

BÖLÜM 10

PROSTAT KANSERİNDE TANISAL BİYOBELİRTEÇLER OLARAK SİRKÜLE miRNA'LARIN ROLÜ

Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK¹

1. GİRİŞ

Prostat kanseri (PKa), erkek kanserine bağlı ölümlerin ikinci en yaygın nedenidir (1). Birleşik Krallık'ta her yıl teşhis edilen 40.000'den fazla vaka ile Batı dünyasında en sık teşhis edilen erkek kanseridir (2). Beyaz popülasyondaki vakalarla karşılaştırıldığında, siyah erkeklerde prostat kanseri insidansı yaklaşık %60 daha yüksekken, yerli Japon ve Çinli popülasyonlarda insidans ve mortalite riski düşüktür (3). GLOBOCAN 2018 verilerine göre, Türkiye' deki erkeklerde 118.882 yeni kanser vakasının %14,6' sını PKa oluşturmaktadır (4). Prostat kanseri, dünya çapında her yıl 1 milyondan fazla erkekte teşhis edilmektedir ve görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır (2, 5). Prostat kanserinin oluşumu ve mortalitesi, sanayileşmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre 20 kata kadar daha fazladır. Bu nedenle diyet ve yaşam tarzının bu değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, beslenme ve egzersizsiz büyümeyi yavaşlatan ve androjen bağımlı PKa hücrelerinde apoptozu indükleyen faktörleri değiştirirken, yüksek vücut kitle indeksi, yüksek kan basıncı ve metabolik faktörlerin ölüm riski ile korele olduğu bulunmuştur (5).

Prostat kanserinin patolojik tanısı, genellikle yüksek serum prostat spesifik antijen (PSA) seviyeleri ve/veya dijital rektal muayene (DRE) ile yönlendirilen transrektal ultrason kılavuzluğunda biyopsi ile elde edilmektedir (1,6). Erken evre prostat kanserinin tespit oranını artırmak için etkili biyobelirteçler geliştirme amaçlı birçok araştırma yapılmıştır. Şu anda, prostat kanserini saptamak için kullanılan en yaygın araç serum prostat spesifik antijen (PSA) ölçümüdür (6, 7). Her halükarda, daha yüksek bir PSA seviyesi PKa'nın varlığını göstermesine rağmen, düşük PSA seviyelerine sahip birçok hastanın bu tip kanser geliştirdiği bulunmuştur (8). PSA taramaları prostat kanserinin ölüm oranını azaltmış olsa da, yüksek serum PSA seviyeleri çeşitli klinik sorunlarla ilişkilidir (6, 9). PSA, benign prostat hiperplazisi (BPH), idrar retansiyonu, prostatit, travma ve fiziksel manipülasyon

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, kuyasozturk@sdu.edu.tr

dahil olmak üzere diğer birçok durumda yükseldiği için bu malignite için spesifik değildir (5, 10). Prostat kanseri tanısı için, özellikle PSA 4-10 ng/ml (“gri bölge”) olan hastalarda, sitolojik veya histopatolojik doğrulama gereklidir. Bu nedenle, cerrahi veya farmakolojik tedavi gören hastalarda gerçek bir gereklilik olmaksızın bazen aşırı teşhis ve tedavi ortaya çıkmaktadır (5, 7). Bu nedenle, PKa'nin yönetimi, teşhis, prognoz ve tedavi yanıtı için güvenilir yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmuştur (2). Bu amaçla üzerinde en çok çalışılan biyobelirteç adayları mikroRNA'lar (miRNA) olmuştur. Yapılan çalışmalarda, dolaşımdaki miRNA'lar, PKa'nin tanı ve prognozu açısından potansiyel yeni biyobelirteçler olarak önerilmektedir (11). miRNA'lar kansere katkıda bulunan önemli hücresel süreçleri/yolakları modüle etmesi ve vücut sıvılarında stabil bir şekilde bulunması gibi özellikleri açısından ön plana çıkmaktadır (12).

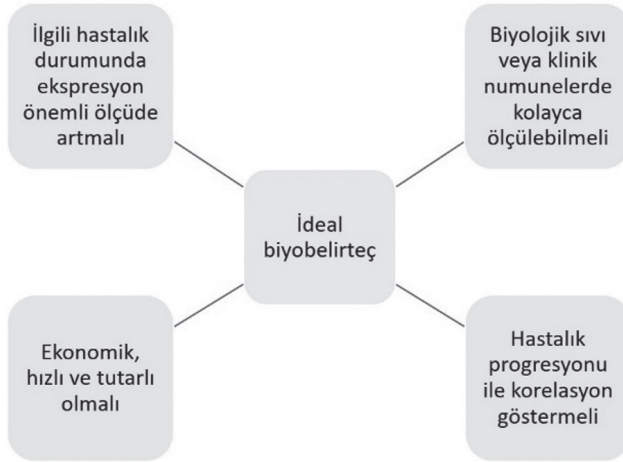
miRNA'lar ~22 endojen nükleotitten oluşur ve hedef mRNA'ları bozdukları veya baskıladıkları için transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunun önemli düzenleyicileri olan küçük, kodlamayan RNA'lardır (13). Göreceli olarak yakın zamana kadar gözden kaçmış olsalar da miRNA'lar, çok hücreli organizmalarda daha bol bulunan gen düzenleyici molekül sınıflarından birini oluşturur ve muhtemelen birçok protein kodlayan genin çıktısını etkiler (10, 13). Ek olarak, hücre gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre döngüsü düzenlemesi, apoptoz ve metabolizmada çeşitli roller oynamaktadırlar (10). Bu nedenle, miRNA'daki değişiklikler, mRNA ve proteinin ekspresyonunu bozarak çeşitli insan kanserlerinin oluşumunda rol oynayabilir. (7). miRNA'lar tümör baskılayıcı genleri hedeflediklerinde bir onkogen rolü oynayabilir ve benzer şekilde onkogenleri hedeflediklerinde tümör baskılayıcı rol oynayabilir. Bu nedenle miRNA profillemeye, çeşitli kanserlerin erken tanısı ve progresyonu ile ilişkili prediktif miRNA imzalarının tanımlanması için güçlü bir araç olmuştur (14). Ayrıca miRNA'ların vücut sıvılarında dolaşmaları nedeniyle de RNA düzenlemelerinde ve çeşitli hastalıkların teşhisinde anahtar rol oynadıkları tespit edilmiştir (15).

2. POTANSİYEL BİYOBELİRTEÇ OLARAK miRNA'LAR

Ulusal Kanser Enstitüsü biyobelirteçleri “kanda, diğer vücut sıvılarında veya dokularda bulunan ve normal veya anormal bir sürecin veya bir durumun veya hastalığın işareti olan biyolojik bir molekül” olarak tanımlamaktadır (16). Biyobelirteç, normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya terapötik bir müdahaleye verilen farmakolojik tepkilerin bir göstergesi olarak objektif olarak ölçülen ve değerlendirilen bir özelliktir. Bir biyobelirteç, mevcut klinik ve patolojik analiz için daha fazla bilgi ortaya çıkarmaktadır. Kanser tanısını ve saptanmasını, hastalığın ilerlemesini izlemeyi ve klinik müdahale sonrası prognozu

ve sağkalımı tahmin etmeyi kolaylaştırmaktadır (16, 17). İdeal erken teşhis biyobelirteçleri, kanserin hala tedavi edilebilir olduğu bir noktada potansiyel olarak agresif tümörleri belirleyebilmesi, yavaş büyüme ve yayılım gösteren hastalığın tespitini de en kısa süreye indirmesi beklenmektedir (18). Bir biyobelirteç, bir hastalığı teşhis etmek ve izlemek için yararlı görülüyorsa, hastalığın ilerlemesi, nüks veya hayatta kalma gibi sonuçlarla korelasyonu gösterilmelidir (19). Bununla birlikte, istatistiksel çıkarımın değerlendirilmesi için bu testlerin yeterli veriye ve sayıya sahip olgularda gerçekleştirilmesi gerekmektedir (3,19).

Bir biyobelirteç seçimi, biyolojik veya terapötik bir temele sahip olmalıdır ya da en azından kanserin varlığı, özellikleri veya saldırganlığı ile güvenilir bir korelasyon göstermelidir. Ayrıca, diğer faktörlerle birlikte, çok değişkenli bir tahlilde bağımsız bir öngörücü olarak gerçekleştirilmesi gereken, hastalığın sonucuyla ilgili olarak belirtecin gücünün bir değerlendirmesi olmalıdır. İdeal bir biyobelirteç, bir klinisyen tarafından kolayca yorumlanabilen erişilebilir bir biyolojik sıvı veya klinik numunede (örneğin, plazma, idrar, prostat sıvısı gibi) hızlı, tutarlı, ekonomik ve ölçülebilir olmalıdır (16,20,21). İlgili hastalık durumunda ekspresyonu önemli ölçüde arttırmalı (veya azaltmalıdır) ve sağlıklı kontrol denekleri ile tedavi edilmeyen hastalar arasında biyobelirteç seviyelerinde örtüşme olmamalıdır. İdeal bir biyobelirtecin özellikleri Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. İdeal bir biyobelirtecin özellikleri

Moleküler tekniklerdeki mevcut gelişmeler, PKa için yeni biyobelirteçlerin keşfini kolaylaştıran yeni araçlar sağlamıştır. Ortaya çıkan bu biyobelirteçler, PKa'nın teşhisi ve prognozu için yüksek bir özgüllüğe sahip olacak yeni ve klinik

olarak güvenilir göstergelerin geliştirilmesinde faydalı ve önemli olacaktır (16). Hastalığın erken tespitinde veya izlenmesinde kullanılan PKa biyobelirteçleri için model adayı prostata özgü olmalı ve BPH, prostat intraepitelyal neoplazisi ve kanserli prostat dokuları arasında ayırım yapabilmelidir (16,17).

İnsan kanserlerinde miRNA'ların deregüle özelliklerinin anlaşılması, çeşitli biyolojik numunelerden izole edilebilmeleri ve genellikle stabil ve çeşitli saklama koşullarına dirençli oldukları için moleküler biyobelirteç adayları olmuşlardır (15, 18). miRNA'lar, böyle bir uygulama için arzu edilen bir takım özelliklere sahiptir. Belki de en önemlisi, miRNA'ların ekspresyon profilleri genellikle dokuya, gelişime ve hastalığa özgü olmasıdır. Yapılan çalışmalarda, miRNA ekspresyon imzalarının farklı tümör tipleri arasında doğru bir şekilde ayırım yaptığını ve histolojik olarak belirsiz kökenli kanserleri doğru bir şekilde tanımlayabildiği gösterilmiştir (6,22). Ayrıca miRNA'lar, gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR), mikroarray ve küçük RNA dizileme gibi yaygın olarak kullanılan çeşitli standart tekniklerle kolayca saptanabilir ve doğru bir şekilde ölçülebilir (23). Sirküle hücre dışı miRNA'lar, ribonükleazlara ve donma-çözülme ve yüksek pH gibi şiddetli fizikokimyasal koşullara, büyük olasılıkla onları bozulmadan koruyan Ago2 gibi RNA bağlayıcı proteinlerle komplekslerdeki lipid mikroveziküller (eksozomlar ve apoptotik cisimler) içinde paketlenmeleri nedeniyle son derece dirençlidir (24–26). Plazma ve seruma ek olarak, diğer vücut sıvılarında, özellikle idrar ve menide miRNA'lar tanımlanmıştır, bu da onları PCa için daha da ilginç aday biyobelirteçler haline getirmiştir (25,27).

3. PROSTAT KANSERİNDE miRNA'LARIN ROLÜ

Kromozomal instabilite, epigenetik değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerin değişmesi ve bazı protein ekspresyonları gibi moleküler değişiklikler, PKa'nın tümörjenezini ile ilişkilidir (28). miRNA'lar, AR sinyal yolağında yer alan genlerin ekspresyonunu düzenleyerek PKa patogenezi (hücre döngüsü, apoptoz, epitelial-mezenkimal geçiş (EMT), metastaz, kanser kök hücreleri ile ilgili özelliklerin kontrolü gibi) kritik bir rol oynamaktadır (29). Hücre döngüsünün düzensizliği, kanseri karakterize eden anormal hücre proliferasyonuna yol açmaktadır. Genellikle miRNA'lar hücre döngüsü proteinleri ile etkileşime girerek hücre bölünmeyi ve hücre döngüsü ilerlemesini düzenleme potansiyeli taşımaktadır. Örneğin, Lewis ve ark. (30) miR-888'in, E2F transkripsiyon faktörlerini bağlayarak ve inhibe ederek ilk boşluk fazından sentetik faza hücre döngüsü ilerlemesini bloke eden hedef Retinoblastoma Benzeri 1'i (Rb-like-1) inhibe ettiğini bildirmiştir. Kanserdeki bu genetik değişiklikler miRNA'ların spesifik aktivitesinde önemli

roller oynamaktadır. Bazı prostat kanserlerinde epigenetik susturma bölgelerinin %30'unun miRNA lokusu içerdiği gösterilmiştir (31).

3.1. Androjen Reseptör Sinyalindeki Roller

PKa androjen bağımlı bir hastalıktır ve AR sinyali, doğrudan tümörjenez ve hastalık progresyonu ile ilişkilidir. Bazı miRNA'lar AR sinyal yolağında rol alırlar (32). miRNA'ların AR ile etkileşimleri, kastrasyona duyarlı PKa'den kastrasyona dirençli PKa'ne (KDPK) ilerlemede belirleyici rol oynamaktadırlar (33). Yapılan bir çalışmada, miR-21 ve miR-32'nin BPH ile karşılaştırıldığında KDPK'da aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. miR-21'in hücre proliferasyonunu indüklediği, miR-32'nin ise hücre döngüsü ve apoptoz sürecini kontrol ettiği gösterilmiştir (34).

3.2. Hücre Döngüsü Ve Apoptoz Sürecindeki Roller

miR-15a/16, miR-221/222, let-7a, miR-24 ve miR-31'in hücre döngüsü kontrol noktası genleri ile etkileşim yoluyla hücre döngüsünün dereglasyonuna dahil oldukları gösterilmiştir (35–38). miR15a/16'nin G1/S geçişinde yer alan CCND1 genini hedef alarak baskılayıcı bir işlev gösterdiği bildirilmiştir (38). miR-221/222'nin siklin bağımlı kinaz inhibitörünün (p27Kip1) baskılanmasıyla agresif PC3 hücrelerinde hücre döngüsünün ilerlemesini ve proliferasyonunu desteklediği raporlanmıştır (36). Hücre döngüsünde rol alan bir diğer miRNA let-7a, tümör supressor ailesindedir ve yapılan çalışmalarda prostat tümörünün gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (35).

3.3. EMT Sürecindeki Roller

PKa'de miRNA'ların rolünü gösteren bir diğer mekanizma EMT olarak adlandırılan biyolojik süreçtir. EMT süreci sırasında epitel hücreleri, invazyon ve metastazı destekleyen mezenkimal özellikler kazanarak epitel özelliklerini (hücre-hücre yapışması ve polaritesi) kaybetmektedirler (39). PKa hücreleri EMT'ye tabi tutulur, daha sonra çevre dokuları istila ederek metastaz oluşturmak için kan veya lenfatik yollarla birkaç dokuyu kolonize etmektedir. Metastatik hücreler daha sonra, birincil tümördeki hücrelere benzer epitelyal özellikleri yeniden kazanmak için mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) yoluyla geri dönebilir. Bazı miRNA'lar, bu süreçlerin anahtar proteinlerinin ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla EMT ve MET olaylarının düzenleyicileridir (40,41). Bir çalışmada miR-205 ve miR-200 aile üyelerinin (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-145) E-kadherin epitelyal işaretlercinin baskılayıcısı olan ZEB1 ve ZEB2'yi hedefleyerek EMT'yi geri döndürebildiği gösterilmiştir (40).

4. PROSTAT KANSERİNDE TANISAL BİYOBELİRTEÇ OLARAK SİRKÜLE miRNA'LARIN ROLÜ

Erken kanser tespiti konusu, şu anda birçok kanser türünde erken teşhis yöntemlerinin ve tarama testlerinin bulunmaması nedeniyle miRNA tabanlı teşhis araçları umut verici bir alanı temsil etmektedir (5). Doku temelli çalışmaların dışında; kan, idrar veya meni gibi vücut sıvılarında dolaşan miRNA'ların keşfi; invaziv olmayan biyobelirteçleri belirleme fırsatı sunmaktadır (29). Lawrie ve ark. (42) ilk olarak serum gibi vücut sıvılarındaki hücre dışı miRNA'ların invaziv olmayan tanı belirteçleri olma potansiyeline sahip olabileceği gerçeğini tanımladı. Bu çalışmadan sonra sirküle miRNA'lara olan ilgi giderek artmıştır. Chen ve ark. (26) hücre dışı miRNA'ların insan serum ve plazmasında mevcut, kararlı, tekrarlanabilir ve tutarlı olduğunu gösterdi. Bu nedenle, vücut sıvılarında miRNA'ların tespiti, çeşitli kanserlerin potansiyel invaziv olmayan tanısal biyobelirteçleri olarak hizmet edebileceği öne sürülmüştür.

Mitchell ve ark. (21) tümör kaynaklı miRNA'ların dolaşım sistemine girebileceğini ve insan kanserinin önemli kan bazlı biyobelirteçleri olarak serum ve plazmada ölçülebileceğini bildirmiştir. Ayrıca sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında PKa hastalarının serumlarında dolaşan miR-141'in önemli ölçüde yükseldiğini göstermişlerdir. Bununla birlikte yazarlar miR-141'in 0,907'lik bir eğri altında kalan alan (EAA) göstererek, gelişmiş PKa'li hastalarda kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (21). Daha yakın zamanlarda, diğer çalışmalar, PKa'nin saptanması ve prognozunda dolaşımdaki miRNA'ların yararlılığını göstermiş, bunların serum ve plazmada olduğu kadar eksozomlarda ve kan mononükleer hücrelerinde de varlığını ortaya koymuşlardır (29).

PKa teşhisi için önerilen diğer potansiyel invaziv olmayan biyobelirteçler miR-139-5p ve miR-320 ailesi üyeleridir (miR-320a, -b ve c). Bu çalışmada miRNA'ların periferik kan ve serumdaki ekspresyonlarının PKa, BPH ve kontrol grubu arasında önemli ölçüde farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Dikkat çekici bir şekilde, serumdaki miR-320a, -b ve -c seviyeleri, BPH hastalarında en yüksek medyan ekspresyon seviyelerini gösterirken kontrol grubunda en düşük seviyeleri göstermiştir (43).

Chen ve ark. (26) 25 PCa (15 metastatik olmayan, 10 metastatik) ve 17 BPH hastasından alınan plazmadaki 1146 miRNA'yı değerlendirerek beş miRNA'dan (miR-622, miR-1285, let-7e, let-7c ve miR-30c) oluşan bir panel belirlemişlerdir. PKa'yı BPH'den ve sağlıklı kontrollerden yüksek doğrulukla ayırt edebildiğini ve sırasıyla EAA'leri 0.924 ve 0.860 olduğunu göstermişlerdir. Ek olarak, çalışmalarında miRNA'ları rutin PSA testi ile kombine hale getirerek doğruluk düzeyi-

nin arttığını bildirmişlerdir. miR-30c, EAA değeri 0,908 olan $PSA \geq 4$ $\mu\text{g/L}$ olan hastalarda özellikle yararlıyken, $PSA < 4$ $\mu\text{g/L}$ olan hastalarda EAA değerini 0,509 olarak bulmuşlardır. Benzer şekilde, let-7e'nin tanınal performansı, $PSA < 4$ $\mu\text{g/L}$ olan hastalarda EAA değeri 0,969 iken, $PSA \geq 4$ $\mu\text{g/L}$ olduğunda EAA değeri 0,773 olmuştur (26).

Serumdaki miRNA'ların tanı değeri Srivastava ve ark. (44) tarafından 667 miRNA'nın profil analizinden 3 miRNA'nın (miR-25, miR-101 ve miR-628-5p) seçilmesiyle doğrulanmıştır. Seçilen miRNA'ların validasyonu, PKa hastalarını ve yaş uyumlu sağlıklı kontrollerinden ayırt ederek iyi bir performans göstermiştir. EAA değerleri miR-25, miR-101 ve miR-628-5p için sırasıyla 0.66, 0.80 ve 0.94 olarak bulmuşlardır.

Sirküle miRNA'ların, erken evre lokalize PKa'ni teşhis etme potansiyelinin değerlendirildiği bir çalışmada, malign grupta ekspresyonları önemli ölçüde değişen 10 miRNA'dan miR-106a, miR-1274'nın en iyi teşhis kapasitesine sahip olduğunu bulmuşlardır (EAA=0,928) (45). Brase ve ark. (46) dolaşan miRNA'ların ekspresyon profilini araştırdıkları çalışmalarında, PKa agresif formlarında serumda miR-200c, miR-605, miR-135a, miR-433 ve miR-106a'nın %89 doğrulukla tanımlamada yararlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Yine bir başka çalışmada lokalize PKa'li erkeklerin plazmasında sağlıklı kontrollere kıyasla miR-21 ve miR-221'in yükseldiği bulunmuştur (47). Kotb ve ark., (48) 10 PKa ve 10 BPH'lı hastadan oluşan çalışma grubunda miR-221'in serum seviyelerini PKa'de upregüle bulmuşlar ve BPH'tan PKa'nın ayırımında, miR-221 için spesifisite ve sensitivite %80 olarak hesaplamışlardır. Bir başka çalışmada PKa'nin agresifliğini öngören miR-20a, miR-21, miR-145 ve miR-221'den oluşan bir plazma miRNA imzası bulunmuş ve D'Amico kriterlerine göre düşük ve yüksek riskli PKa hastalarını 0.824 EAA ile ayırt ettiklerini göstermişlerdir (49).

Watahiki ve ark., (50) 50 PKa hastasından alınan plazma örneklerinde 742 miRNA'yı analiz etmişler ve 8 miRNA'nın, metastatik CRPC hastalarında, lokalize PKa'li olanlara kıyasla önemli ölçüde yukarı regüle edilirken, ikisinin aşağı regüle edildiğini raporlamışlardır. Yazarlar, 0,944'lük bir EAA gösteren miR-141, miR-151-3p ve miR-16'dan oluşan bir panel önermişlerdir. Ayrıca yazarlar, miR-141, 151-3p, 152 ve 423-3p'yi içeren bir panelin daha kötü bir sonuç ve/veya daha yüksek bir Gleason skoru ile ilişkili olduğunu açıklamışlardır. Ek olarak miR-141 ve miR-152'in, radikal prostatektomiden sonra nüks olasılığı yüksek olan hastaları tanımladığını göstermişlerdir.

Bu bilgiler ışığında spesifik miRNA'ların ifadesi, normal ve kanser dokuları arasında ayırım yapabilmek için kullanılabilir bir sınıflandırıcı olabilirler.

Bununla birlikte, farklı çalışmalarda bildirilen miRNA'ların ekspresyon paternlerindeki farklılıklar, sınıflandırıcı olarak kullanılmalarında tartışmalara yol açmaktadır (7). Bunun nedeni, seçilen paneller ve platform türleri, hastaların yaşı, çalışılan düşük hasta popülasyonu, seriler arasındaki etnik farklılıklar ve her çalışmada yerel ve ileri PKa arasındaki farklı dengeler nedeniyle önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Bu sonuçlar, miRNA'ların küçük miktarlarda vücut sıvılarında biyobelirteçler olarak ölçülebileceğini ve tespit edilebileceğini göstermektedir.

5. TESPİT METODOLOJİLERİ

Bireysel miRNA seviyelerini tespit etmek için en yaygın olarak qRT-PCR kullanılmaktadır. Tüm miRNA setini incelemek için yeni nesil dizileme teknolojileri (NGS), miRNA profilleri elde etmek için mikroarray teknolojileri kullanılmaktadır. Mikroarray teknolojisi veya qRT-PCR belirli problemler ile sınırlandırılmıştır, yeni miRNA'ları ortaya çıkaramamaktadırlar. Fakat NGS teknolojisi ile her türlü küçük RNA (sRNA) keşfedilebilmektedir. miRNA'ların iyi tanımlanmış diziler içermeleri biyoinformatik çalışmalar açısından fayda sağlamaktadır (51). PKa'de potansiyel belirteçler NGS çalışmalarının yaygınlaşmasıyla bulunabilecektir. Bu sayede dijital PCR (dPCR) kullanılarak prediktif, prognostik ve tanısal belirteçler incelenebilecektir. Böylece günlük klinik uygulamada sadece kan örneği ile miRNA'lar dPCR ile saptanabilecektir (49).

Homojen bir analiz ve doğru veri yorumlama için bazı hususlar gerekmektedir; ı) örneklerin homojen bir şekilde toplanması ve saklanması ıı) numunelerin antikoagülen içeren tüplere alınması ııı) saklama koşulları (4 °C veya -80 °C) ıv) aynı numune tipi (serum/plazma) v) izolasyon yöntemleri ve analizlerin standart olması (52-54).

6. miRNA'LARIN BİYOBELİRTEÇ OLARAK KULLANIMI İLE İLGİLİ KISITLILIKLAR

miRNA'lar, DNA'nın delesyonları, amplifikasyonları, mutasyonları ve epigenetik değişiklikleri gibi, gen sinyalleşmesine aracılık ettiğinden, kanser, hastalığın ilerlemesi ve metastaz geliştirmek için gerekli proteinlerin sentezini etkileyebilirler. Bu nedenle miRNA'lar yararlı klinik tanı ve prognostik biyobelirteçler olabilirler (7). Ancak rutin kullanımlarında bazı kısıtlılıklar söz konusudur. Birincisi, miRNA'ların kan ve idrar gibi vücut sıvılarına salınmasından sorumlu mekanizma ve bunun işlevsel rolü ve sonucu tam olarak anlaşılammıştır (55). İkincisi miRNA seviyelerini normalize etmek için kullanılan endojen kontrollerde bir standardın olmamasıdır. Çalışmalarda genellikle normalizasyon için U6 küçük nükleer RNA (RNU6B) kullanılmaktadır. Ancak bazı çalışmalarda U6'nın kararsız olduğu ve

serumda bozulduğu gösterilmiştir (26,56). Normalleştirme konusundaki çelişki-lerin giderilmesi için daha fazla çalışma ve deneysel doğrulama gerekmektedir. Üçüncüsü ise, çeşitli raporların sonuçları arasındaki çeşitliliklerdir. Bu durum farklı metodolojilerin kullanımına veya değerlendirme için serum veya plazmanın kullanımına bağlanabilir. Çünkü serum plazmaya kıyasla daha yüksek miktarda nükleik asit içermektedir (10).

7. SONUÇ

miRNA'lar ve PKa ile ilgili keşfedilmemiş birçok alan ve bu alanda araştırma yapılacak birçok konu bulunmaktadır. Kuşkusuz, miRNA'ları kan ve idrarda yararlı tanısal biyobelirteçler ve kanser dokularında prognostik biyobelirteçler olarak belirlemek için birçok çalışma gereklidir. Birlikte ele alındığında, tüm bu veriler miRNA alanının ne kadar ilgi çekici ancak karmaşık olduğunun altını çizerek, miRNA'ların belirteçler ve terapötik hedefler olarak kullanımının umut verici olduğunu, ancak günlük klinik uygulamada henüz bir gerçeklik olmadığını göstermektedir. Yakın gelecekte doku, kan ve idrardaki miRNA'lar, prostat kanserinde teşhis ve tedavi sonuçlarının öngörülmesi için şüphesiz yeni biyobelirteçler olarak sunulacaktır.

KAYNAKLAR

1. Velonas VM, Woo HH, dos Remedios CG, et al. Current status of biomarkers for prostate cancer. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):11034-11060. doi:10.3390/ijms140611034
2. Sita-Lumsden A, Dart DA, Waxman J, et al. Circulating microRNAs as potential new biomarkers for prostate cancer. *British journal of cancer*. 2013;108(10):1925-1930. doi:10.1038/bjc.2013.192
3. Madu CO, Lu Y. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Journal of Cancer*. 2010;1:150-177. doi:10.7150/jca.1.150
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Journal of Clinicians*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
5. Vanacore D, Boccellino M, Rossetti S, et al. MicroRNAs in prostate cancer: an overview. *Oncotarget*. 2017;8(30):50240-50251. doi:10.18632/oncotarget.16933
6. Sapre N, Selth LA. Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Prostate Cancer: The State of Play. *Prostate Cancer*. 2013;2013:539680. doi:10.1155/2013/539680
7. Nakagawa M. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*. 2014;72(12):2224-2228.
8. Boccellino M, Alaia C, Misso G, et al. Gene interference strategies as a new tool for the treatment of prostate cancer. *Endocrine*. 2015;49(3):588-605. doi:10.1007/s12020-015-0629-3
9. Sartori DA, Chan DW. Biomarkers in prostate cancer: what's new?. *Current opinion in oncology*. 2014;26(3):259-264. doi:10.1097/CCO.0000000000000065
10. Ibrahim NH, Abdellateif MS, Kassem SH, et al. Diagnostic significance of miR-21, miR-141, miR-18a and miR-221 as novel biomarkers in prostate cancer among Egyptian patients. *Andrologia*. 2019;51(10):e13384. doi:10.1111/and.13384
11. Haldrup C, Kosaka N, Ochiya T, et al. Profiling of circulating microRNAs for prostate cancer

- biomarker discovery. *Drug delivery and translational research*. 2014;4(1):19-30. doi:10.1007/s13346-013-0169-4
12. Matin F, Jeet V, Moya L, et al. A Plasma Biomarker Panel of Four MicroRNAs for the Diagnosis of Prostate Cancer. *Scientific reports*. 2018;8(1):6653. doi:10.1038/s41598-018-24424-w
 13. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5
 14. Das DK, Persaud L, Sauane M. MicroRNA-4719 and microRNA-6756-5p Correlate with CastRATION-Resistant Prostate Cancer Progression through Interleukin-24 Regulation. *Noncoding RNA*. 2019;5(1):10. doi:10.3390/ncrna5010010
 15. Wahid F, Shehzad A, Khan T, et al. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1803(11):1231-1243. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.06.013
 16. Madu CO, Lu Y. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J Cancer*. 2010;1:150-177. doi:10.7150/jca.1.150
 17. Biomarkers Definitions Working Group.. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989
 18. Lan H, Lu H, Wang X, et al. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *BioMed research international*. 2015;2015:125094. doi:10.1155/2015/125094
 19. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clinical cancer research*. 2004;10(12 Pt 1):3943-3953. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0200
 20. Hartwell L, Mankoff D, Paulovich A, et al. Cancer biomarkers: a systems approach. *Nature biotechnology*. 2006;24(8):905-908. doi:10.1038/nbt0806-905
 21. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(30):10513-10518. doi:10.1073/pnas.0804549105
 22. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834-838. doi:10.1038/nature03702
 23. Fabris L, Ceder Y, Chinnaiyan AM, et al. The potential of microRNAs as prostate cancer biomarkers. *European urology*. 2016;70(2):312-322. doi:10.1016/j.eururo.2015.12.054
 24. Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, et al. Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clinical chemistry*. 2015;61(11):1333-1342. doi:10.1373/clinchem.2015.239459
 25. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, et al. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(8):467-477. doi:10.1038/nrclinonc.2011.76
 26. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*. 2008;18(10):997-1006. doi:10.1038/cr.2008.282
 27. Mall C, Rocke DM, Durbin-Johnson B, et al. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomarkers in medicine*. 2013;7(4):623-631. doi:10.2217/bmm.13.44
 28. Dong JT, Isaacs WB, Isaacs JT. Molecular advances in prostate cancer. *Current opinion in oncology*. 1997;9(1):101-107. doi:10.1097/00001622-199701000-00016
 29. Filella X, Foj L. miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2017;55(5):715-736. doi:10.1515/cclm-2015-1073
 30. Lewis H, Lance R, Troyer D, et al. miR-888 is an expressed prostatic secretions-derived microRNA that promotes prostate cell growth and migration. *Cell Cycle*. 2014;13(2):227-239. doi:10.4161/cc.26984
 31. Coolen MW, Stirzaker C, Song JZ, et al. Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nature cell biology*. 2010;12(3):235-246. doi:10.1038/ncb2023
 32. Zhou Y, Bolton EC, Jones JO. Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumori-

- genesis. *Journal of molecular endocrinology*. 2015;54(1):R15-R29. doi:10.1530/JME-14-0203
33. ChunJiao S, Huan C, ChaoYang X, et al. Uncovering the roles of miRNAs and their relationship with androgen receptor in prostate cancer. *IUBMB Life*. 2014;66(6):379-386. doi:10.1002/iub.1281
 34. Jalava SE, Urbanucci A, Latonen L, et al. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene*. 2012;31(41):4460-4471. doi:10.1038/onc.2011.624
 35. Dong Q, Meng P, Wang T, et al. MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. *PLoS One*. 2010;5(4):e10147. doi:10.1371/journal.pone.0010147
 36. Szczyrba J, Löprich E, Wach S, et al. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Molecular cancer research*. 2010;8(4):529-538. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0443
 37. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *International journal of cancer*. 2010;126(5):1166-1176. doi:10.1002/ijc.24827
 38. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nature medicine*. 2008;14(11):1271-1277. doi:10.1038/nm.1880
 39. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
 40. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology*. 2008;10(5):593-601. doi:10.1038/ncb1722
 41. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(20):6566-6578. doi:10.1093/nar/gki965
 42. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*. 2008;141(5):672-675. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x
 43. Lieb V, Weigelt K, Scheinost L, et al. Serum levels of miR-320 family members are associated with clinical parameters and diagnosis in prostate cancer patients. *Oncotarget*. 2017;9(12):10402-10416. doi:10.18632/oncotarget.23781
 44. Srivastava A, Goldberger H, Dimtchev A, et al. Circulatory miR-628-5p is downregulated in prostate cancer patients. *Tumour Biology*. 2014;35(5):4867-4873. doi:10.1007/s13277-014-1638-1
 45. Moltzahn F, Olshen AB, Baehner L, et al. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Research*. 2011;71(2):550-560. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1229
 46. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *International journal of cancer*. 2011;128(3):608-616. doi:10.1002/ijc.25376
 47. Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biology*. 2011;32(3):583-588. doi:10.1007/s13277-011-0154-9
 48. Kotb S, Mosharafa A, Essawi M, Hassan H, Meshref A, Morsy A. Circulating miRNAs 21 and 221 as biomarkers for early diagnosis of prostate cancer. *Tumour Biol*. 2014;35(12):12613-12617. doi:10.1007/s13277-014-2584-7
 49. Shen J, Hrubby GW, McKiernan JM, et al. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *Prostate*. 2012;72(13):1469-1477. doi:10.1002/pros.22499
 50. Watahiki A, Macfarlane RJ, Gleave ME, et al. Plasma miRNAs as biomarkers to identify patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(4):7757-7770. doi:10.3390/ijms14047757
 51. Cozar JM, Robles-Fernandez I, Rodriguez-Martinez A, et al. The role of miRNAs as biomar-

- kers in prostate cancer. *Mutation research reviews in mutation research*. 2019;781:165-174. doi:10.1016/j.mrrev.2019.05.005
52. Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clinical chemistry*. 2015;61(1):56-63. doi:10.1373/clinchem.2014.221341
53. Kappel A, Keller A. miRNA assays in the clinical laboratory: workflow, detection technologies and automation aspects. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2017;55(5):636-647. doi:10.1515/cclm-2016-0467
54. Marzi MJ, Montani F, Carletti RM, et al. Optimization and Standardization of Circulating MicroRNA Detection for Clinical Application: The miR-Test Case. *Clinical chemistry*. 2016;62(5):743-754. doi:10.1373/clinchem.2015.251942
55. Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654-659. doi:10.1038/ncb1596
56. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008;14(5):844-852. doi:10.1261/rna.939908