceli niceleme tanımlar. Göreceli nicelemenin gerçekleştirilmesi mutlak nicelemeden daha kolaydır ve standart bir eğri oluşturmaya gerek olmadığından daha az reaktif gerektirir.

qPCR deneyleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi için kullanılan bağıl niceleme yöntemidir. Floresan seviyesinin belirli eşiğe ulaştığı Eşik döngüsü (CT), döngüdür. qPCR sisteminden üretilen CT bilgilerini doğrudan kullanır. Yöntemde, bir referans geni kullanılarak, hedef ve referans numunelerdeki gen ekspresyonunu hesaplanır. Çalışmamızda referans olarak

MİRNA RNU6 kullanıldı ve hesaplamalarda $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile referans miRNA seviyesine göre ilgilenilen miRNA anlatımı analiz edildi.

PET/BT değerlerinin anlamlılığının araştırılması için Mann Whitney U testi kullanıldı. Çalışılan sağlıklı ve kanserli dokulardan elde edilen miRNA değerlerindeki değişimin anlamlılığı T testi ile incelendikten sonra ROC analizi referans gruplama için kullanıldı. miRNA'ların tanı koyabilme değerleri ek olarak Cluster analizi ile değerlendirildi. Elde edilen miRNA değerleri ile PET/BT sonuçlarının anlamlılığının karşılaştırılmasında Pearson korelasyon analizi kullanıldı. Tüm çalışmalarda $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi olarak belirlendi.



DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bulgular

4.1.1. Demografik veriler

Hastalarımızın ortalama yaş değeri 59,5 yıl idi (38 – 74 yaş). Dört hasta Evre IA (%28,57), altı hasta IB (%42,85), ikisi IIA (14,28), birer tanesi IIB ve IIIB (herbiri%7,14) idi. Tümör ortalama boyutu 29,42 (11 – 130 mm) olarak hesaplandı. Tümör yerleşimi; 9 hastada sağ meme, 5 hastada sol memeydi. Aksiller metastazı olan 6 hasta vardı. Toplam 14 tümörlü meme kanseri dokusundan ve 14 tümörü çevreleyen normal meme dokusundan alınan örneklerde miR-22, miR-140, ve miR-328-3p ekspresyon düzeyleri belirlendi. Bu değerlerin tümör dokusu SUV_{max} değerleri ile korelasyonu yapıldı.

Tablo 6

Hasta demografik bilgileri

No	Yaş	Kanser olan taraf
1	47	Sağ
2	74	Sağ
3	66	Sağ
4	61	Sol
5	63	Sol
6	45	Sağ
7	69	Sağ
8	40	Sol
9	38	Sağ
10	74	Sol
11	52	Sağ
12	65	Sol
13	64	Sağ
14	75	Sağ

4.1.2. Tümör Evrelemesi

Hastaların tümörleri cerrahi rezeksiyon sonrası patoloji verilerine göre TNM sınıflamasına göre evrelendirildi.

Tablo 7

Hastaların evrelemeleri

No	Boyut (mm)	Grade	Aksiller metastaz	HER2	ER	PR	T	N	M	Evre
1	16	2	0	-	+	+	1	0	0	IA
2	13	2	0	-	+	+	1	0	0	IA
3	13	2	1	-	+	+	1	1	0	IB
4	30	2	1	-	+	+	2	1	0	IIA
5	25	2	0	-	+	+	2	0	0	IB
6	130	2	1	+	-	-	4	1	0	IIIB
7	30	2	0	-	-	-	2	0	0	IIB
8	30	2	0	+	+	+	2	0	0	IB
9	17	2	2	+	-	-	1	1	0	IA
10	11	2	2	-	-	-	1	1	0	IB
11	15	2	1	+	+	+	1	1	0	IB
12	12	2	0	-	+	+	1	0	0	IA
13	30	2	0	+	-	-	2	0	0	IIA
14	40	3	0	+	+	+	2	0	0	IB

T: Tümör sınıflaması, N: Lenf nofu tutulumu, M: Metastaz varlığı HER2: Epideramal büyüme faktörü 2, ER: Östrojen reseptörü PR: Progesteron reseptörü

4.1.3. PET/BT sonuçları

Yapılan 96 hastalık bir çalışmada sağlıklı meme dokusunun ortalama SUV_{max} değeri 0,8 olarak bulunmuştur (Kumar vd., 2006). Bu değer çalışmamıza referans olarak alınmıştır. Çalışmamızda elde edilen en yüksek SUV_{max} değeri meme kanseri Evre IB olan bir hastada

17.3, en düşük değer ise meme kanseri Evre IA olan hastada 1.2 dir. Ortanca SUV_{max} değeri 5.58 idi.

Tablo 8

Hastaların Evrelerine göre SUV_{max} değerleri

No	Evre	SUV_{max} Tümör
1	IA	3,3
2	IA	1,2
3	IB	1,5
4	IIA	8,2
5	IB	2,24
6	IIIB	2,52
7	IIB	3,82
8	IB	17,3
9	IA	1,92
10	IB	3,3
11	IB	6,91
12	IA	4,66
13	IIA	11,4
14	IB	9,9

PET/BT’de normal değer olarak tespit edilmiş olan 0,8 (Kumar vd., 2006) değeri ile hastaların tümörlü dokularından elde edilen SUV_{max} değerleri Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında z-skoru -2.40067, $p=0.0164$ ile anlamlı ulundu ($p < 0,05$).

4.1.4. mikroRNA değerleri

Hastaların sağlıklı dokularından ve tümörlü dokularından alınan numunelerin miR-22, miR-140 ve miR-328 değerleri aşağıdaki gibidir. Sağlıklı dokuların (D) miRNA değerleri ile Tümör dokularının (T) miRNA değerleri karşılaştırıldığında değerlerde anlamlı downregülasyon olduğu görölmektedir ($p < 0,05$).

miR-22 sonuçları

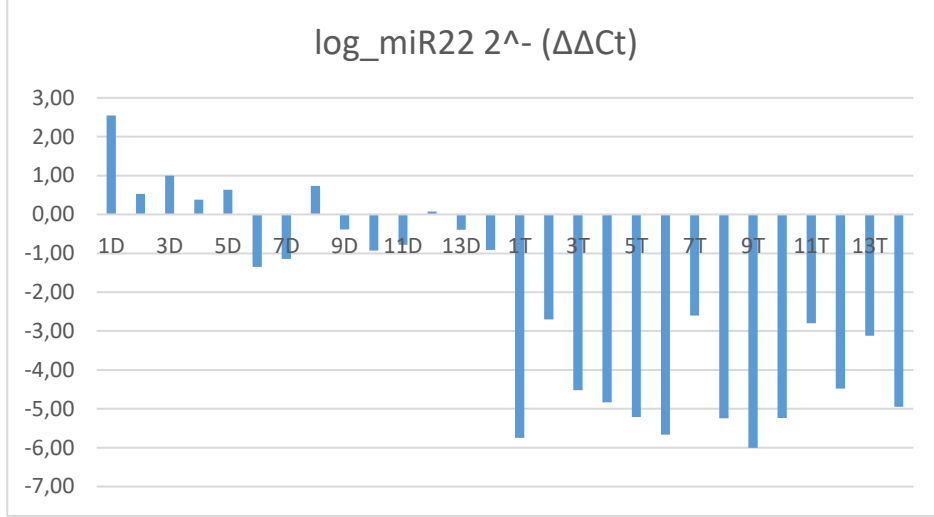
$\log_{2^{-}}(\Delta\Delta Ct)$ değerleri ele alındığında; sağlıklı doku için maksimum 2,57 ve minimum -1,35 olmak üzere ortanca değeri -0,125 olarak tespit edildi. Değerler arasında aralık 3,89 olarak bulundu. Tümör dokusu için elde edilen en yüksek değer -2,57, en düşük değer -5,97 ve ortanca değer ise -4,86 iken değerler arası aralık 3,39 olarak bulunmuştur.

Tablo 9

Sağlıklı ve tümör dokusunda miR-22 değerleri

Numune No	MİRNA RNU6A Ct1	MİRNA RNU6A Ct2	MİRNA RNU6A Ct Mean	miR22 Ct1	miR22 Ct2	miR22 Ct Mean	miR22 ΔCt	miR22 $\Delta\Delta Ct$	miR22 $2^{-}(\Delta\Delta Ct)$	$\log_{2^{-}}(\Delta\Delta Ct)$
1D	28,01	28,57	28,29	21,08	22,37	21,73	-6,56	-2,577	5,97	2,58
2D	26,28	26,53	26,40	21,83	21,89	21,86	-4,54	-0,555	1,47	0,56
3D	26,08	26,20	26,14	20,79	21,45	21,12	-5,02	-1,030	2,04	1,03
4D	24,57	24,78	24,68	20,15	20,41	20,28	-4,40	-0,411	1,33	0,41
5D	24,51	24,83	24,67	20,98	19,05	20,02	-4,65	-0,667	1,59	0,67
6D	23,68	24,37	24,02	21,55	21,16	21,35	-2,67	1,315	0,40	-1,32
7D	30,68	30,23	30,46	27,76	27,41	27,58	-2,87	1,116	0,46	-1,12
8D	25,65	25,15	25,40	20,29	21,00	20,64	-4,75	-0,768	1,70	0,77
9D	25,18	25,32	25,25	21,70	21,54	21,62	-3,63	0,357	0,78	-0,36
10D	24,66	24,33	24,50	21,29	21,53	21,41	-3,09	0,897	0,54	-0,90
11D	24,38	24,77	24,58	20,89	21,79	21,34	-3,24	0,750	0,59	-0,75
12D	24,99	24,96	24,97	20,69	21,07	20,88	-4,09	-0,107	1,08	0,11
13D	24,93	24,00	24,46	20,83	20,86	20,84	-3,62	0,367	0,78	-0,37
14D	24,77	24,88	24,82	21,95	21,50	21,72	-3,10	0,886	0,54	-0,89
1T	20,52	21,39	20,95	22,52	22,84	22,68	1,73	5,716	0,02	-5,72
2T	23,24	22,86	23,05	21,94	21,52	21,73	-1,32	2,667	0,16	-2,67
3T	22,18	22,44	22,31	21,93	23,70	22,81	0,50	4,487	0,04	-4,49
4T	19,98	19,45	19,72	20,87	20,20	20,53	0,82	4,806	0,04	-4,81
5T	21,31	21,19	21,25	22,66	22,23	22,44	1,19	5,181	0,03	-5,18
6T	20,83	20,07	20,45	21,90	22,30	22,10	1,65	5,637	0,02	-5,64
7T	21,14	21,97	21,55	20,31	19,97	20,14	-1,41	2,573	0,17	-2,57
8T	19,16	19,48	19,32	20,39	20,70	20,55	1,23	5,213	0,03	-5,21
9T	19,20	19,90	19,55	22,26	20,81	21,53	1,99	5,972	0,02	-5,97
10T	22,25	21,58	21,92	23,19	23,08	23,13	1,22	5,206	0,03	-5,21
11T	21,20	21,87	21,54	18,91	21,74	20,32	-1,21	2,773	0,15	-2,77
12T	22,71	22,91	22,81	23,42	23,13	23,28	0,46	4,450	0,05	-4,45
13T	22,04	22,60	22,32	21,06	21,79	21,42	-0,89	3,092	0,12	-3,09
14T	20,39	20,95	20,67	22,11	21,09	21,60	0,93	4,915	0,03	-4,91

D: sağlıklı doku, T: kanser dokusu



D: sağlıklı doku, T: kanserli doku

Şekil 2 miR-22'nin sağlıklı ve tümörlü dokudaki dağılımı

Patoloji sonuçları referans gruplama olarak alındı. miR-22 değerleri bu referans gruplama (patoloji gruplaması) ile ROC analizi aracılığıyla analiz edildi.

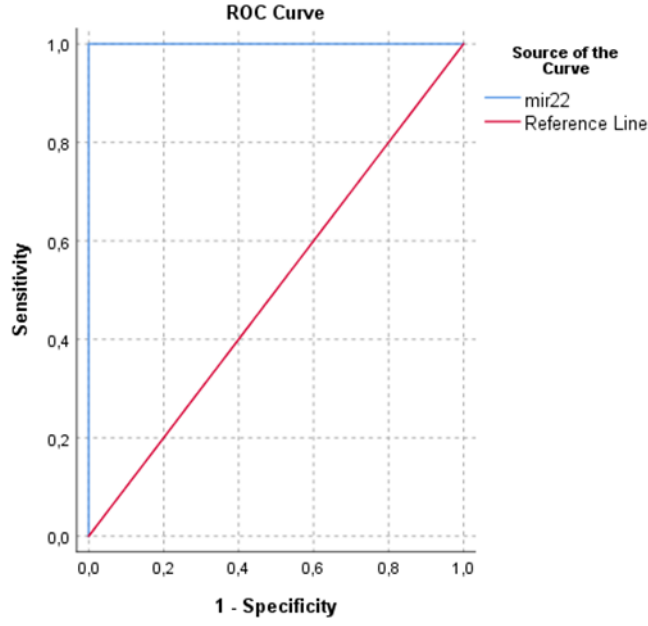
miR-22'nin değerleri sağlıklı ile kanserli dokuların sonuçları olarak kıyaslandı ve sonuçta AUC alanının anlamlı olduğu ($p < 0.05$), bu veri miR-22 sonuçlarının tanı koymak için kullanılabilir olduğunu gösterdi. Araştırma kapsamındaki veriler penceresinden bakıldığı "sensitivite" değerleri incelendiğinde -1,975 değerinin kesim noktası olarak kullanılabilceği belirlendi. ROC analizinin dışında miR-22 değerleri ile tanı koyabilmenin mümkünatı ek olarak Cluster Analizi kapsamında incelendi. Cluster analizi patoloji sonucunda sağlıklı doku örneklerine karşılık gelen miR-22 değerlerini bir grup, diğerlerini (kanserli) ise ayrı bir grup olarak tanımladı. Bu şekilde patoloji sonucu ile miR-22 sonuçlarının bire bir paralellik gösterdiği belirlendi.

ROC analizinde grafikte kıyaslanan değer (miR-22) için çizilen çizgi (mavi renk) referans kabul edilen değer (patoloji sonucu-kanser dokusu) için çizilen çizgiden (kırmızı çizgi) ne kadar uzaklaşırsa o derece anlamlıdır. Ne kadar yaklaşırsa tanı koymak için kullanılan yeni değerler uygunsuz anlamına gelmektedir. Çalışmamızın anlamlılığı yüksek olduğundan miR-22 için çizilen mavi çizgi tablo için alınan referans değerlerden daha büyük olduğu için dış çerçeve şeklinde görünmektedir.

Tablo 10

miR-22 için sağlıklı ve kanserli dokuda ROC analizi

Test sonuçları değişkenler: mir22				
To ^a ya eşit veya küçük iken pozitif	Sensitivite	1 -Spesifite	p	
-7,0000	,000	,000	<0,0001	
-5,8750	,071	,000		
-5,7100	,143	,000		
-5,4550	,214	,000		
-5,2250	,357	,000		
-5,0800	,429	,000		
-4,8950	,500	,000		
-4,6800	,571	,000		
-4,5000	,643	,000		
-3,8000	,714	,000		
-2,9600	,786	,000		
-2,7500	,857	,000		
-2,6500	,929	,000		
-1,9750	1,000	,000		
-1,2500	1,000	,071		
-1,0400	1,000	,143		
-,9250	1,000	,214		
-,8500	1,000	,286		
-,5900	1,000	,357		
-,3950	1,000	,429		
-,1550	1,000	,500		
,2300	1,000	,571		
,4500	1,000	,643		
,5800	1,000	,714		
,6900	1,000	,786		
,8700	1,000	,857		
1,7750	1,000	,929		
3,5500	1,000	1,000		
a. En küçük cutoff değeri gözlenen minimum test değeri eksi 1 dir ve en büyük cutoff değeri gözlenen en büyük test değeri artı 1 dir. Diğer tüm cutoff değerleri gözlenen ardışık iki test değerinin ortalamasıdır.				



Şekil 3 miR-22 için ROC eğrisi

Tablo 11

miR-22 için AUC

Eğrinin Altındaki Alan				
Test Sonucu Değişkeni: miR-22				
Alan	Std Hata ^a	Asimetrik Anlamlılık ^b	Asemptomatik %95 Güven Aralığı	
			Alt Sınır	Üst Sınır
1,000	0,000	0,000	1,000	1,000

a: nonparametrik kabulün altında

b: Sıfır hipotezi: gerçek alan = 0,5

miR-140 sonuçları

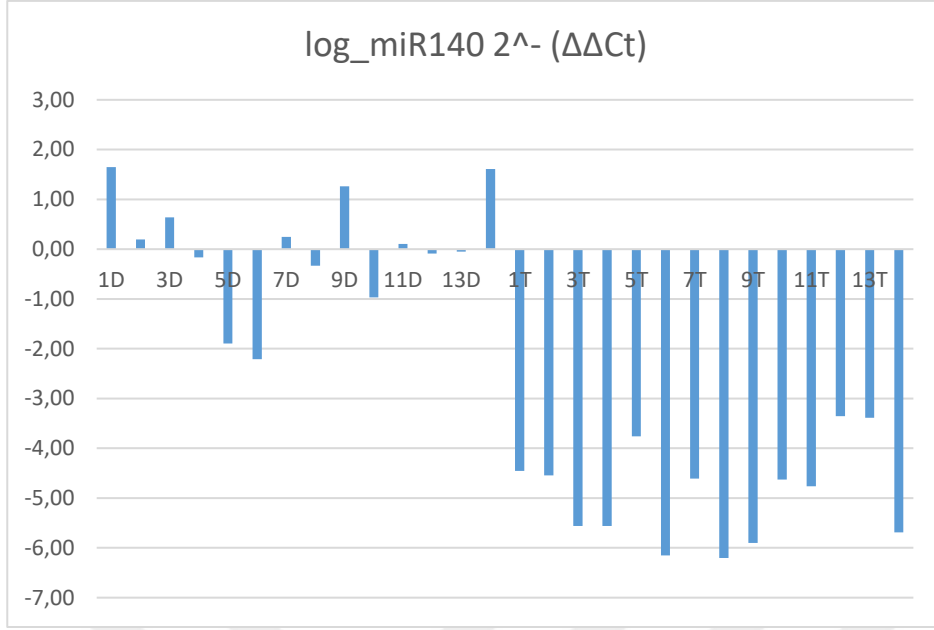
$\log_{2^{-}}(\Delta\Delta Ct)$ değerleri ele alındığında; sağlıklı doku için maksimum 1,70 ve minimum $-2,15$ olmak üzere ortanca değeri 0,78 olarak tespit edildi. Değerler arasında aralık 3,86 olarak bulundu. Tümör dokusu için elde edilen en yüksek değer $-3,30$, en düşük değer $-6,15$ ve ortanca değer ise $-2,85$ iken değerler arası aralık 2,85 bulunmuştur.

Tablo 12

Sağlıklı ve tümör dokusunda miR-140 değerleri

Numune No	MİRNA RNU6A Ct1	MİRNA RNU6A Ct2	MİRNA RNU6A Ct Mean	miR140 Ct1	miR140 Ct2	miR140 Ct Mean	miR140 ΔCt	miR140 $\Delta\Delta Ct$	miR140 $2^{-}(\Delta\Delta Ct)$	$\log_{2^{-}}(\Delta\Delta Ct)$
1D	28,01	28,57	28,29	25,31	25,27	25,29	-3,00	-1,703	3,25	1,70
2D	26,28	26,53	26,40	24,92	24,79	24,86	-1,55	-0,248	1,19	0,25
3D	26,08	26,20	26,14	24,12	24,17	24,15	-1,99	-0,691	1,61	0,69
4D	24,57	24,78	24,68	23,44	23,54	23,49	-1,18	0,116	0,92	-0,12
5D	24,51	24,83	24,67	24,86	25,57	25,21	0,54	1,843	0,28	-1,84
6D	23,68	24,37	24,02	24,93	24,84	24,89	0,86	2,159	0,22	-2,16
7D	30,68	30,23	30,46	28,84	28,88	28,86	-1,60	-0,299	1,23	0,30
8D	25,65	25,15	25,40	24,38	24,37	24,38	-1,02	0,279	0,82	-0,28
9D	25,18	25,32	25,25	22,68	22,60	22,64	-2,61	-1,313	2,48	1,31
10D	24,66	24,33	24,50	24,16	24,07	24,11	-0,38	0,915	0,53	-0,91
11D	24,38	24,77	24,58	23,20	23,04	23,12	-1,46	-0,156	1,11	0,16
12D	24,99	24,96	24,97	23,77	23,66	23,71	-1,26	0,039	0,97	-0,04
13D	24,93	24,00	24,46	23,30	23,03	23,17	-1,30	0,000	1,00	0,00
14D	24,77	24,88	24,82	21,93	21,79	21,86	-2,96	-1,664	3,17	1,66
1T	20,52	21,39	20,95	24,07	24,04	24,06	3,10	4,402	0,05	-4,40
2T	23,24	22,86	23,05	26,43	26,05	26,24	3,19	4,491	0,04	-4,49
3T	22,18	22,44	22,31	26,69	26,36	26,52	4,21	5,509	0,02	-5,51
4T	19,98	19,45	19,72	24,04	23,80	23,92	4,21	5,506	0,02	-5,51
5T	21,31	21,19	21,25	23,33	23,98	23,66	2,41	3,705	0,08	-3,70
6T	20,83	20,07	20,45	25,14	25,36	25,25	4,80	6,099	0,01	-6,10
7T	21,14	21,97	21,55	25,03	24,59	24,81	3,26	4,556	0,04	-4,56
8T	19,16	19,48	19,32	24,12	24,23	24,17	4,85	6,154	0,01	-6,15
9T	19,20	19,90	19,55	23,97	24,22	24,10	4,55	5,849	0,02	-5,85
10T	22,25	21,58	21,92	25,27	25,12	25,20	3,28	4,579	0,04	-4,58
11T	21,20	21,87	21,54	25,01	24,89	24,95	3,41	4,712	0,04	-4,71
12T	22,71	22,91	22,81	24,88	24,74	24,81	2,00	3,301	0,10	-3,30
13T	22,04	22,60	22,32	24,50	24,21	24,36	2,04	3,337	0,10	-3,34
14T	20,39	20,95	20,67	25,16	24,87	25,01	4,34	5,640	0,02	-5,64

D: sağlıklı doku, T: kanser dokusu



D: sağlıklı doku, T: kanserli doku

Şekil 4 miR-140'ın sağlıklı ve tümörlü dokudaki dağılımı

Patoloji sonuçları referans gruplama olarak alındı. miR-140 değerleri bu referans gruplama (patoloji gruplaması) ile ROC analizi aracılığıyla analiz edildi.

miR-140'ın değerleri sağlıklı ile kanserli dokuların sonuçları olarak kıyaslandı ve sonuçta AUC alanının anlamlı olduğu ($p < .05$), bu veri miR-140 sonuçlarının tanı koymak için kullanılabilir olduğunu gösterdi. Araştırma kapsamındaki veriler penceresinden bakıldığı "sensitivite" değerleri incelendiğinde -2,780 değerinin kesim noktası olarak kullanılabilceği belirlendi. ROC analizinin dışında miR-140 değerleri ile tanı koyabilmenin mümkünatı ek olarak Cluster Analizi kapsamında incelendi. Cluster analizi patoloji sonucunda sağlıklı doku örneklerine karşılık gelen miR-140 değerlerini bir grup, diğerlerini (kanserli) ise ayrı bir grup olarak tanımladı. Bu şekilde patoloji sonucu ile miR-140 sonuçlarının bire bir paralellik gösterdiği belirlendi.

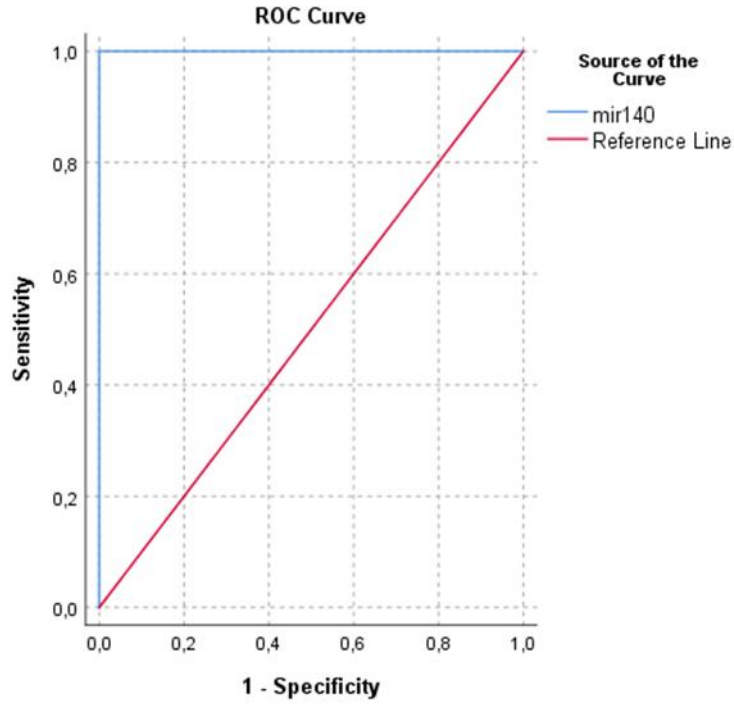
ROC analizinde grafikte kıyaslanan değer (miR-140) için çizilen çizgi (mavi renk) referans kabul edilen değer (patoloji sonucu-kanser dokusu) için çizilen çizgiden (kırmızı çizgi) ne kadar uzaklaşırsa o derece anlamlıdır. Ne kadar yaklaşılırsa tanı koymak için kullanılan yeni değerler uygunsuz anlamına gelmektedir. Çalışmamızın anlamlılığı yüksek

olduğundan miR-140 için çizilen mavi çizgi tablo için alınan referans değerlerden daha büyük olduğu için dış çerçeve şeklinde görünmektedir.

Tablo 13

miR-140 için sağlıklı ve kanserli dokuda ROC analizi

Test sonuçları Değişkenler: mir140			
To ^a ya eşit veya küçük iken pozitif	Sensitivite	1 -Spesifite	p
-7,2100	,000	,000	<0,0001
-6,1800	,071	,000	
-6,0250	,143	,000	
-5,7950	,214	,000	
-5,6250	,286	,000	
-5,1600	,429	,000	
-4,6950	,500	,000	
-4,6200	,571	,000	
-4,5750	,643	,000	
-4,4950	,714	,000	
-4,1050	,786	,000	
-3,5750	,857	,000	
-3,3700	,929	,000	
-2,7800	1,000	,000	
-2,0500	1,000	,071	
-1,4300	1,000	,143	
-,6500	1,000	,214	
-,2500	1,000	,286	
-,1300	1,000	,357	
-,0700	1,000	,429	
,0250	1,000	,500	
,1500	1,000	,571	
,2250	1,000	,643	
,4450	1,000	,714	
,9500	1,000	,786	
1,4350	1,000	,857	
1,6300	1,000	,929	
2,6500	1,000	1,000	
a. En küçük cutoff değeri gözlenen minimum test değeri eksi 1 dir ve en büyük cutoff değeri gözlenen en büyük test değeri artı 1 dir. Diğer tüm cutoff değerleri gözlenen ardışık iki test değerinin ortalamasıdır.			



Şekil 5 miR 140 için ROC eğrisi

Tablo 14

miR-140 için AUC

Eğrinin Altındaki Alan				
Test Sonucu Değişkeni: miR-140				
Alan	Std Hata ^a	Asimetrik Anlamlılık ^b	Asemptomatik %95 Güven Aralığı	
			Alt Sınır	Üst Sınır
1,000	0,000	0,000	1,000	1,000

a: nonparametrik kabulün altında
b: Sıfır hipotezi: gerçek alan = 0,5

miR-328 sonuçları

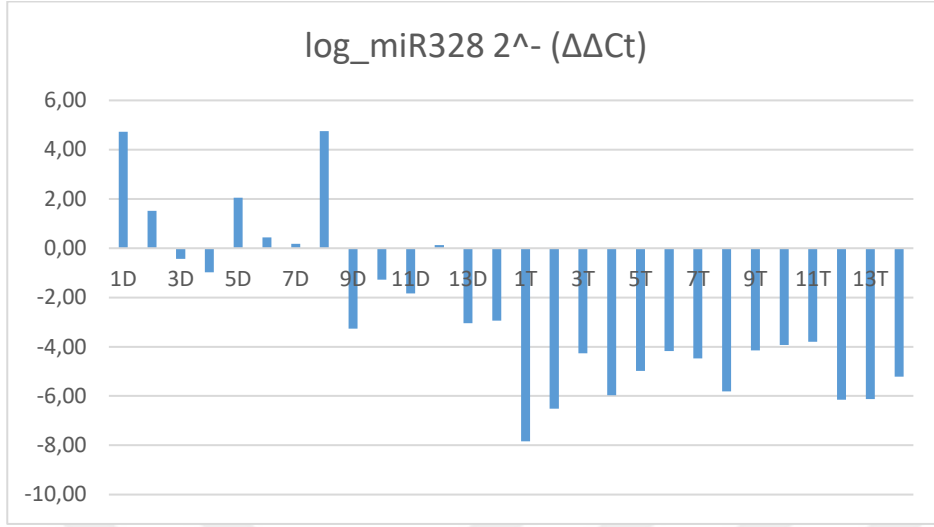
$\log_2 \text{miR328}^{2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}}$ değerleri ele alındığında; sağlıklı doku için maksimum 4,93 ve minimum $-3,18$ olmak üzere ortanca değeri 0,03 olarak tespit edildi. Değerler arasında aralık 8,07 olarak bulundu. Tümör dokusu için elde edilen en yüksek değer $-3,61$, en düşük değer $-7,64$ ve ortanca değer ise $-4,91$ iken değerler arası aralık 4,03 bulunmuştur.

Tablo 15

Sağlıklı ve tümör dokusunda miR-328 değerleri

Numune No	MİRNA RNU6A Ct1	MİRNA RNU6A Ct2	MİRNA RNU6A Ct Mean	miR328 Ct1	miR328 Ct2	miR328 Ct Mean	miR328 ΔCt	miR328 $\Delta\Delta\text{Ct}$	miR328 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	$\log_2 \text{miR328}^{2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}}$
1D	28,01	28,57	28,29	22,71	21,89	22,30	-5,99	-4,908	30,02	4,91
2D	26,28	26,53	26,40	23,40	23,82	23,61	-2,79	-1,709	3,27	1,71
3D	26,08	26,20	26,14	25,30	25,31	25,30	-0,83	0,251	0,84	-0,25
4D	24,57	24,78	24,68	24,67	24,10	24,39	-0,29	0,793	0,58	-0,79
5D	24,51	24,83	24,67	21,36	21,33	21,35	-3,32	-2,239	4,72	2,24
6D	23,68	24,37	24,02	22,16	22,48	22,32	-1,71	-0,623	1,54	0,62
7D	30,68	30,23	30,46	28,64	29,38	29,01	-1,44	-0,360	1,28	0,36
8D	25,65	25,15	25,40	19,23	19,52	19,37	-6,02	-4,940	30,69	4,94
9D	25,18	25,32	25,25	27,22	27,28	27,25	2,00	3,081	0,12	-3,08
10D	24,66	24,33	24,50	24,45	24,55	24,50	0,00	1,087	0,47	-1,09
11D	24,38	24,77	24,58	25,05	25,23	25,14	0,57	1,650	0,32	-1,65
12D	24,99	24,96	24,97	23,83	23,32	23,57	-1,40	-0,315	1,24	0,32
13D	24,93	24,00	24,46	26,03	26,44	26,23	1,77	2,853	0,14	-2,85
14D	24,77	24,88	24,82	26,60	26,38	26,49	1,67	2,752	0,15	-2,75
1T	20,52	21,39	20,95	28,05	26,99	27,52	6,56	7,648	0,00	-7,65
2T	23,24	22,86	23,05	29,12	27,47	28,30	5,25	6,330	0,01	-6,33
3T	22,18	22,44	22,31	25,73	24,88	25,31	2,99	4,076	0,06	-4,08
4T	19,98	19,45	19,72	24,39	24,43	24,41	4,69	5,774	0,02	-5,77
5T	21,31	21,19	21,25	24,96	24,96	24,96	3,71	4,798	0,04	-4,80
6T	20,83	20,07	20,45	22,36	24,35	23,35	2,90	3,984	0,06	-3,98
7T	21,14	21,97	21,55	24,43	25,07	24,75	3,20	4,280	0,05	-4,28
8T	19,16	19,48	19,32	23,36	24,37	23,86	4,54	5,628	0,02	-5,63
9T	19,20	19,90	19,55	22,67	22,19	22,43	2,88	3,963	0,06	-3,96
10T	22,25	21,58	21,92	25,07	24,06	24,56	2,65	3,734	0,08	-3,73
11T	21,20	21,87	21,54	24,14	24,00	24,07	2,53	3,613	0,08	-3,61
12T	22,71	22,91	22,81	28,26	27,11	27,68	4,87	5,956	0,02	-5,96
13T	22,04	22,60	22,32	26,85	27,49	27,17	4,85	5,937	0,02	-5,94
14T	20,39	20,95	20,67	22,91	26,33	24,62	3,95	5,029	0,03	-5,03

D: sağlıklı doku, T: kanser dokusu



D: sağlıklı doku, T: kanserli doku

Şekil 6 miR-328'in sağlıklı ve tümörlü dokudaki dağılımı

Patoloji sonuçları referans gruplama olarak alındı. miR-328 değerleri bu referans gruplama (patoloji gruplaması) ile ROC analizi aracılığıyla analiz edildi.

mir-328 patoloji sonuçları ile kıyaslandı ve sonuçta AUC alanının anlamlı olduğu ($p < .05$), mir 328 sonuçlarının tanı koymak için kullanılabilir olduğunu gösterdi. Araştırma kapsamındaki veriler penceresinden bakıldığı "sensitivite" değerleri incelendiğinde -3,535 değerinin kesim noktası olarak kullanılabilceği belirlendi. ROC analizinin dışında miR-328 değerleri ile tanı koyabilmenin mümkünatı ek olarak Cluster Analysis kapsamında incelendi. Cluster analiz patoloji sonucunda sağlıklı doku örneklerine karşılık gelen miR-328 değerlerini bir grup, diğerlerini ise ayrı bir grup olarak bire bir tanımlamadı. Patoloji sonucunda sağlıklı olarak tanılanmış 4 doku örneği Cluster analizde hasta grup içerisinde gösterildi. Cluster analiz için kesim noktası -1,87 olarak belirlendi.

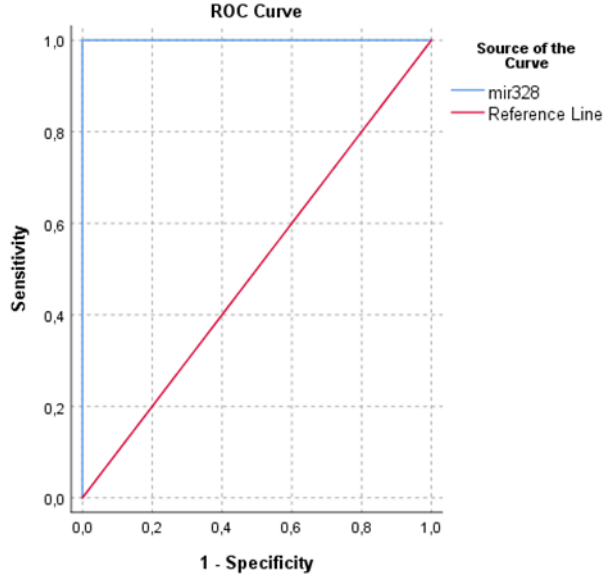
ROC analizinde grafikte kıyaslanan değer (miR-328) için çizilen çizgi (mavi renk) referans kabul edilen değer (patoloji sonucu-kanser dokusu) için çizilen çizgiden (kırmızı çizgi) ne kadar uzaklaşırsa o derece anlamlıdır. Ne kadar yaklaşırsa tanı koymak için kullanılan yeni değerler uygunsuz anlamına gelmektedir. Çalışmamızın anlamlılığı yüksek

olduğundan miR-328 için çizilen mavi çizgi tablo için alınan referans değerlerden daha büyük olduğu için dış çerçeve şeklinde görünmektedir.

Tablo 16

miR-328 için sağlıklı ve kanserli dokuda ROC analizi

Test sonuçları Değişkenler: mir328			
To ^a ya eşit veya küçük iken pozitif	Sensitivite	1 -Spesifite	p
-8,8400	,000	,000	<0,0001
-7,1800	,071	,000	
-6,3300	,143	,000	
-6,1300	,214	,000	
-6,0400	,286	,000	
-5,8900	,357	,000	
-5,5200	,429	,000	
-5,1050	,500	,000	
-4,7300	,571	,000	
-4,3650	,643	,000	
-4,2150	,714	,000	
-4,1600	,786	,000	
-4,0350	,857	,000	
-3,8600	,929	,000	
-3,5350	1,000	,000	
-3,1550	1,000	,071	
-2,9900	1,000	,143	
-2,3900	1,000	,214	
-1,5550	1,000	,286	
-1,1250	1,000	,357	
-,7100	1,000	,429	
-,1550	1,000	,500	
,1500	1,000	,571	
,3050	1,000	,643	
,9800	1,000	,714	
1,7850	1,000	,786	
3,3850	1,000	,857	
4,7350	1,000	,929	
5,7500	1,000	1,000	
a. En küçük cutoff değeri gözlenen minimum test değeri eksi 1 dir ve en büyük cutoff değeri gözlenen en büyük test değeri artı 1 dir. Diğer tüm cutoff değerleri gözlenen ardışık iki test değerinin ortalamasıdır.			



Şekil 7 miR-328 için ROC eğrisi

Tablo 17

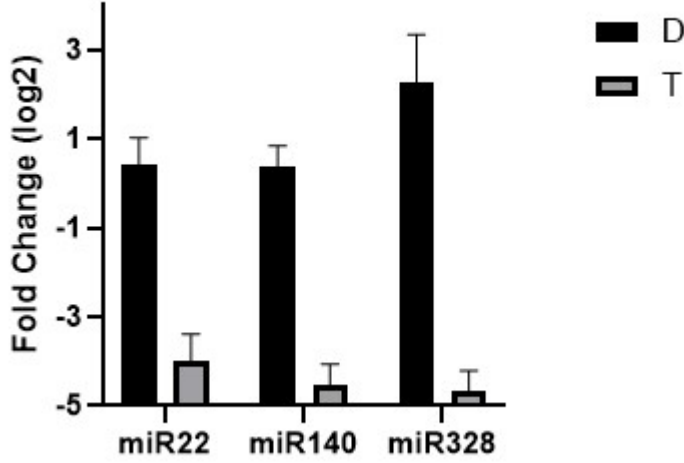
miR-328 için AUC

Eğrinin Altındaki Alan				
Test Sonucu Değişkeni: miR-328				
Alan	Std Hata ^a	Asimetrik Anlamlılık ^b	Aseptomatik %95 Güven Aralığı	
			Alt Sınır	Üst Sınır
1,000	0,000	0,000	1,000	1,000

a: nonparametrik kabulün altında

b: Sıfır hipotezi: gerçek alan = 0,5

miR-22, miR140 ve miR-328 değerlerinin sağlıklı ve kanserli doku değerlerinin karşılaştırılması



D: sağlıklı doku, T: kanserli doku

Şekil 8 miR-22, miR-140 ve miR-328'in sağlıklı ve tümörlü dokuda birbirlerine oranları

Tablo 18

Patoloji Sonuçlarına Göre miR-22, miR-140 ve miR-R328 karşılaştırmaları (T-Test)

Mikro RNA Türü	Patoloji Grup	N	Ortalama (S. Sapma)	T Değeri	P
miR-22	Sağlıklı	14	-0,0007(1,06)	10,523	<0,001
	Kanser	14	-4,5086(1,20)		
miR-140	Sağlıklı	14	0,000(1,14)	12,219	<0,001
	Kanser	14	-4,8971(0,97)		
miR-328	Sağlıklı	14	0,000(2,57)	6,903	<0,001
	Kanser	14	-5,2414(1,19)		

Tüm gruplarda sağlıklı dokuların miRNA'ları kanserli (tümör) dokuların miRNA'ları ile karşılaştırıldığında tümör dokusunda miRNA değerlerinde anlamlı downregülasyon ($p < 0,05$) tespit edilmiştir.

miR-22, miR-140 ve miR-328 değerlerinin PET/BT sonuçları ile karşılaştırılması

Hastaların kanserli dokularından elde edilen miRNA değerleri ile yine kanserli (tümör) dokularından elde edilen PET/BT değerleri korelasyon açısından değerlendirildi.

Tablo 19

miR-22, miR-140 ve miR-328 ile PET/BT sonuçları arasındaki korelasyon

	miR-22	miR-140	miR-328	PET/BT
miR-22	1			
miR-140	0,429	1		
miR-328	0,012	-0,341	1	
PET/BT	0,049	-0,175	-0,219	1

N=14, *p<.05

Pearson korelasyon analiz sonuçlarına göre miR-22, miR-140 ve miR-328 ile PET/BT sonuçları arasında anlamlı ilişkiler belirlenememiştir (p>0.05).

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Tartışma

Tarafımızca meme kanserinde sağlıklı dokuda ve kanserli dokuda miR-22, miR-140 ve miR-328 değerlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişim ile PET/BT ile ölçülen ve SUV_{max} değeri ile ifade edilen meme kanseri metabolik aktivitesi ile miRNA arasında korelasyon varlığı üzerine literatürde herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Çalışmamız bu ilişkinin varlığını araştırmak üzere kurgulanmıştır.

Kanser hücrelerinin normal hücrelerden ayrılmasında geleneksel görüntüleme yöntemlerinin yanı sıra biyolojik markır da kullanılmaktadır (Çelik vd., 2019). Onkolojik hastalığın erken tanısında kanser türüne özgü olan ve hasta serumunda bulunan tümör markırları kullanılsa da spesifite ve sensitivitede kısıtlılık nedeni ile erken tanıda arzulanan sonuca ulaşamamıştır, bu nedenle de rutin kullanıma girmemiştir (Çelik vd., 2019).

Son dönemde miRNA'lar meme kanserinde hücre çoğalması, invazyon, anjiogenez ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Kanserler tümör supresör miRNA'ların delesyonu veya azalması ile veya onkojenik miRNA'ların amplifikasyonu veya overekspresyonu ile oluşabilir (Tang vd., 2012). Meme kanseri metastazı da prometastatik miRNA'ların artmış ekspresyonu ile veya anti-metastatik olanların downregülasyonu ile kolaylaşabilir (Tang vd., 2012). Bu veriler miRNA'ların tanıyı kolaylaştırmada, prognozu öngörmede ve tedaviye yanıtı öngörmede olduğu kadar tedavi için de hedef olabileceğini öne çıkarmaktadır (Tang vd., 2012).

Çalışmamıza dahil edilen miR-22, miR-140 ve miR-328 için literatür ile uyumlu olacak şekilde downregülasyon yönünde sonuçlar elde edilmiştir.

miR-22 değerleri literatürde meme kanserinde downregüle olarak bildirilmiştir (Patel vd., 2011), klinik olarak bu downregülasyon metastaz kolaylığı açısından da önem taşımaktadır (Shao vd., 2019). Bizim çalışmamızda da miR-22 ekspresyonunun tümör dokusunda sağlıklı dokuya göre anlamlı derecede downregüle olduğu bulunmuştur. Ayrıca çalışma grubumuz için ROC analizinde "sensitivite" değerleri incelendiğinde -1,975 olarak bulunmuştur ve Cluster Analizi ile de bizim grubumuzda tanısal değere sahip olduğu belirlenmiştir.

Shahabi ve ark. tarafından yapılan çalışmada miR-140 ekspresyonunun meme kanserinde downregüle olduğu gösterilmiştir (Shahabi vd., 2020). Yine literatürde miR-140 downregülasyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zhou vd., 2019). Bizim çalışmamızda da miR-140 ekspresyonunun tümör dokusunda sağlıklı dokuya göre anlamlı derecede downregüle olduğu bulunmuştur. Çalışma sonuçlarımız miR-140 için ROC analizinde “sensitivite” değerleri -2,780 olarak tespit edilmiştir, Cluster analizi de çalışma grubumuz için tanı koyma için anlamlı olarak yorumlamıştır.

miR-328 için yapılan çalışmalarda meme kanserinde downregüle olduğu bulunmuştur (Al-Momany vd., 2021). Bu bulgular çalışmamız ile uyumludur. ROC analizi ile incelendiğinde sensitivitesi -3,535 olarak bulunmuştur, bu değer de çalışmamızı anlamlı kılmaktadır.

Glukozun hücre içine taşınmasında yer alan GLUT1 proteinin ekspresyonu çalışmamızda kullanılan miR-22, miR140 ve miR328 tarafından etkilenmektedir (He vd., 2019, Yi vd., 2020, Chen vd., 2015). Kanserde artan glukoz metabolizması; artan glikolize, ifade edilen GLUT1, glukoz-6-fosfataz vb faktörlerin düzeylerine bağlıdır ve birkaç kanser türü ile de korele bulunmuştur, FDG uptake değerleri GLUT'lar ile korele bulunmuş olmakla birlikte GLUT1 düzeyleri ile FDG tutulumu arasında korelasyon olmadığını belirten çalışmalarda vardır (Basu vd., 2014). FDG tutulumu ile proteinler arasındaki ilişkiye yönelik bulunan sonuçların çalışmalar arasında farklılık göstermesi kanser türleri arasındaki heterojeniteye bağlı olabileceği ve FDG tutulumunun tek bir proteindense birkaç proteinin etkileşiminden etkilenebileceği sonucuna yönlendirmektedir (Basu vd., 2014; Tixier vd., 2014; Tixier vd., 2011). FDG/PET palpable meme kitlelerinde duyarlılığını ispatlamış bir yöntemdir (Kumar vd., 2006), bu nedenle çalışmamıza PET/BT ölçümü yapılan hastalar dahil edildi. Bu nedenlerden dolayı miRNA'ların sağlıklı ve kanserli dokulardaki değişimleri ile PET/BT arasında ilişki olup olmadığını araştırmak istedik. Ancak yaptığımız çalışmada kanserli dokulardaki SUV_{max} değerlerini sağlıklı doku verisi ile karşılaştırdığımızda elde edilen sonuç anlamlı olsa dahi miRNA'lar ile korelasyon göstermediğini tespit ettik.

miRNA ile PET/BT değerlerinin korele çıkmamasının nedenleri arasında; rehberler PET/BT'nin evre III meme kanserinde kullanılmasını önermekle birlikte bazı çalışmalar evre IIB de de kullanılabilirliğini belirtmektedir (Paydary vd., 2019). SUV_{max} değeri hem tümörün malignite derecesi ile hem de lezyonun boyutu ile ilişkilidir (Zhang vd., 2021).

Çalışmamıza dahil 14 hastadan birer tane evre IIB ve IIIB hasta vardı, diğer hastalarımız erken evre meme kanseri idi.

SUV değerleri hastanın vücut kitle endeksi, kan glukoz konsantrasyonu gibi durumlardan etkilenmekle birlikte ölçümde kullanılan cihazların, donanımların farkından, çalışma yöntemlerinin farkından ve tercih edilen rekonstrüksiyon algoritmasından da etkilenir. Bu nedenle benign ve malign dokulardaki SUV_{max} değerleri arasında PET merkezleri arasında anlamlı farklılıklar olabilir (Zhang vd., 2021). Ayrıca elde edilen SUV değerleri meme dokusunun yoğunluğundan doğrudan etkilenmektedir, meme yoğunluğu arttıkça SUV değeri de artmaktadır (Kumar vd., 2006).

Şu an kanser tanısı koymada ve tedavi takibinde tek başına yeterli bir yöntem yoktur (Çelik vd., 2019). Ancak kanser şüphesi olan hastalarda kanser türüne spesifik miRNA bakılarak hedefe yönelik ileri araştırmalar yapılabilir.

5.2. Sonuç

Meme kanseri dünyada en sık görülen kanser türlerinden biridir. Yüksek metabolik faaliyeti nedeni ile artmış glukoz alımı kanser hücrelerinin büyümesinde önemli bir rol oynar.

Küçük düzenleyici RNA molekülleri olan mikroRNA'lar gen ekspresyonuna post transkripsiyonel olarak etkiler. Onkojenik ve onkosupresör olarak görev alırlar. miRNA'lar hücre metabolizması üzerine etkileri arasında glukoz transporter proteinleri (GLUT) üzerinden de etkisi vardır.

miR-22, miR-140 ve miR-328'in GLUT1 ekspresyonuna etkisi vardır, ayrıca onkosupresör olduklarından meme kanserinde downregüle olmaktadır.

PET/BT hücresel metabolik aktivitenin ölçümü ile tomografik görüntülerin korelasyonu prensibi ile çalışır. Kanser hücrelerinin metabolik faaliyeti arttığı için PET/PT de glukoz muadili olan 18-FDG tutulum artmakta ve böylelikle dokunun metabolik faaliyeti hakkında bilgi edinilebilmektedir.

Kanserli dokudaki miRNA değişimlerinin GLUT proteinlerine de etki eder. Tümör dokusuna 18-FDG alımı üzerine etki edebileceği ve dolayısı ile kanserli dokudaki miRNA değişimi ile PET/BT den elde edilen SUV_{max} değerleri arasında korelasyon olabileceği düşünölmüştür.

Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak miR-22, miR-140 ve miR328 değerleri kanserli dokuda normal doku ile kıyaslandığında anlamlı downregüle bulunmuştur. Ancak çalışılan miRNA'lardaki sağlıklı ve kanserli dokular arasında görölen değişim ile kanserli dokulara ait SUV_{max} değerleri arasında anlamlı korelasyon tespit edilememiştir.

miRNA'lar tükürük, kan, gaita, parafin blok ve dokudan analiz edilebilmektedir. miRNA'lar çeşitli tümörlere spesifik olarak gruplandırıldığında tümör markırları gibi kanser takibinde ve hatta şüphe anında tanı doğrulamada kullanım potansiyeline sahip bir parametre olabileceği düşünölebilmektedir.

KAYNAKÇA

- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., ve Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 50 (1), 1-23.
- Al-Momany, B., Hammad, H., veAhram, M. (2021). Dihydrotestosterone Induces Chemo-Resistance of Triple-Negative Breast MDA-MB-231 Cancer Cells Towards Doxorubicin Independent of ABCG2 and miR-328-3p. *Curr Mol Pharmacol*, 14 (5), 860-870.
- Alanazi, I. O., ve Khan, Z. (2016). Understanding EGFR Signaling in Breast Cancer and Breast Cancer Stem Cells: Overexpression and Therapeutic Implications. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17 (2), 445-453.
- Ali, R., ve Wendt, M. K. (2017). The paradoxical functions of EGFR during breast cancer progression. *Signal Transduct Target Ther*, 2, 16042-.
- Ali Syeda, Z., Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M., ve Song, S. J. (2020). Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *Int J Mol Sci*, 21 (5).
- Ameres, S. L., veZamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14 (8), 475-488.
- Appert-Collin, A., Hubert, P., Crémel, G., veBennasroune, A. (2015). Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front Pharmacol*, 6, 283.
- Armitage, P., ve Doll, R. (2004). The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer*, 91 (12), 1983-1989.
- Aza-Blanc, P., Cooper, C. L., Wagner, K., Batalov, S., Deveraux, Q. L., ve Cooke, M. P. (2003). Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Mol Cell*, 12 (3), 627-637.
- Balmaña, J., Díez, O., Rubio, I. T., ve Cardoso, F. (2011). BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*, 22 Suppl 6, vi31-34. doi:10.1093/annonc/mdr373
- Basu, S., Hess, S., Nielsen Braad, P. E., Olsen, B. B., Inglev, S., veHøilund-Carlsen, P. F. (2014). The Basic Principles of FDG-PET/CT Imaging. *PET Clin*, 9 (4), 355-370, v.

- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., ve Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409 (6818), 363-366.
- Berti, F. C. B., Salviano-Silva, A., Beckert, H. C., de Oliveira, K. B., Cipolla, G. A., veMalheiros, D. (2019). From squamous intraepithelial lesions to cervical cancer: Circulating microRNAs as potential biomarkers in cervical carcinogenesis. *BiochimBiophys Acta Rev Cancer*, 1872 (2), 188306.
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., veGorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*, 10 (2), 185-191.
- Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A., veSwerdlow, A. J. (2017). Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat*, 165 (1), 193-200.
- Chang, J. C., veKundranda, M. (2017). Novel Diagnostic and Predictive Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci*, 18 (3).
- Chen, B., Liu, Y., Jin, X., Lu, W., Liu, J., Xia, Z., . . . Liang, S. (2014). MicroRNA-26a regulates glucose metabolism by direct targeting PDHX in colorectal cancer cells. *BMC Cancer*, 14, 443.
- Chen, B., Tang, H., Liu, X., Liu, P., Yang, L., Xie, X., . . . Wei, W. (2015). miR-22 as a prognostic factor targets glucose transporter protein type 1 in breast cancer. *Cancer Lett*, 356 (2 Pt B), 410-417.
- Chen, L., Heikkinen, L., Wang, C., Yang, Y., Sun, H., ve Wong, G. (2019). Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Brief Bioinform*, 20 (5), 1836-1852.
- Chen, Y., ve Olopade, O. I. (2008). MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8 (10), 1689-1698.
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., veShiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436 (7051), 740-744.
- Clemmesen, J. (1948). Carcinoma of the breast; results from statistical research. *Br J Radiol*, 21 (252), 583-590.

- Coleman, M. P., Quaresma, M., Berrino, F., Lutz, J. M., De Angelis, R., Capocaccia, R., . . . Young, J. L. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol*, 9 (8), 730-756.
- Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., veFoti, M. (2019). Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci*, 20 (24).
- Çelik, F., Tan, Y. Z., Özdemir, S., veSılan, F. (2019). Comparison of SUV (max) Values Obtained from F-18 FDG PET/CT and Cell-free DNA Levels Measured from Plasma in Oncology Patients. *Mol Imaging RadionuclTher*, 28 (2), 46-52.
- Deng, C. X. (2006). BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res*, 34 (5), 1416-1426.
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., ve Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432 (7014), 231-235.
- Dine, J., ve Deng, C. X. (2013). Mouse models of BRCA1 and their application to breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev*, 32 (1-2), 25-37.
- Ebert, M. S., ve Sharp, P. A. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149 (3), 515-524.
- Edge, S. B., ve Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17 (6), 1471-1474.
- Fang, Z., Yin, S., Sun, R., Zhang, S., Fu, M., Wu, Y., . . . Li, Y. (2017). miR-140-5p suppresses the proliferation, migration and invasion of gastric cancer by regulating YES1. *Mol Cancer*, 16 (1), 139.
- Fernández-Medarde, A., ve Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*, 2 (3), 344-358.
- Finnegan, E. F., & Pasquinelli, A. E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48(1), 51-68.

- Ganapathy, V., Thangaraju, M., ve Prasad, P. D. (2009). Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *PharmacolTher*, 121 (1), 29-40.
- Gleason, M. X., Mdzinarishvili, T., ve Sherman, S. (2012). Breast cancer incidence in black and white women stratified by estrogen and progesterone receptor statuses. *PLoS One*, 7 (11), e49359.
- Gorospe, L., Raman, S., Echeveste, J., Avril, N., Herrero, Y., veHernaNdez, S. (2005). Whole-body PET/CT: spectrum of physiological variants, artifacts and interpretative pitfalls in cancer patients. *NuclMed Commun*, 26 (8), 671-687.
- Grabellus, F., Sheu, S. Y., Bachmann, H. S., Lehmann, N., Otterbach, F., Heusner, T. A., . . . Stahl, A. R. (2010). The XbaI G>T polymorphism of the glucose transporter 1 gene modulates 18F-FDG uptake and tumor aggressiveness in breast cancer. *J Nucl Med*, 51 (8), 1191-1197.
- Green, A. R., Aleskandarany, M. A., Agarwal, D., Elsheikh, S., Nolan, C. C., Diez-Rodriguez, M., . . . Rakha, E. A. (2016). MYC functions are specific in biological subtypes of breast cancer and confers resistance to endocrine therapy in luminal tumours. *Br J Cancer*, 114 (8), 917-928.
- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., veShiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432 (7014), 235-240.
- Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Lainé, S., Sack, R., Gatignol, A., veFilipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep*, 6 (10), 961-967.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., Rhee, J. K., . . . Kim, V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125 (5), 887-901.
- Harbeck, N., ve Gnant, M. (2017). Breast cancer. *Lancet*, 389 (10074), 1134-1150.
- He, Y., Deng, F., Zhao, S., Zhong, S., Zhao, J., Wang, D., . . . Zhou, Z. (2019). Analysis of miRNA-mRNA network reveals miR-140-5p as a suppressor of breast cancer glycolysis via targeting GLUT1. *Epigenomics*, 11 (9), 1021-1036.

- Horn, J., Åsvold, B. O., Opdahl, S., Tretli, S., veVatten, L. J. (2013). Reproductive factors and the risk of breast cancer in old age: a Norwegian cohort study. *Breast cancer research and treatment*, 139 (1), 237-243.
- Hussein, Y. R., Bandyopadhyay, S., Semaan, A., Ahmed, Q., Albashiti, B., Jazaerly, T., . . . Ali-Fehmi, R. (2011). Glut-1 Expression Correlates with Basal-like Breast Cancer. *Transl Oncol*, 4 (6), 321-327.
- Jung, M., Russell, A. J., Liu, B., George, J., Liu, P. Y., Liu, T., . . . Henderson, M. J. (2017). A Myc Activity Signature Predicts Poor Clinical Outcomes in Myc-Associated Cancers. *Cancer Res*, 77 (4), 971-981.
- Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Travis, R. C., Alberg, A. J., Barricarte, A., . . . Vineis, P. (2013). Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol*, 14 (10), 1009-1019.
- Khvorova, A., Reynolds, A., ve Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115 (2), 209-216.
- Kim, A., Jang, M. H., Lee, S. J., ve Bae, Y. K. (2017). Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer*, 20 (2), 150-159.
- Kim, V. N., Han, J., veSiomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (2), 126-139.
- Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K. A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M. J., . . . Olsson, H. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Jama*, 317 (23), 2402-2416.
- Kumar, R., Chauhan, A., Zhuang, H., Chandra, P., Schnall, M., veAlavi, A. (2006). Standardized uptake values of normal breast tissue with 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D: -glucose positron emission tomography: variations with age, breast density, and menopausal status. *Mol Imaging Biol*, 8 (6), 355-362.

- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., veTuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294 (5543), 853-858.
- Landthaler, M., Yalcin, A., ve Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*, 14 (23), 2162-2167.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., veAmbros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75 (5), 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., . . . Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425 (6956), 415-419.
- Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., veCarthew, R. W. (2004). Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117 (1), 69-81.
- Li, Q., Yao, Y., Eades, G., Liu, Z., Zhang, Y., ve Zhou, Q. (2014). Downregulation of miR-140 promotes cancer stem cell formation in basal-like early stage breast cancer. *Oncogene*, 33 (20), 2589-2600.
- Li, Z., Gong, X., Zhang, W., Zhang, J., Ding, L., Li, H., . . . Tang, J. (2019). Inhibition of miRNA-34a promotes triple negative cancer cell proliferation by promoting glucose uptake. *Exp Ther Med*, 18 (5), 3936-3942.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., veKutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303 (5654), 95-98.
- Ma, H., Liu, T., Xu, Y., Wang, X., Wang, J., ve Liu, X. (2020). MiR-519d and miR-328-3p Combinatorially Suppress Breast Cancer Progression. *Onco Targets Ther*, 13, 12987-12997.
- Macheda, M. L., Rogers, S., ve Best, J. D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*, 202 (3), 654-662.
- Majeed, W., Aslam, B., Javed, I., Khaliq, T., Muhammad, F., Ali, A., ve Raza, A. (2014). Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (8), 3353-3358.

- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., . . . Easton, D. F. (2013). Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst*, 105 (11), 812-822.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., . . . vd. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266 (5182), 66-71.
- Moses, W. W. (2011). Fundamental Limits of Spatial Resolution in PET. *NuclInstrum Methods Phys Res A*, 648 Supplement 1, S236-s240.
- Nelson, C. A., Wang, J. Q., Leav, I., ve Crane, P. D. (1996). The interaction among glucose transport, hexokinase, and glucose-6-phosphatase with respect to 3H-2-deoxyglucose retention in murine tumor models. *Nucl Med Biol*, 23 (4), 533-541.
- Pandey, A. K., Zhang, Y., Zhang, S., Li, Y., Tucker-Kellogg, G., Yang, H., ve Jha, S. (2015). TIP60-miR-22 axis as a prognostic marker of breast cancer progression. *Oncotarget*, 6 (38), 41290-41306.
- Pase, L., Layton, J. E., Kloosterman, W. P., Carradice, D., Waterhouse, P. M., ve Lieschke, G. J. (2009). miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target *gata2*. *Blood*, 113 (8), 1794-1804.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., . . . Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408 (6808), 86-89.
- Patel, J. B., Appaiah, H. N., Burnett, R. M., Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Mehta, R., . . . Nakshatri, H. (2011). Control of EVI-1 oncogene expression in metastatic breast cancer cells through microRNA miR-22. *Oncogene*, 30 (11), 1290-1301.
- Paydary, K., Seraj, S. M., Zadeh, M. Z., Emamzadehfard, S., Shamchi, S. P., Gholami, S., . . . Alavi, A. (2019). The Evolving Role of FDG-PET/CT in the Diagnosis, Staging, and Treatment of Breast Cancer. *Mol Imaging Biol*, 21 (1), 1-10.
- Pronina, I. V., Loginov, V. I., Burdenny, A. M., Fridman, M. V., Senchenko, V. N., Kazubskaya, T. P., . . . Braga, E. A. (2017). DNA methylation contributes to

- deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene*, *604*, 1-8.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., ve Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*, *11* (11), 761-774.
- Ray, A., ve Ray, B. K. (2015). Induction of Ras by SAF-1/MAZ through a feed-forward loop promotes angiogenesis in breast cancer. *Cancer Med*, *4* (2), 224-234.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., . . . Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *403* (6772), 901-906.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., ve Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, *14* (10a), 1902-1910.
- Santanusagna, S., Moreno, I., Navarro, A., Muñoz, C., Martinez, F., Hernández, R., . . . Monzo, M. (2018). miR-328 mediates a metabolic shift in colon cancer cells by targeting SLC2A1/GLUT1. *Clin Transl Oncol*, *20* (9), 1161-1167.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., ve Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, *115* (2), 199-208.
- Shahabi, A., Naghili, B., Ansarin, K., Montazeri, V., ve Zarghami, N. (2020). miR-140 and miR-196a as Potential Biomarkers in Breast Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, *21* (7), 1913-1918.
- Shao, Y., Yao, Y., Xiao, P., Yang, X., ve Zhang, D. (2019). Serum miR-22 Could be a Potential Biomarker for the Prognosis of Breast Cancer. *Clin Lab*, *65* (4).
- Siegel, R. L., Miller, K. D., ve Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, *67* (1), 7-30.
- Siewertsz van Reesema, L. L., Lee, M. P., Zheleva, V., Winston, J. S., O'Connor, C. F., Perry, R. R., . . . Tang, A. H. (2016). RAS pathway biomarkers for breast cancer prognosis. *Clin Lab Int*, *40*, 18-23.
- Siomi, H., ve Siomi, M. C. (2010). Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell*, *38* (3), 323-332.

- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., . . . Zhu, H. P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, 13 (11), 1387-1397.
- Szablewski, L. (2013). Expression of glucose transporters in cancers. *BiochimBiophys Acta*, 1835 (2), 164-169.
- Tang, J., Ahmad, A., ve Sarkar, F. H. (2012). The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis. *Int J Mol Sci*, 13 (10), 13414-13437.
- Tixier, F., Hatt, M., Valla, C., Fleury, V., Lamour, C., Ezzouhri, S., . . . Le Rest, C. C. (2014). Visual versus quantitative assessment of intratumor 18F-FDG PET uptake heterogeneity: prognostic value in non-small cell lung cancer. *J Nucl Med*, 55 (8), 1235-1241.
- Tixier, F., Le Rest, C. C., Hatt, M., Albarghach, N., Pradier, O., Metges, J. P., . . . Visvikis, D. (2011). Intratumor heterogeneity characterized by textural features on baseline 18F-FDG PET images predicts response to concomitant radiochemotherapy in esophageal cancer. *J Nucl Med*, 52 (3), 369-378.
- Vesuna, F., Lisok, A., van Diest, P., ve Raman, V. (2021). Twist activates miR-22 to suppress estrogen receptor alpha in breast cancer. *Mol Cell Biochem*, 476 (6), 2295-2306.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., . . . Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378 (6559), 789-792.
- Xiao, B., Chen, D., Zhou, Q., Hang, J., Zhang, W., Kuang, Z., . . . Li, L. (2019). Glutamate metabotropic receptor 4 (GRM4) inhibits cell proliferation, migration and invasion in breast cancer and is regulated by miR-328-3p and miR-370-3p. *BMC Cancer*, 19 (1), 891.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., . . . Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2 (5), E104.
- Yamada, T., Uchida, M., Kwang-Lee, K., Kitamura, N., Yoshimura, T., Sasabe, E., ve Yamamoto, T. (2012). Correlation of metabolism/hypoxia markers and

- fluorodeoxyglucose uptake in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 113 (4), 464-471.
- Yeom, K. H., Lee, Y., Han, J., Suh, M. R., ve Kim, V. N. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res*, 34 (16), 4622-4629.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., ve Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17 (24), 3011-3016.
- Yi, W., Tu, M. J., Liu, Z., Zhang, C., Batra, N., Yu, A. X., ve Yu, A. M. (2020). Bioengineered miR-328-3p modulates GLUT1-mediated glucose uptake and metabolism to exert synergistic antiproliferative effects with chemotherapeutics. *Acta Pharm Sin B*, 10 (1), 159-170.
- Zang, Z., Guan, W., Chen, D., Han, Y., Shi, Z., ve Zhou, J. (2016). Association Between microRNA-125a rs12976445 C>T Polymorphism and 18F-Fluorodeoxyglucose (18FDG) Uptake: Clinical and Metabolic Response in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Med Sci Monit*, 22, 4186-4192.
- Zeng, Y., ve Cullen, B. R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*, 32 (16), 4776-4785.
- Zhang, D., LaFortune, T. A., Krishnamurthy, S., Esteva, F. J., Cristofanilli, M., Liu, P., . . . Ueno, N. T. (2009). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor reverses mesenchymal to epithelial phenotype and inhibits metastasis in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res*, 15 (21), 6639-6648.
- Zhang, J., Shi, X., Xiao, Y., Ma, C., Cao, G., Liu, Y., ve Li, Y. (2021). Early SUV (max) is the best predictor of axillary lymph node metastasis in stage III breast cancers. *Quant Imaging Med Surg*, 11 (5), 1680-1691.
- Zhou, Y., Wang, B., Wang, Y., Chen, G., Lian, Q., ve Wang, H. (2019). miR-140-3p inhibits breast cancer proliferation and migration by directly regulating the expression of tripartite motif 28. *Oncol Lett*, 17 (4), 3835-3841.
- Zhuang, H. M., Cortés-Blanco, A., Pourdehnad, M., Adam, L. E., Yamamoto, A. J., Martínez-Lázaro, R., . . . Alavi, A. (2001). Do high glucose levels have differential

effect on FDG uptake in inflammatory and malignant disorders? *Nucl Med Commun*, 22 (10), 1123-1128.



EKLER

EK1 Etik kurul Onayı



EK 1
ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : E-18920478-050.01.04-2100204151
Konu : Başvuru İncelemesi(Doç. Dr. Meliha
Merve ÇİÇEKLİYURT)

22.10.2021

Sayın Doç. Dr. Meliha Merve ÇİÇEKLİYURT

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Meme kanserinde 18-FDG PET/BT sonucu ile dokudaki miR-22, miR-328-3p ve miR-140 mikro RNA'larının ekspresyonlarının korelasyonlarının araştırılması" başlıklı 2011-KAEK-27/2021-2100142473 no' lu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 20.10.2021 tarih ve 07-26 no' lu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

Karar Tarihi : 20.10.2021
Karar No : 2021-07

Karar-26) 2011-KAEK-27/2021-2100142473 no' lu araştırma Etik Kurul üyeleri tarafından değerlendirilmiştir. Yardımcı araştırmacı Dr. Öğr. Üyesi O N G' nin sunumunun dinlenmesinin ve raportörün hazırladığı değerlendirmenin okunması sonrasında yapılan oylamada "**ETİK KURUL ONAYINI ALIR.**" Kararı verilmiştir.