BİNNAZ ÖZCAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2024

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra eğer basılacak ise yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

TÜRK POPÜLASYONUNDA PROSTAT KANSERLİ OLGULARDA BRCA1,BRCA2 VE RAD51 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

BİNNAZ ÖZCAN

DANIŞMAN
DOÇ.DR.HAYRİYE ŞENTÜRK ÇİFTÇİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ABD

İSTANBUL-2024

İTHAF

Tüm hayatım boyunca benim hep yanımda olan canım aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bana her konuda destek olan Tıbbi Biyoloji ABD başkanı Prof.Dr. Fatma Savran Oğuz'a ve yüksek lisans tez süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve bana her konuda yardımcı olan tez danışmanım Doç. Dr. Hayriye Şentürk Çiftçi'ye teşekkür ederim.

Tıbbi Biyoloji ABD emekli öğretim üyelerimizden Prof. Dr. Filiz Aydın'a ve ayrıca Tıbbi Biyoloji ABD öğretim üyesi olan Prof. Dr.Çiğdem Kekik Çınar'a bana olan destekleri için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez süresince tez konumun belirlenmesi ve hastalara ulaşmam konusunda bana desteği için klinik danışmanım Üroloji Onkoloji BD öğretim üyesi Doç. Dr. Selçuk Erdem'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bana desteklerinden dolayı Doç.Dr. Meltem Savran Karadeniz'e teşekkür ederim.

Tez aşaması süresince hasta örnekleri elde etme konusunda bana her zaman destek olan Op. Dr. Reşat Aydın'a çok teşekkür ederim.

Tüm çalışmam süresince bana her konuda destek olan Tıbbi Biyoloji ABD Dr. Öğretim Görevlisi Gözde Öztan'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyuınca bana her konuda destek olan Tıbbi Biyoloji ABD ekip arkadaşlarıma destekleri için çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan değerli aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:TYL-2023-39753

İÇİNDEKİLER

BEYAN..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
İTHAF.....İİ
TEŞEKKÜR.....İİİ
İÇİNDEKİLER.....İV
TABLOLAR LİSTESİ.....Vİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....İX
ÖZET.....Xİİ
ABSTRACT.....Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....1
2. GENEL BİLGİLER.....4
2.1. Prostat anatomisi.....4
2.3. Bening (iyi huylu) prostat hiperplazisi.....7
2.4. Prostat kanseri.....7
2.5. Klinik bulgular.....8
2.6. Prostat kanseri patolojisi.....8
2.7. Evreleme.....9
2.8. Tanı ve tedavi.....11
2.9. Prostat kanserinin prognozu.....14
2.10. Prostat kanserinin genetiği.....14
2.11. Kalıtsal prostat kanseri.....15
2.12. Moleküler mekanizmaları.....15
2.13. Prostat kanseri epidemiyolojisi ve etiyolojisi.....16
2.14. Prostat kanseri ve BRCA1, BRCA2 genleri.....17
2.15. Prostat kanseri ve RAD51.....18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....21
4. SONUÇLAR.....29
4.1. Hastalara ve kontrollere ait demografik veriler.....29
Hastalara ve kontrollere ait demografik, klinik özellikler Tablo 7'de verilmiştir.....29
4.2. Hastalara ve kontrollere ait BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekpresyonları.....30

4.3. Hastaların BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekpresyonları ve klinik ilişki 32
5. TARTIŞMA 47
KAYNAKLAR 52
HAM VERİLER 54
FORMLAR 59
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....60

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: 2002 TNM Sınıflandırması
Tablo 2. Prostat Kanseri İçin Risk Sınıflandırma Şeması
Tablo 3: cDNA reaksiyonu
Tablo 4: Sıcaklık değerleri ve süreleri
Tablo 5: RT PCR Primer Dizayni
Tablo 6: Melt Curve protokolü
Tablo 7: Hastalara ve kontrollere ait demografik klinik özellikler
Tablo 8: Gen İfadeleri ile Gleason Skorları Arasındaki İlişki Tablosu
Tablo 9: Gen İfadeleri ve Yaş arasındaki ilişki tablosu
Tablo 10: Gen İfadeleri İle Nüks Arasındaki İlişki Tablosu
Tablo 11: Hasta ve Kontrol Gruplarında Ortalama BRCA1, BRCA2 ve RAD51 Ekspresyonu ve Değerlendirmesi ($p<0,05$)
Tablo 12: Nüks olan ve olmayan hastalarda ortalama BRCA1, BRCA2 ve RAD51 ekspresyonu ve değerlendirmesi ($p<0,05$)
Tablo 13: Gleason skor grup (6 ve 7: Grup 1) (8 ve 9: Grup 2)
Tablo 14: Gleason skor grup (6: Grup 1) (7,8, 9: Grup 2)
Tablo 15: Gleason skor grup (6: Grup 1) (7: Grup 2)
Tablo 16: Gleason skor grup (6: Grup 1) (8,9: Grup 3)
Tablo 17: Grade grup (Grade 1: Grup 1) (Grade 2: Grup 2)
Tablo 18: Grade grup (Grade 1: Grup 1) (Grade 3: Grup 2)
Tablo 19: Grade grup (Grade 1: Grup 1) (Grade 4: Grup 2)
Tablo 20: Grade grup (Grade 1: Grup 1) (Grade 5: Grup 2)
Tablo 21: Yaş bilgileri (≤ 60: Grup 1, 61-73: Grup 2)
Tablo 22: Yaş bilgileri (≤ 60: Grup 1, ≥ 74: Grup 3)
Tablo 23: Eğri altında kalan değerler
Tablo 24: BRCA1 geni için tüm hasta grubundaki Ct değerleri
Tablo 25: BRCA2 geni için tüm hasta grubundaki Ct değerleri
Tablo 26: RAD51 geni için tüm hasta grubundaki Ct değerleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Prostat anatomisi
Şekil 1a: Prostat trigonal ön fibromüsküler stromasının önden görünümüönden görüntüsü
Şekil 1b: Prostat trional ön fibromüsküler stromasının yandan görünümü
Şekil 1c: Prostatın trional fibromüsküler stroma kompleksinin eğik görünümü
Şekil 2: Normal ve neoplastik prostat
Şekil 2A: İnsan ve fare prostat örneği
Şekil 2B: Prostat kanserinde luminal veya bazal fenotipler
Şekil 3: Prostat kanserinde moleküler mekanizmalar ve genetik değişiklikler
Şekil 4: BRCA proteinlerinin özellikleri.
Şekil 5: Hasta ve kontrol grubunda incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.
Şekil 6: QRT-PCR ile elde edilen hasta ve kontrol gruplarına ait clustergram sonuçları.
Şekil 7: Nüks olan ve olmayan hasta gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.
Şekil 8: QRT-PCR ile elde edilen nüks olan ve olmayan hasta gruplarına ait clustergram
Şekil 9: Gleason skor (6 ve 7: Grup 1) (8 ve 9: Grup 2) gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.
Şekil 10: QRT-PCR ile elde edilen Gleason skor (6 ve 7: Grup 1) (8 ve 9: Grup 2) gruplarına ait clustergram sonuçları
Şekil 11: Gleason skor (6: Grup 1) (7,8, 9: Grup 2) gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.
Şekil 12: QRT-PCR ile elde edilen Gleason skor (6: Grup 1) (7,8, 9: Grup 2) gruplarına ait clustergram sonuçları.
Şekil 13: Gleason skor (6: Grup 1) (7: Grup 2), (8,9: Grup 3) gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.
Şekil 14: QRT-PCR ile elde edilen Gleason skor (6: Grup 1), (7: Grup 2), (8,9: Grup 3) gruplarına ait clustergram sonuçları.

Şekil 15: Grade (G1: Grade 1, G2: Grade 2, G3: Grade 3, G4: Grade 4, G5: Grade 5) gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.
Şekil 16: QRT-PCR ile elde edilen Grade (G1: Grade 1, G2: Grade 2, G3: Grade 3, G4: Grade 4, G5: Grade 5) gruplarına ait clustergram sonuçları
Şekil 17: Yaş (≤ 60: Grup 1, 61-73: Grup 2, ≥ 74: Grup 3) gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri
Şekil 18: QRT-PCR ile elde edilen yaş (≤ 60: Grup 1, 61-73: Grup 2, ≥ 74: Grup 3) gruplarına ait clustergram sonuçları.
Şekil 19: ROC eğrisi

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

PCa: Prostat Kanseri

BRCA: Breast Cancer Susceptibility Gene

BRCA1: Breast Cancer Susceptibility Gene 1

BRCA2: Breast Cancer Susceptibility Gene 2

RAD51: Recombination Protein A

PTEN: Phosphate and Tensin Homolog Protein

DSB: Çift Zincir Kırkığı

HR: Homolog Rekombinasyon

BRCT: BRCA1 C-terminal

CDK2: Siklin Bağımlı Kinaz 2

AP: Anterior Prostat

VP: Ventral Prostat

DPL: Dorsolateral Prostat

CK8:Sitokeratin 8

CK18:Sitokeratin 18

AR: Androjen Reseptör

CK5:Sitokeratin 5

N-Myc: Nöroblastom geni

Myr-AKT1: Aktif Miristoillenmiş AKT1

NEPC: Nöroendokrin Prostat Kanseri

Smad 4: Small mothers against decapentaplegic 4

Trp53: tümör protein 53

ARR2PB-Cre: Luminal hücrelerde?

CK14-CreER: Bazal Hücrelerde

CK8-CreER: Luminal Hücrelerde

Rb1: Retinoblastoma Geni

BPH: İyi Huylu Prostat Hiperplazisi

P63: Tümör Proteini P63

P21: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1

LUTS: Alt İdrar Yolu Septomları

ADT: Androjen Yoksunluğu Tedavisi

CRPC: Kastrasyon Dirençli Prostat Kanseri

HGPIN: Yüksek Dereceli Prostatik İntraepitelyal Neoplazi

IDC: İnraduktal Prostat Karsinom

34Be12: yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin

AMACR: Alfa Metil Asil Koenzim A Rasemaz

ERG: ETS Transkripsiyon Faktörü

T: Birincil Tümör

N: Lenf Düğümleri

M: Metastazlar

T1a Tümör: Palpabl olmayan

T1b Tümör: Palpabl olmayan

m(TOR): Memeli hadef Rapamisin?

PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz

MYC: Hücre büyümesini kontrol eden gen

SPOP: Benek Tipi BTB/POZ Proteini

HPCa: Kalıtsal Prostat Kanseri

HBOC: Meme ve Yumurtalık Kanseri sendromu

LS: Lynch Sendromu

GWAS: Genom çapında ilişkilendirilme çalışmaları

DDR: DNA hasarı onarım

CHEK2: Checkpoint 2

ATM: Ataksi Telenjiektazi mutasyon

PALB2: Meme kanseri 2 ‘nin partneri

MMR: DNA uyumsuzluğu onarımı

MLH1: Mutl homolog 1

MSH2: MutS homolog 2

MSH6: MutS homolog 6

AKT: Protein Kinaz B

Bcl-2: B-cell Lymphoma 2 proteini

cDNA: Komplementer DNA

mTOR: Target of Rapamicin

p53: Hücresel Tümör Antijen p53

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PI3K: Fosfoinositid-3 Kinaz

PIK3CA: Fosfofatidilinositol-4,5-bifosfat 3-Kinaz Alfa

PTEN: Phosphate and Tensin Homolog Protein

RBC: Kırmızı kan hücresi

PMS2: Protein uyumsuzluğu onarım sistemi bileşeni homolog 2

PARP: Poli –ADO riboz polimeraz

IGF-1: Büyüme faktörü

53BP1: P53 bağlayıcı protein 1

OB1:Oligonükleotit/oligasakarit bağlama alanı 1

OB2: Tower alanı 2

MRN: MRE11-RAD50-NBS1

HDR: Homolojiye yönelik onarım

PCNA: Çoğalan hücre nükleer antijeni

ATR: Ataksi telenjiektazi ve RAD3 ile ilişkili protein

P300/CBP: CREB bağlayıcı protein

NLS: Nükleer lokalizasyon sinyali

ML: mililitre

Ul: mikrolitre

MDB: Membrane Desalting Buffer

SYBR Master Mix: Real Time PCR Reaksiyonu

RT-PCR: Real Time PCR Reaksiyonu

ÖZET

Özcan, B. (2024). Türk Popülasyonunda Prostat Kanserli Olgularda BRCA1, BRCA2 ve RAD51 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

AMAÇ: Bu tez çalışmasında prostektomi uygulanan prostat kanseri tanısı alan hastalarda DNA tamir mekanizmasıyla ilişkili BRCA1, BRCA2 ve RAD51 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ YÖNTEM: Çalışmaya Ocak 2020-Mart 2023 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Ürolojik Onkoloji Bilim Dalı'nda prostektomi uygulanan prostat kanseri tanısı konulan 50 hasta ve 20 sağlıklı kontrol gruplarının kan örneklerindeki ekspresyon değerleri retrospektif olarak çalışıldı. Total RNA'dan sentezlenen cDNA'lardan BRCA1, BRCA2 ve RAD51 genlerinin QRT-PCR yöntemiyle ekspresyon düzeyine bakıldı.

BULGULAR: Elde ettiğimiz verilere göre; BRCA1 ve RAD51 gen ekspresyonları nüks olan hastalarda nüks olmayan hasta grubuna göre yukarı regüle olarak bulundu. Nüks olan prostat kanserli hastalarda BRCA1'in ekspresyon düzeyi anlamlı olarak tespit edildi (p=0.000478). Çalışmamızda, hastaların grade durumlarına göre ekpresyonlara baktığımızda, BRCA1, BRCA2, RAD51 gen ekspresyonları grade grup 1'de grade grup 5'e göre yukarı regüle olarak belirlenmesine rağmen, BRCA1 (p=0.207763), BRCA2 (p=0.454905) ve RAD51 (p=0.267059) ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Yaş grupları açısından ele alındığında, ≤ 60 prostat kanserli bireyleri 61-73 yaş aralığındaki prostat kanserli bireylerle kıyasladığımızda BRCA1 (p=0.012191), BRCA2 (p=0.000012) ve RAD51 (p=0.000006) ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

SONUÇ: Çalışmamızda BRCA1 ve RAD51 gen ekspresyonları prostat kanserli hasta grubunda kontrol grubuna göre aşağı regüle iken BRCA2 gen ekspresyonu yukarı regüle olarak belirlendi. Prostat kanserli hastalarda BRCA1'in ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı tespit edildi (p=0.004561). Sonuç olarak, bu çalışmaya dahil ettiğimiz BRCA1, BRCA2 ve RAD51 genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve işlevlerinin ortaya konulmasıyla prostat kanserinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi konusunda literatüre önemli katkılar sunacağı görüşünü paylaşmaktayız.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, ekspresyon, regülasyon, genler, moleküler mekanizma

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2023-39753

ABSTRACT

Özcan, B. (2024). Investigation of BRCA1, BRCA2, and RAD51 Gene Expression Levels in Prostate Cancer Cases in the Turkish Population. Institute of Health Science, Department of Medical Biology Master's Thesis. İstanbul.

AIM: This thesis study aimed to determine the differences in the expression levels of BRCA1, BRCA2, and RAD51 genes related to the DNA repair mechanism in patients diagnosed with prostate cancer who underwent prostectomy.

MATERIAL METHOD: The study retrospectively examined the expression values in the blood samples of 50 prostate cancer patients and 20 healthy control groups who underwent prostectomy at the Department of Urology, Department of Urology, Istanbul Faculty of Medicine, between January 2020 and March 2023.The expression level of BRCA1, BRCA2, and RAD51 genes from cDNAs synthesized from total RNA was examined by the QRT-PCR method.

RESULTS: According to the data we obtained, BRCA1 and RAD51 gene expressions were found to be upregulated in patients with recurrence compared to the patient group without recurrence. The expression level of BRCA1 was found to be significant in patients with recurrent prostate cancer (p=0.000478). In our study, when we looked at the expressions according to the grade status of the patients, although BRCA1, BRCA2, and RAD51 gene expressions were found to be upregulated in grade group 1 compared to grade group 5, BRCA1 (p=0.207763), BRCA2 (p=0.454905), and RAD51 (p=0.267059) expression levels were not found to be statistically significant. When considered in terms of age groups, when we compared individuals with prostate cancer aged ≤ 60 years with individuals aged 61–73 years, BRCA1 (p=0.012191), BRCA2 (p=0.000012), and RAD51 (p=0.000006) expression levels were found to be statistically significant.

CONCLUSION: In our study, BRCA1 and RAD51 gene expressions were down-regulated in the prostate cancer patient group compared to the control group, while BRCA2 gene expression was up-regulated. The expression level of BRCA1 in patients with prostate cancer was found to be statistically significant (p=0.004561). In conclusion, we share the view that determining the expression levels and revealing the functions of the BRCA1, BRCA2 and RAD51 genes we included in this study will make significant contributions to the literature in elucidating the molecular mechanisms of prostate cancer and developing new treatment strategies.

Key Words: Prostate cancer, expression, regulation, genes, molecular mechanism

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TYL-2023-39753

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri (PCa), Batı toplumlarında erkeklerde en sık görülen katı doku kanseridir. Prostat kanseri oranları ırk, etnik köken ve coğrafyaya göre büyük farklılıklar gösterir [1]. Bu, tarama ve tedaviye erişimdeki farklılıklar, prostat kanseri risk faktörlerine maruz kalmadaki farklılıklar ve prostat karsinogenezinin altında yatan biyolojideki farklılıklar ile ilgili olabilir [2].

PCa için en güçlü risk faktörlerinden biri, hastalığın aile öyküsüdür. Sporadik PCa vakalarının sadece %1-2'sinde mevcut olmasına rağmen, meme kanseri yatkınlık geni 2'deki BRCA2 (meme kanseri 2) germ hattı mutasyonları, bugüne kadar bilinen ve en yüksek PCa riskini (>65 yaş erkeklerde 8,6 kat) veren genetik olaylardandır. BRCA1 (meme kanseri 1), bu gendeki germ hattı mutasyonları PCa vakalarının sadece %0.44'ünde gözlemlenmiş olmasına rağmen, sporadik PCa riskinin artması (3.5 kat) ile ilişkilendirilmiştir [3]. BRCA1 ve BRCA2, tümör baskılayıcı genlerdir ve her ikisi de eksik penetrasyon ile otozomal dominant bir şekilde kalıtılır. Her iki gen de çoklu hücresel yollarda işlev gören büyük proteinleri kodlar [4].

BRCA1, DNA hasar tepkisi ve onarımı, transkripsiyonel düzenleme ve kromatin modelleme gibi bir dizi hücresel süreçle bağlantılı olan hücresel kontrol sistemlerinde önemli rol oynar. Buna karşılık, BRCA2 işlevi, RAD51 Rekombinaz (RAD51) aktivitesinin düzenlenmesinde özellikle önemli olan DNA rekombinasyon ve onarım süreçleri ile sınırlı görünmektedir [5].

BRCA1 veya BRCA2 fonksiyon kaybı, konservatif homolog rekombinasyon (HR) mekanizması ile DNA çift zincir kırıklarının (DSB'ler) onarılmasındaki bir eksiklik ile ilişkilidir. Bu nedenle, hücrelerin bu lezyonları diğer koruyucu olmayan ve potansiyel olarak mutajenik mekanizmalar yoluyla onarması gerekir. Bu genomik kararsızlık, BRCA genlerindeki zararlı mutasyonların neden olduğu kanser yatkınlığının altında yatıyor olabilir, ancak bu mutasyonların özellikle meme, yumurtalık ve PCa gibi bazı spesifik kanser türleri ile ilişkili olmasının nedeni bilinmemektedir [6].

BRCA1 ve BRCA2 genleri, replikasyon sırasında genetik kodun yapısal bütünlüğünü koruyarak DNA onarımında kritik bir rol oynar. BRCA gen ürünlerinin HR koordine ettiği bilinmektedir. BRCA1 ve BRCA2, sentez sırasında ve DNA

hasarından sonra bakteriyel protein RecA'nın bir memeli homoloğu olan RAD51 ile birlikte bulunur. RAD51, DSB onarımında ve HR'da hayati bir rol oynar [7].

BRCA1, RAD51'in sitoplazmadan çekirdeğe taşınmasından sorumludur, oysa BRCA2, RAD51 aracılı onarımda doğrudan yer alır. DNA onarımında RAD51 ve BRCA arasındaki etkileşimi göz önünde bulundurursak, DNA hasarına yanıt olarak BRCA1, RAD51'in sitoplazmadan çekirdeğe taşınmasını kolaylaştırır. Çekirdekte RAD51 rekombinaz, hatasız DNA onarımı sağlamak için RAD51 proteininin BRCA2 ile birlikte yerleşmesine yardımcı olur. BRCA1 geni, genomik stabilitenin korunmasında rol oynayan 190 kD nükleer fosfoproteini kodlar ve aynı zamanda bir tümör baskılayıcı görevi görür [7].

BRCA1 geni, yaklaşık 110 kb DNA'yı kapsayan 22 ekzon içerir. Kodlanmış protein, BRCA1 ile ilişkili genom gözetim kompleksi (BASC) olarak bilinen büyük birçok alt birimli protein kompleksi oluşturmak için diğer tümör baskılayıcılar, DNA hasar sensörleri ve sinyal dönüştürücülerle birleşir. Bu gen ürünü, RNA polimeraz II ile birleşir ve C-terminal alanı aracılığıyla ayrıca histon deasetilaz kompleksleri ile etkileşime girer. Bu protein böylece transkripsiyonda, çift sarmallı kırıkların DNA onarımında ve rekombinasyonda rol oynar [8]. BRCA1'deki mutasyonların, kalıtsal meme kanserinin %45'inden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, BRCA1 taşıyıcılarının kolon kanseri riski 4 kat artarken, erkek taşıyıcılar 3 kat artmış PCa riski ile karşı karşıyadır. BRCA1'den yoksun hücreler, HR yoluyla DNA onarımında kusurlar gösterir [9].

BRCA1'in PCa tümör baskılanmasındaki rolünü ele aldığımızda, BRCA1, androjen reseptörünün (AR) ve Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1 (P21)'in gen ekspresyonunu arttırır, bu da DNA replikasyonunu azaltır ve hücre döngüsü durmasına neden olur. BRCA1 ayrıca, IGF reseptörü (IGFR) promotör gen ekspresyonunu azaltarak insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) aracılı hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu düzenler [10].

BRCA2 geni 27 ekzondan oluşur ve farklı işlevlere sahip, protein alanlarıyla birlikte 3.418 amino asitten oluşan tam uzunlukta bir BRCA2 proteinini kodlar. BRCA2, N terminalinde PALB2 (10-40 arası amino asitler, ekzon 2 ve 3 tarafından kodlanır) ile etkileşime girer, RAD51 ile etkileşime girebilen sekiz BRCA1 C-terminal (BRCT) tekrarı, bir a-helisel alan ve tek sarmallı DNA bağlanmasında yer alan üç

oligonükleotit/oligosakarit bağlanma kıvrımı içerir ve işlevsel olarak farklı bir C-terminali RAD51 etkileşim alanını barındırır [11].

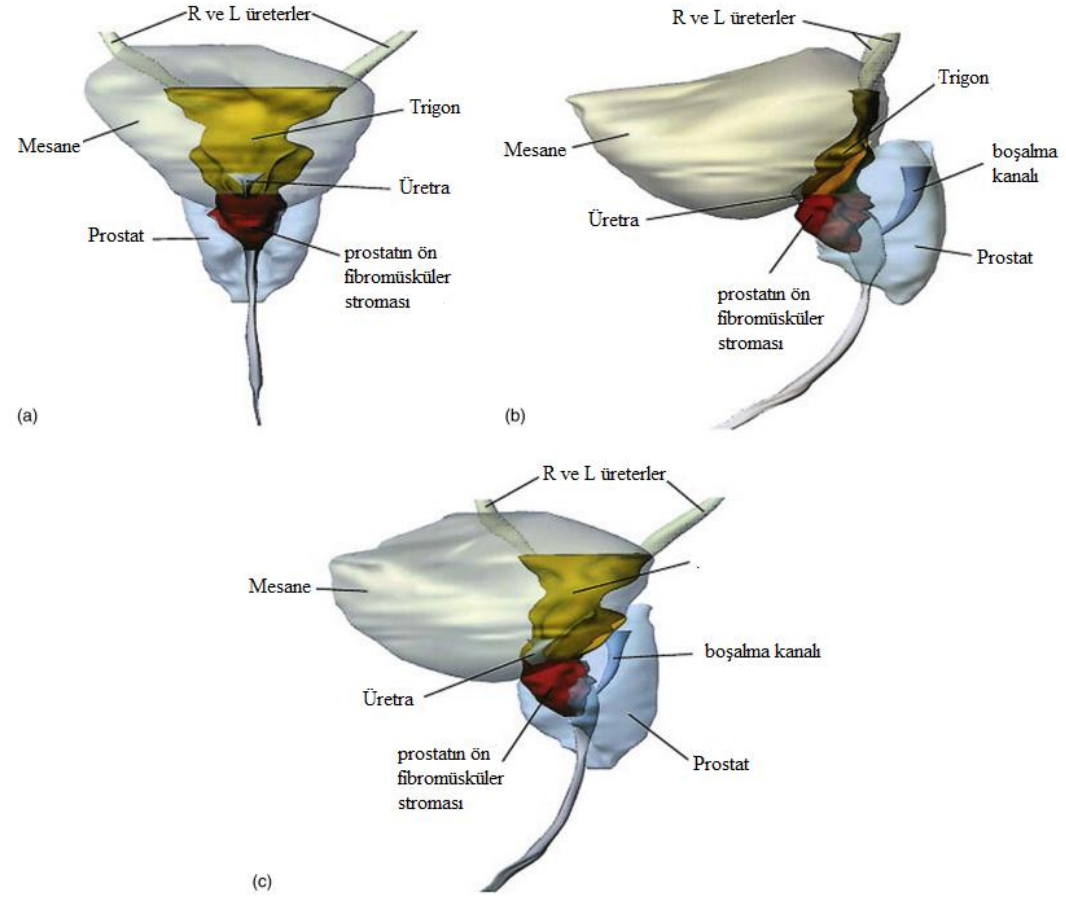
BRCA gen ürünleri, PCa hücre sinyalleşmesine özgü bir dizi önemli reaksiyona sahiptir. BRCA1, bir AR ortak düzenleyicisi olarak işlev görür ve androjen kaynaklı hücre ölümünde olumlu bir rol oynar. Yeh ve meslektaşları, BRCA1'in prostat PCa hücrelerinde AR'nin transaktivasyonunu arttırdığını ve sikline bağımlı bir kinaz inhibitörü olan P21'in AR kaynaklı ekspresyonu ile işbirliği yaptığını göstermiştir. P21 proteini sırayla siklin bağımlı kinaz 2 (CDK2) kompleksi ile eşleşir, fonksiyonlarını ve hücre döngüsü ilerlemesini engeller. Bu mekanizma, yüksek konsantrasyonlarda ifade edildiğinde androjenin PCa hücre büyümesini inhibe ettiği gözlemini açıklar [10].

Araştırmamızda belirlemiş olduğumuz DNA tamir mekanizmasıyla ilişkili BRCA1, BRCA2 ve RAD51 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki farklılıklarının belirlenmesiyle DNA tamir mekanizmasındaki fonksiyonlarının ve birbirleriyle olan ilişkilerinin ortaya konulmasıyla birlikte PCa'nın moleküler mekanizmalarının ortaya konulması mümkün hale gelecektir. Ayrıca, PCa'lı hastaların tedavisine yönelik prognostik açıdan genlerin fonksiyonlarının yol gösterici olabileceği görüşündeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat anatomisi

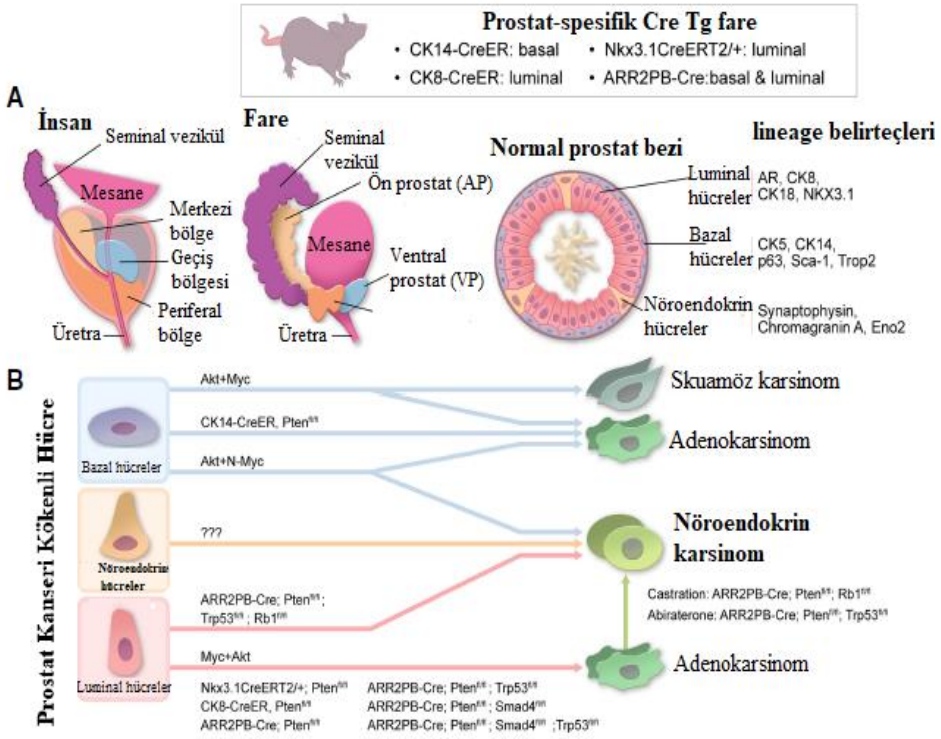
Prostat bezi, fibromüsküler bir stroma içine gömülmüş çeşitli şekil ve boyutlarda asini içerir. Uzunluğundan daha geniş olan prostat yaklaşık 4×3×2 cm boyutlarındadır. Tabanı mesane boynu ile kaynaşmıştır ve tepesinden çıkmak için prostatın uzunluğunu kateden üretra tarafından delinmiştir. Prostatın inferolateral yüzeyleri levator ani tarafından tutulur. Posteriorda prostat, prostatik üretraya açılmak üzere bezden geçen boşalma kanalları tarafından delinir (Şekil 1) [12].



Şekil 1: (a) Önden bakıldığında trigonun üreteral orifislerin altında daraldığı ve mesane boynunun arkasına doğru genişlediği görülmektedir. Trigone, prostatın ön fibromüsküler stroması ile süreklidir. R, sağ; L, sola.

(b) Prostatın trigonal ön fibromüsküler stromasının yandan görünümü bu yapıların süreklilik içinde olduğunu göstermektedir. Trigon mesane boynunun arkasında kalınlaşır ve prostatın önünde fibromüsküler stroma ile birleşir. (c) Trigonal ön fibromüsküler stroma kompleksinin eğik görünümü [12].

İnsan ve fare prostatları, hücresel benzerliklerin yanı sıra anatomik farklılıklar da sergiler (Şekil 2A). Transkriptom profillerine dayanarak, farelerde dorsolateral prostat, insan prostat kanserlerinin yaklaşık %60-75'inin ortaya çıktığı insan prostatının periferik bölgesine eşittir. Hücresel düzeyde, hem insan hem de fare prostatları, luminal, bazal ve nöroendokrin olmak üzere üç tip terminal olarak farklılaşmış epitel hücreli yalancı çok katlı bir epitel içerir. Prostat kanseri için orijin hücresi aktif bir araştırma alanı olmaya devam etse de, prostat kanserinde luminal veya bazal fenotipler gözlenir (Şekil 2B) [13].



Şekil 2: Normal ve neoplastik prostat. (A) İnsan ve mus normal prostatlarının karşılaştırılması. Anatomik olarak, insan prostatı üç bölge içerir: prostat kanserlerinin yaklaşık %60-75'inin ortaya çıktığı periferik bölge; merkez bölge; ve geçiş bölgesi. Buna karşılık, fare prostatı aşağıdaki farklı loblardan oluşur: anterior prostat (AP), ventral prostat (VP) ve dorsolateral prostat (DLP). Luminal hücreler salgı proteinleri

üretir ve sitokeratin 8 (CK8) ve CK18 ve androjen reseptörü (AR) ekspresyonu ile tanımlanır. Bazal hücreler, bazal lamina ve lüminal hücreler arasında yer alır ve yüksek seviyelerde sitokeratin 5 (CK5) ve p63 proteini ve çok düşük seviyelerde AR ifade eder. Nöroendokrin hücreler, küçük bir endokrin-parakrin popülasyonu bazal hücre tabakasında bulunan hücreler, sinaptofizin ve kromogranin A gibi nöroendokrin belirteçleri ifade eder ve AR'yi ifade etmez.

B) PCa hücresi. Çalışmalar, hem lümen hücrelerinin hem de bazal hücrelerin prostat kanseri için kaynak hücre olarak hizmet edebildiğini göstermiştir; bununla birlikte, nöroendokrin hücrelerin PCa oluşturmak üzere dönüştürülüp dönüştürülemeyeceği bilinmemektedir. Yapısal olarak aktif miristoillenmiş AKT1 (myr-AKT1) gibi onkogenlerin aşırı ekspresyonu, normal insan prostat epitel hücrelerini, PCa ve skuamöz hücreli karsinom fenotipleri sergileyen PCa hücrelerine dönüştürür. Ayrıca normal prostat epitel hücrelerinde bulunan Nöroblastom geni (N-Myc) ve myrAKT1, prostat adenokarsinomu venöroendokrin PCa (NEPC) oluşumu ile sonuçlanmıştır. Tümör baskılayıcı genler Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu (Pten), small mothers against decapentaplegic 4 (Smad4) ve tümör protein53 (Trp53)'ün hem bazal hücrelerde hem de luminal hücrelerde (ARR2PB-Cre), bazal hücrelerde (CK14-CreER) ve luminal hücrelerde (CK8-CreER) koşullu inaktivasyonu, PCa oluşumuyla sonuçlanmıştır. İlginç bir şekilde, Pten, retinoblastoma geni (Rb1) ve Trp53'ün etkisizleştirilmesi NEPC oluşumuyla sonuçlandı. Pten/Rb1 eksikliği olan PCa taşıyan farelerde hadım etme veya Pten/Trp53 eksikliği olan PCa abirateron tedavisi NEPC oluşumuyla neticelenmiştir [13].

2.2. Prostat bezi histolojisi

Prostat mesanenin altında bulunur ve rektumun önünde bulunur. Prostat, idrarın mesaneden akışını sağlayan kanal olan prostatik üretrayı çevreler. İnsan prostatı farklı histolojik bölgelere (periferik, geçiş ve merkezi bölgeler) sahip tek bir bezdir. Periferik bölge, prostatın dış kısmını distal olarak sarmaktadır ve PCa'ların çoğunluğunun köken bölgesidir. Normal prostat dokusunun yaklaşık %70'ini oluşturur. İnsan prostat glandüler epiteli üç tip hücreyle kaplı asinus ve kanallardan oluşur: luminal, bazal ve nöroendokrin. Asinüsler çoğu durumda dalgalı veya papiller bir görünüme sahiptir. Bu papiller konfigürasyon, merkezi bölgede belirgin şekilde daha belirgindir. Luminal

hücreler sütunlu, soluk eozinofilik sitoplazmalı ve hücre tabanına yakın yuvarlak çekirdeklidir [14].

2.3. Bening (iyi huylu) prostat hiperplazisi

İyi huylu prostat hiperplazisi (BPH), yaşlanan erkeklerde en sık görülen iyi huylu neoplazmdır ve yaşamın dördüncü on yılındaki erkeklerin yaklaşık %8'inde, ancak dokuzuncu on yılda erkeklerin %90'ına kadar mevcut olur. BPH, genellikle alt idrar yolu semptomları (LUTS) olarak adlandırılan, neden olabileceği potansiyel semptomları değil, prostatın boyutundaki değişikliği ifade eder. LUTS öncelikle irritatif, obstrüktif veya karışık olabilir. BPH'li erkekler asemptomatik olabilir, yaşam tarzı değişikliklerine yanıt verebilir veya tıbbi veya cerrahi tedaviye ihtiyaç duyabilir; erkekler yaşlandıkça semptomlar daha sık görülür [15]. Genetik ve kalıtsal faktörler çok çeşitli hastalık süreçlerini etkiler ve bunların BPH'deki rolleri incelenmiştir. BPH gelişimi için kalıtsal bir etki, dizigotik ikizlerle karşılaştırıldığında monozigotik ikizlerde hastalık uyumunun 3.3'lük bağıl riskinde artış ve BPH hastalığının erken başlangıcı olan kardeşlerde artan insidans riskinde gösterilmiştir [16].

2.4. Prostat kanseri

PCa, Amerika Birleşik Devletleri'nde 50 yaşın üzerindeki erkeklerde sıklıkla tespit edilen bir kanserdir [13]. Türkiye'nin üçüncü büyük şehri İzmir'de 1993-2002 yılları arasında gerçekleştirilen ilk kapsamlı epidemiyolojik çalışmanın yayınlanmasına kadar, Türkiye'de PCa görülme sıklığına ilişkin güvenilir bir veri bulunmamaktadır. 1993-1997 döneminde PCa'nın İzmir'de yaşa standardize insidansı 8,9/100.000 ile beşinci en sık görülen kanser olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışma, 1998-2002 yılları arasında İzmir'de PCa oranının 13,8/100.000'e yükseldiğini, Avrupa ülkelerinin çoğunda nispeten daha düşük oranların görüldüğünü, aynı dönemde Asya toplumunda ise iki ila üç kat daha yüksek oranların bildirildiğini göstermiştir [17].

Son terapötik gelişmelere rağmen, PCa hala önemli morbidite ve mortalite ile ilişkili önemli bir ürolojik hastalığı temsil etmektedir. Androjen yoksunluğu tedavisi (ADT), ilerlemiş ve metastatik PCa'lar için temel tedavi olmuştur. Başlangıçtaki yüksek yanıt oranlarına rağmen, ADT ile kanser tedavisinin süresi sınırlıdır; ADT'yi takiben neredeyse tüm erkekler sonunda ilerleyici PCa geliştirir. Bu, kastrasyona dirençli prostat kanseri (CRPC) olarak adlandırılır. Bu ilerlemeye, AR'ye bağlı direnç mekanizmaları ve bir glukokortikoid reseptörü adaptif direnç mekanizması dahil ancak

bunlarla sınırlı olmamak üzere bir dizi mekanizma neden olabilir. CRPC ayrıca sık sık meydana gelen bir AR ekleme varyantı tarafından da sağlanır. En yaygın varyantlardan biri AR varyantı 7'dir (ARv7) [13].

2.5. Klinik bulgular

PCa genellikle hastalığın ileri evrelerine kadar semptomlara neden olmaz. Lokal semptomlar, idrar yapma sıklığında artış ve idrara çıkma zorluğuyla birlikte BPH'I taklit edebilir. PCa'nın ilk belirtileri metastazdan kaynaklanabilir. Bölgesel pelvik lenf düğümleri ve kemikler, metastatik yayılımın en sık görüldüğü anatomik bölgelerdir, ancak yalnızca kemik tutulumu sürekli olarak önemli semptomlara neden olur. Böylece hastalar sırasıyla omurga, kaburga, pelvis, femur ve omuz kemiklerindeki karsinomun neden olduğu bel, göğüs ve üst sırt, kalça, bacak ve omuz ağrılarıyla başvurabilmektedir. Nadiren kemiklere metastatik yayılım nedeniyle patolojik kırıklar meydana gelir. Nörolojik semptomlar metastatik hastalığı olan hastalarda sık görülen bir şikayettir ancak genellikle semptom göstermezler. Nadiren başka bölgelere yayılma semptomlara neden olabilir ve bu genellikle bilinen, geniş çapta yayılmış hastalık ortamında meydana gelir. Metastatik PCa ile ilişkili hematolojik anormallikler nadirdir ve anemi ve yaygın intravasküler koagülopatiyi içerir [18]. Hastalığın son derece heterojen davranışı göz önüne alındığında, klinik riski sınıflandırmak ve hastaya en iyi tedavi seçeneklerini sunmak için prognostik faktörlere büyük ihtiyaç vardır. Prostat spesifik antijen değeri ve türevleri gibi klinik faktörler ve evre ve Gleason derecelendirmesi gibi patolojik faktörler iyi bilinen prognostik faktörlerdir. Nomogramlar her klinik senaryoda yararlı tahminler sağlayabilir [19].

2.6. Prostat kanseri patolojisi

PCa tanısı için spesifik olduğu düşünülen histolojik özellikler arasında bezlerin ekstraprostatik yayılımı ve prostat içinde perinöral invazyon bulguları, kollajenöz mikronodüller ve glomerüloid intraglandüler projeksiyon yer alır. Perinöral invazyon PCa'nın ayırt edici özelliğidir. Tüm prostat bezlerinde perinöral invazyon vakaların büyük çoğunluğunda bulunabilir ve literatürdeki aralık %84-94'tür. Prostatik epitel hücrelerinin lenfovasküler alan invazyonu da malignite tanısı için spesifik olarak görülebilir. Müsinöz fibroplazi olarak da bilinen kollajenöz mikronodüller, prostatın invaziv adenokarsinomuna alışılmadık bir yanıtı temsil eden hyalinize stromanın mikroskopik agregatlarıdır [20].

İntraduktal proliferasyonların ana farkı, yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi (HGPIN), intraduktal prostat karsinomu (IDC) ve ürotelyal karsinomun prostatik kanallara yayılmasıdır. Bu lezyonların tümü, bu lezyonları invaziv karsinomdan ayıran, p63 ve/veya yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin (34bE12) genellikle alfa metil asil koenzim A rasemaz (AMACR) ile birlikte bir kokteylde kullanılır) gibi antikorlarla immünohistokimyasal olarak gösterilebilen, tutulan bir bazal hücre katmanına sahiptir. HGPIN benzeri adenokarsinomlar tarif edilmiştir, ancak bunlarda da bazal hücreler yoktur. Bazal hücreler için immün boyama, ayırıcı tanının IDC'ye karşı invazif karsinom olduğu ve ayrımın Gleason skorlaması üzerinde bir etkisi olacağı durumlarda öncelikle önerilir (örn., aksi halde iyi oluşmuş invaziv tümör bezlerinin olduğu bir arka planda cribriform IDC'ye karşı cribriform invaziv karsinom) [21].

Bazal hücre belirteçlerinin kullanımı, aynı zamanda yüksek dereceli invaziv karsinomu da barındıran vakalarda muhtemelen yararlı değildir, çünkü bu ortamda IDC'nin varlığı özellikle önemli değildir. HGPIN'in IDC'den ayrılması yalnızca morfolojik açıdan zor olabilir ve bazıları bu lezyonları ayırt etmek için PTEN immün boyamasının kullanılmasını önermiştir: IDC sıklıkla PTEN kaybı ve ETS ile ilişkili gen (ERG)için reaktivite gösterirken, HGPIN'de bunun tersi bulgular vardır. Bununla birlikte, morfoloji açısından IDC'ye karşı HGPIN için şüpheli olan atipik intraduktal proliferasyonlar, PTEN boyanması korunduğunda %50'ye kıyasla, PTEN kaybolduğunda yeniden biyopsi vakalarının %64'ünde invaziv karsinom ile ilişkilidir [21].

2.7. Evreleme

PCa’nın optimal yönetimi için doğru tümör tespiti ve hastalık boyutunun belirlenmesi önemlidir. İndeks prostat lezyonunun tanımlanmasıyla başlayan hastalık aşaması, ardından primer tümör, lenf nodu ve uzak metastaz değerlendirmesi, yalnızca prognostik ve prediktif değere sahip olmakla kalmayan, aynı zamanda hasta yönetimine rehberlik eden önemli klinik bilgiler sağlar. PCa’nın birincil evrelemesi, klinik PCa şüphesi olan biyopsi almamış hastalarda anormal lezyonların saptanması (örn. yüksek serum prostat spesifik antijen (PSA) seviyeleri veya pozitif dijital rektal muayene); PCa ‘ya ilişkin klinik şüphenin devam etmesine rağmen biyopsi sonuçları negatif olan

hastalarda kanserin saptanması (örn. yükselen PSA); veya biyopsi ile kanıtlanmış PCa olan hastalarda evreleme olmak üzere çeşitli klinik senaryolara uygulanabilir [22].

Prostat Adenokarsinomu için 2002 TNM Sınıflandırması, T (birincil tümör), N (lenf düğümleri) ve M (metastazlar) kategorilerine dayanmaktadır. T kategorisi klinik muayene, görüntüleme, endoskopi, biyopsi ve biyokimyasal testlere dayanmaktadır. N kategorisi, klinik muayene veya görüntülemeye dayalıdır. M kategorisi klinik muayene, görüntüleme, iskelet çalışmaları ve biyokimyasal testlere dayanmaktadır. Aşamalar Tablo 1'de verilmiştir [23].

Tablo 1: 2002 TNM Sınıflandırması [23]

Birincil tümör
TX Primer tümör değerlendirilemez;
TO Birincil tümör kanıtı yok;
T1 Klinik olarak belirgin olmayan tümör, palpe edilemeyen
ne de görüntüleme ile görünür;
T1a Tümör (palpabl olmayan), rezeke edilen %5 dokuda prostatın transüretral rezeksiyonunda rastlantısal histolojik bulgu olarak;
T1b Tümör (palpe edilemeyen) prostatın transüretral rezeksiyonunda rezeke edilen dokunun > %5'inde rastlantısal histolojik bulgu olarak;
T1c Tümör (palpe edilemeyen) iğne biyopsisi ile tanımlanır (yüksek serum PSA için): iğne biyopsisinde bilateral ele gelmeyen tümörü içerir;
T2 Görüntülemede elle hissedilen veya görülebilen veya radikal prostatektomi örneğinde (p-ön eki ile) gösterilen prostat içinde (prostat apeksi, prostat kapsülü dahil) sınırlı tümör;
T2a Bir lobun yarısını veya daha azını tutan tümör;
T2b Tümör bir lobun yarısından fazlasını tutuyor, ancak her iki lobu da tutmuyor;

T2c Her iki lobu tutan tümör;
T3 Tümör prostat kapsülü boyunca uzanır;
T3a Ekstra kapsüler uzantı (ECE);
T3b Seminal vezikül(ler)in invazyonu;
T4 Tümör sabitlenmiş veya komşu yapıları invaze etmiş: mesane boynu, dış sfinkter, rektum, levator kasları ve pelvik duvar;
Bölgesel lenf düğümleri

Pelvik lenf nodları, ana iliak arterlerin bifurkasyonunun altındakiler olarak tanımlanır.
NX Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez;
N0 Bölgesel lenf düğümü metastazı yok;
N1 Gerçek pelvis içinde, ortak iliak arter bifurkasyonunun altında, tek taraflı veya iki taraflı bölgesel lenf nodu metastazları;
Metastazlar
MX Uzak metastazlar değerlendirilemez;
M0 Uzak metastaz yok;
M1a Bölgesel olmayan lenf nodu metastazı;
M1b Kemik(ler)e metastaz;
M1c Diğer metastaz bölgeleri

2.8. Tanı ve tedavi

PCa tanısı, iğne biyopsisi ile elde edilen prostat dokusunun mikroskobik olarak değerlendirilmesine dayanır. Geleneksel olarak, ızgara benzeri bir modelde 10 ila 12 doku örneği elde etmek için transrektal ultrason kullanılarak sistematik bir prostat biyopsisi gerçekleştirilir. Bir patolog bu örnekleri inceler ve hücrelerin mikroskobik mimarisine ve görünümüne dayalı olarak her ikisi de 1 ila 5 arasında bir ölçekte, baskın

histolojik model için birincil Gleason derecesi ve en yüksek model için ikincil bir derece verir. Klinisyenler geleneksel olarak tanıyı Gleason modellerinin toplamına, prostat spesifik antijen (PSA) düzeyine ve klinik evreye dayalı olarak düşük, orta ve yüksek risk olarak sınıflandırmıştır. Her risk grubu içinde heterojenlik bulunduğundan, daha ayrımcı araçlar geliştirilmiş ve onaylanmıştır (Tablo 2) [24].

Tablo 2. Prostat Kanseri İçin Risk Sınıflandırma Şeması [24]

Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı Risk Sınıflandırması
Çok düşük risk
T1c'nin klinik evresi, Gleason skoru 6 veya daha az, PSA seviyesi 10 ng/mL'den az, 3 biyopsiden az her bir çekirdekte %50 veya daha az kanser varlığı olan çekirdekler, ve 0,15 ng/mL/g'den düşük PSA yoğunluğu
Düşük risk
T1 ila T2a klinik evresi, Gleason skoru 6 veya altında ve PSA seviyesi 10 ng/mL'den düşük
Ara risk
T2b ila T2c klinik evresi, Gleason skoru 7 veya PSA seviyesi 10 ila 20 ng/mL
Yüksek risk
T3a'nın klinik evresi, Gleason skoru 8 ila 10 veya PSA seviyesi 20 ng/mL'den yüksek
Çok yüksek risk
T3b ila T4 klinik evresi, birincil Gleason paterni 5 veya Gleason skoru 8 ila 10 olan 4'ten fazla biyopsi çekirdeği
Prostat Kanseri Nomogramları
Hastalığın yayılma olasılığını (%0-%100) hesaplar, biyokimyasal nüks, yaşa bağlı kansere özgü sağkalım, PSA düzeyi, klinik evre, Gleason skoru, kansera karışan biyopsi korlarının yüzdesi

Prostat Kanseri Risk Değerlendirmesi
Yaş, PSA seviyesi, Gleason paterni 4 veya 5, klinik evre, kanserle ilgili biyopsi korlarının yüzdesine göre 0'dan 10'a kadar puanlama sistemi
Düşük risk puanı: 0-2
Orta seviye risk puanı: 3-5
Yüksek risk puanı: 6-10
Uluslararası Hastalıklar Derneği'nin Patolojik Derecelendirme Sistemi
Ürolojik Patoloji
1. derece kanser: Gleason skoru 3+3
Yalnızca bireysel, ayrı, iyi biçimli bezler
2. derece kanser: Gleason skoru 3 + 4
Zayıf biçimli, kaynaşmış veya beşik biçimli bezlerin daha az bileşeni ile ağırlıklı olarak iyi biçimli bezler
3. derece kanser: Gleason skoru 4 + 3
İyi biçimli bezlerin daha az bileşeni ile ağırlıklı olarak zayıf biçimli, kaynaşmış veya beşik biçimli bezler
4. derece kanser: 4 + 4, 3 + 5 ve 5 + 3 Gleason skorları
Yalnızca zayıf biçimli, kaynaşmış veya beşik biçimli bezler veya iyi biçimli bezler artı bezlerin bulunmadığı alanlar
5. derece kanser: 4 + 5, 5 + 4 ve 5 + 5 Gleason skorları
Zayıf biçimli, kaynaşmış veya beşik biçimli bezler olsun veya olmasın, bez oluşumundan (veya nekrozdan) yoksundur

2.9. Prostat kanserinin prognozu

PCa, moleküler düzeyde oldukça heterojen bir hastalıktır. Tümör genomiklerinin değerlendirilmesi, çeşitli yolları içeren çok sayıda somatik değişikliği ortaya koymaktadır. Bu genomik değişikliklerin birçoğunun klinik ilerleme ve onkolojik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir ve umut verici prognostik biyobelirteçler olarak ortaya çıkmaktadır. Fosfataz ve tensin homologu veya PTEN, PCa'da yaygın olarak delesyona uğrayan bir tümör baskılayıcı gendir. Kaybı, PI3K'nın karşı konulmaz aktivitesine ve onkojenik Akt/mTOR sinyal yolaklarının akış aşağı yukarı regülasyonu ile sonuçlanır. PTEN genomik delesyonu, cerrahi olarak tedavi edilen tümörlerin yaklaşık %15 ila %20'sinde rapor edilir ve primer prostat tümörlerinde sıklıkla bir fokal ve subklonal olay olarak ortaya çıkar, ancak hem homojen hem de heterojen protein kaybı, genetik olarak doğrulanmış bir IHC assay ile güvenilir bir şekilde tespit edilebilir [25].

2.10. Prostat kanserinin genetiği

PCa evrimi, hastalığın ilerlemesini sağlayan genomik değişikliklerin edinilmesine bağlıdır. ETS Transkripsiyon Faktörü (ERG), Benek Tipi BTB/POZ Proteini (SPOP), hücre büyümesini kontrol eden gen olan MYC Proto-Onkogen, BHLH Transkripsiyon Faktörü (MYC) ve AR değişiklikleri dahil olmak üzere PCa "başlangıcını yönlendiren bir dizi genomik değişiklik tanımlanmıştır. Tedavi edilmemiş birincil PCa'nın moleküler manzarası üzerine yapılan çalışmalar, altta yatan moleküler sapmalar tarafından tanımlanan farklı moleküler alt tipleri tanımlamıştır. SPOP, bir E3 ligaz adaptör proteinidir ve genellikle klinik olarak lokalize ve metastatik prostat kanserlerinde mutasyona uğrar (toplamda yaklaşık %10); ve PcA'nın ayrı bir moleküler alt sınıfını tanımlar. SPOP mutasyonlarının PCa'daki biyolojik önemi ayrıntılı olarak incelenmiştir. Mutant SPOP'un koşullu bir fare modelinde (PTEN kaybı ortamında), SPOP'un prostat tümörü oluşumlarını tetiklediğini doğrulayan neoplastik lezyonların oluşumuna yol açtığı tespit edilmiştir. Mutant SPOP, fare prostat organoidlerinde insan PCa ile tutarlı artan proliferasyon ve transkripsiyonel işaretler sağlamıştır. Ayrıca bu çalışmalar, mutant SPOP'un fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) , mTOR sinyalinin memeli hedefini aktive ettiğini ve AR ile ilişkili transkripsiyon faktörleri ve ko-aktivatörlerin bir ağını yukarı regüle ettiğini göstermiştir [26].

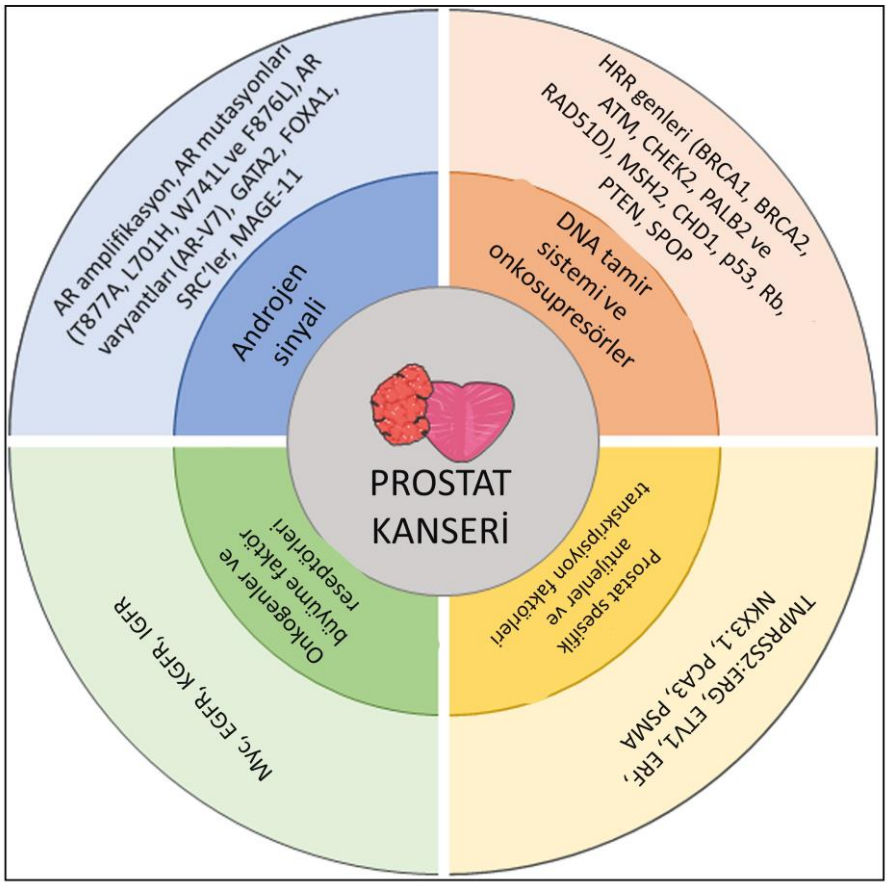
2.11. Kalıtsal prostat kanseri

PCa klinik olarak çok heterojen bir hastalıktır; aslında birçok hasta progresyon ve metastaz ile agresif bir hastalık gösterirken, diğer hastalar progresyon eğilimi düşük olan yavaş bir hastalık gösterir. Histolojik olarak bu tümörler, biyotik prostat örneğinin normal prostat bezine ne kadar benzediğini değerlendiren Gleason skoru ile ölçülür. Sporadik vakalarla karşılaştırıldığında, Kalıtsal prostat kanseri (HPCa), erken yaş başlangıcı, agresif hastalık ilerlemesi ve lokal olarak ileri evre ile karakterizedir. Ayrıca, HPCa'lı erkeklerin ameliyattan sonra nüks riski daha yüksekken, HPCa ile sporadik PCa arasında genel sağkalım açısından çok fazla fark yoktur. Ailede PCa öyküsü, kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri (HBOC) sendromu ve Lynch sendromu (LS), PCa gelişimi için yaş, ırk, etnik köken ve çevresel faktörlerle karşılaştırıldığında en önemli risk faktörleri arasındadır ve bu risk %40-%50 olarak tahmin edilmektedir. Bir erkek kardeşi veya babası PCa teşhisi konan erkeklerde PCa gelişme riski iki ila dört kat daha fazladır. HPCa, erkeklerde herhangi bir büyük kanser arasında en yüksek kalıtım derecesine sahiptir. PCa hastalığın erken evresinde asemptomatik olduğundan, erken teşhis için bireyselleştirilmiş bir yaklaşım geliştirmek kritik öneme sahiptir. Zamanla, ailesel PCa risklerinin ~%33'ünü oluşturan HPCa için yaklaşık 170 duyarlılık lokusu, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile tanımlanmıştır. Daha ileri görüşler, farklı DNA hasar onarım (DDR) genlerindeki (BRCA1, BRCA2, CHEK2, ATM ve PALB2) ve DNA uyumsuzluk onarım genlerindeki (MMR) (MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2) mutasyonların HPCa'nın biyobelirteçleri olduğunu ortaya koymuştur. Daha da önemlisi, birçok genin HPCa riski ile açık bir ilişkisi olsa da, diğerleri, tam olarak tanımlanmamış bir kanser riski ile hala bilinmeyen bir klinik öneme sahiptir. Ayrıca, bazı genlerdeki mutasyonun prostat kanserinde poli-ADO riboz polimeraz (PARP) inhibitörlerine ve platin bazlı kemoterapiye yanıtı tahmin edebileceğine dair güçlü kanıtlar ortaya çıkmaktadır [27].

2.12. Moleküler mekanizmaları

PCa'nın histolojik değerlendirmesi, tümör evrelemesini değerlendirmek ve prognostik bir projeksiyon sağlamak için çok önemlidir. İlginç bir şekilde, birkaç gen mutasyonunun PCa başlangıcı ve evrimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve bu da tümör agresifliği ve terapi yanıtı hakkında temel bilgiler sunmaktadır. Bu değişikliklerin özellikle androjen sinyallemesini, DNA onarım sistemlerini, onkogenleri ve

onkosüpresörleri, prostata özgü antijenleri ve transkripsiyon faktörlerini etkilediği bilinmektedir (Şekil 3) [28].



Şekil 3: PCa'da moleküler mekanizmalar ve genetik değişiklikler. PCa'da gözlemlenen ana gen mutasyonları şunları içerir: androjen sinyali; DNA onarım sistemi ve onkosüpresörler; prostata özgü antijenler ve transkripsiyon faktörleri; onkogenler ve büyüme faktörü reseptörleri [28].

2.13. Prostat kanseri epidemiyolojisi ve etiyolojisi

PCa, 2020'de tahmini 1,4 milyon yeni vakayla, dünyadaki ülkelerin yarısından fazlasında (185 ülke/bölgeden 112'si) erkekler arasında en sık teşhis edilen kanserdir. En yüksek yaşa standardize insidans oranları Kuzey ve Batı Avrupa, Karayipler, Avustralya/Yeni Zelanda, Kuzey ve Güney Amerika ve Güney Afrika'da görülmektedir. PCa, 2020 yılında tahmini 375.000 ölümle, dünya ülkelerinin dörtte birinde (185 ülkenin 48'inde) erkekler arasında kanserden kaynaklanan ölümlerin önde gelen nedenidir.

Yaşa göre standardize edilmiş en yüksek ölüm oranları Karayipler'de (Barbados, Jamaika ve Haiti), Güney Amerika'nın bazı kısımlarında ve Sahra altı Afrika'da görülmektedir. PCa insidansı ve mortalitesindeki küresel farklılıklar, tarama, görüntüleme, bakıma erişim ve sağlık altyapısındaki farklılıklara bağlanabilir. Buna ek olarak, popülasyonlar arasındaki germ hattı genetik faktörlerinin yanı sıra yaşam tarzı faktörlerindeki farklılıkların da coğrafi farklılıkların altında yatabileceğini öne süren yeni veriler mevcuttur. PCa, lokalize aşamalarda tanı konulduğunda ve tedavi edildiğinde, metastatik ortamda %30'a kıyasla, 5 yıllık kansere özgü sağkalım oranı %97'dir [29].

2.14. Prostat kanseri ve BRCA1, BRCA2 genleri

Meme kanserine yatkınlık oluşturan genler BRCA1 ve BRCA2 genleri, DNA onarım genleri ve transkripsiyon düzenleyicileri olarak önemli bir role sahiptir ve ayrıca yumurtalık, prostat ve pankreas kanserinde de rol oynarlar. Germ hattı mutasyonları arasında BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genler, eksik penetrasyonla otozomal dominant bir şekilde kalıtsaldır. Tümör oluşumunun gerçekleşmesi için vahşi tip alelin etkisiz hale getirilmesi gerekir. BRCA1 geni, DNA hasarı tepkisi ve onarımı, kromatin modellemesi ve transkripsiyonel düzenleme gibi hücresel kontrol sistemlerinde yer alan büyük proteinleri kodlar. BRCA1, PCa gelişiminde çok önemli bir sinyal yoluna aracılık eden androjen reseptörünü (AR) düzenler. Bununla birlikte IGF-1'in AR'ye bağlı bir şekilde düzenlenmesi de BRCA1 geninin bir etkisi olarak tarif edilmiştir. Ayrıca Bednarz ve arkadaşları, radikal prostatektomi ile tedavi edilen sporadik prostat kanseri hastalarından oluşan bir kohortta, ileri tümör evresi olasılığının daha yüksek olduğunu ve somatik BRCA1 kaybıyla ilişkili hastalıksız hayatta kalma oranının azaldığını bulmuştur. Somatik BRCA1 kaybı, hipermetilasyona veya promotörün delesyonuna bağlıdır [30].

BRCA1'in kanserdeki diğer mekanizmaları arasında gevşek uçlu rezeksiyonun teşvik edilmesi ve RAD51'in DNA'ya yüklenmesine yardımcı olması, DSB'lerde bağlanmada p53 bağlayıcı protein 1 (53BP1) ile rekabet etmesi ve onarımın HR'ye mi yoksa NHEJ'ye mi yönlendirildiğinin belirlenmesine yardımcı olması yer alır. BRCA2 geninde, oligonükleotit/oligosakarit bağlama alanı 1 (OB1) ve Tower alanı 2'nin (OB2) en yüksek PCa riski ile ilişkili olduğu bir PCa küme bölgesi (PCCR) tanımlanmıştır.

BRCA2'nin işlevi, özellikle RAD51 aktivitesinin düzenlenmesinde, DNA rekombinasyonu ve onarım işlemleriyle sınırlıdır [30].

Tümör baskılayıcı genler BRCA1 ve BRCA2'deki zararlı mutasyonlar, yüksek meme ve yumurtalık kanseri riskleri ile ilişkilidir ve PCa'ya genetik duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir. Retrospektif çalışmalar, BRCA2 mutasyonlarının 2-6 aralığında PCa'nın göreceli riskleri (RR'ler) ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bildirilen RR tahminleri daha genç yaşlar için daha yüksek iken, <65 yaş olanlar için 6-9 aralığında bulunmuş ve BRCA2 taşıyıcıları daha sık olarak agresif PCa ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. BRCA1 mutasyonları ile PCa riski arasındaki ilişkinin kanıtı, 0,3-4 aralığında bildirilen RR'ler ile tutarlıdır [31].

2.15. Prostat kanseri ve RAD51

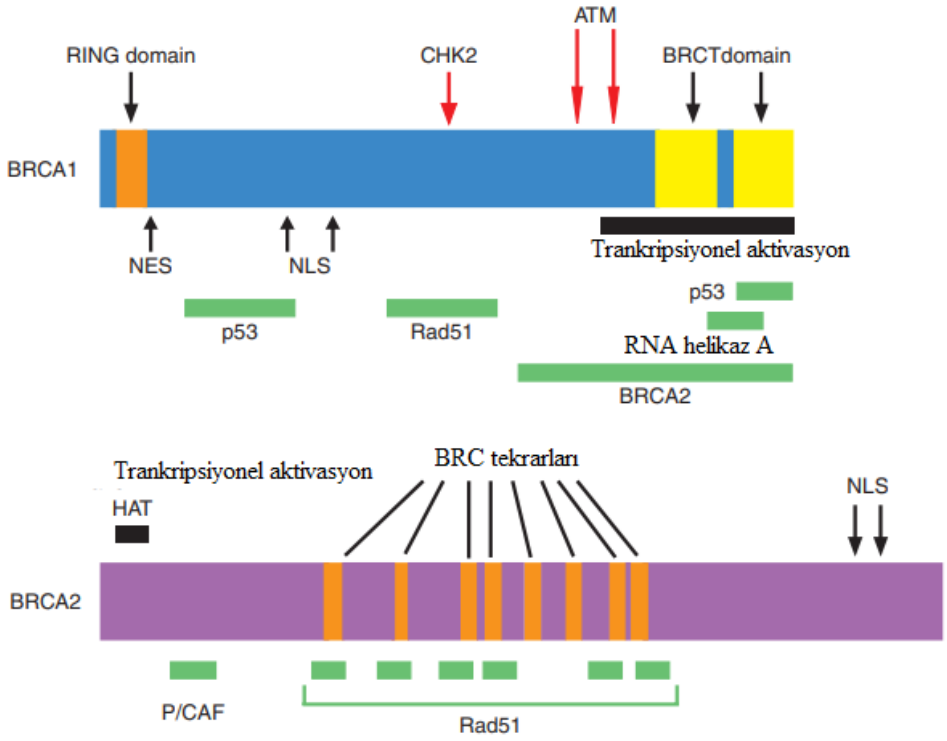
RAD51, insan kromozomu 15q15.1'de bulunan RAD51 geni tarafından kodlanan ve DSB'ler, HR onarımında kritik bir rol oynayan, evrimsel olarak korunmuş bir enzimdir. RAD51 proteini, mitotik hücrelerde nükleer odaklarda (ayrık alt nükleer yapılar) BRCA2 proteini ile birlikte yerleşir. Bu odakların hem DNA hasarından önce hem de sonra BRCA1 bağlayıcı protein BARD1 ile birlikte BRCA1 içerdiği gözlenmektedir. RAD51 odakları, S fazı sırasında ortaya çıkar ve durmuş veya bozuk DNA replikasyon çatallarını başlatmak için gereklidir. RAD51 rekombinaz, normal rekombinasyon ve genom stabilitesi için gerekli bir etkileşim olan BRCA2 ile doğrudan ilişkilidir. DSB'lere yanıt olarak hatasız HR'nin gerçekleşmesi için BRCA2 ve RAD51 arasındaki etkileşim esastır. BRCA2, RAD51 aracılı onarımda doğrudan yer alırken, BRCA1 bu yolların yukarısında hareket eder. BRCA1'in, RAD51'in sitoplazmadan çekirdeğe ve DNA hasarı bölgelerine taşınması için gerekli olduğu düşünülmektedir. BRCA2, RAD51'de bulunmayan nükleer yerelleştirme sinyallerini içerir ve bu, BRCA2'nin çekirdeğe RAD51 taşınmasını da kolaylaştırdığı fikrini destekler. Bununla birlikte, RAD51'in BRCA1 ile doğrudan etkileşimi henüz tam olarak açıklanamamıştır, ancak gen ekspresyon profili ve ağ modellemesi, BRCA1'in tümör oluşumuna dahil olma mekanizmalarında karmaşık bir heterojenliği ortaya çıkarmıştır [32].

DSB'nin tanınmasında yer alan ilk aktive edilmiş kompleks, DNA bağlama kabiliyeti nedeniyle DNA hasar bölgelerine yapışan MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) kompleksidir. DSB ayrıca, rolü hücre döngüsü kontrol noktası ve DNA onarım yollarını koordine etmede yatan ATM ve ATR kinazlarını da aktive eder. DNA kopmalarının son

homolojiye yönelik onarımı (HDR) için, BRCA1 ile işbirliği yapan kontrol noktası düzenleme faktörleri PALB2 ve BRCA2'nin aracılık ettiği RAD51 nükleofilamentlerinin oluşumu çok önemlidir. RAD51 nükleofilamentleri, RAD51C/D paralogları ile birlikte homoloji araştırmasına aracılık eder, kardeş kromatidi yeni bir DNA zinciri sentezi için bir şablon olarak hazırlar ve kullanır [33].

BRCA1'in hasarlı DNA'nın onarımındaki rolünü öne süren ilk kanıt, BRCA1'in DNA hasarına yanıt olarak hiperfosforile olduğu ve çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) ile işaretlenen replikasyon çatallarının bölgelerine yeniden yerleştirildiği gözleminden elde edilmiştir. İyonlaştırıcı radyasyona yanıt olarak BRCA1, ataksi-telanjiektazi mutasyonlu (ATM) kinaz tarafından bağlanır ve fosforile edilir. İyonlaştırıcı radyasyondan sonra ATM fosforilasyonunun ana hedefi BRCA1'in Ser1387'sidir. Ultraviyole ışınlamaya yanıt olarak Ser1457, esas olarak ATM ile ilişkili kinaz (ATR) tarafından öncelikle fosforile edilir. G2/M kontrol kinazı CHK2'nin, iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma durumunda Ser988'de BRCA1'i fosforile ettiği gösterilmiştir (Şekil 4) [5].

Yakın zamanda yapılan bir çalışma, p53'ün BRCA1'in aşırı ekspresyonuyla stabilize edildiğini göstermekte; bu da BRCA1'in p53 yollarını uyarma işlevi gördüğünü öne sürmektedir. Diğer çalışmalar, BRCA2'nin aşırı ekspresyonunun, bazal p53 transkripsiyonel aktivitesinin aşağı regülasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Buna karşılık BRCA2, histon asetilasyonunu modüle ederek transkripsiyonu aktive edebilir. BRCA2, her ikisi de histon asetilaz aktivitesine sahip olan transkripsiyonel ortak aktivatör protein P/CAF (p300/CBP ile ilişkili faktör) ve bununla ilişkili p300/CBP ile etkileşime girer. BRCA2, transkripsiyonel aktiviteyi indüklemek için bu histon değiştiricileri transkripsiyon kompleksine dahil edebilir [5].



Şekil 4: BRCA proteinlerinin özellikleri. BRCA1, N-terminal RING alanını, nükleer lokalizasyon sinyallerini (NLS) ve iki C-terminal BRCT alanını içerir. Etkileşen proteinler bağlanma bölgelerinin (yeşil çubuklar) altında gösterilmiştir. CHK2 veya ATM tarafından fosforile edilen alanlar da belirtilmiştir (kırmızı oklar). BRCA2, BRC motifinin sekiz tekrarını içerir. Rad51, sekiz BRC tekrarından altısına (yeşil çubuklar) doğrudan bağlanır [5].

Bu tez çalışmamızda BRCA1 (meme kanseri 1) ve BRCA2 (meme kanseri 2) genleri ile RAD51 (RAD51 Rekombinaz) genlerinin prostat kanseriyle olan ilişkisini araştırmayı amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve kitler

- EDTA'lı mor kapaklı tüp (4 ml)
- RNA İzolasyon Kiti
- QRT-PCR için Master Mix
- Nükleaz free su
- Steril mikropipet ucu (1 µl)
- Steril mikropipet ucu (10 µl)
- Steril mikropipet ucu (100 µl)
- Steril mikropipet ucu (1000 µl)
- Steril laboratuar eldiveni
- Vida kapaklı, contalı polipropilen yapıda mikrosantrifüj tüpü (2 ml, DNAaz ve RNAaz free)

3.1.2. Kullanılan cihaz ve gereçler

- CFX Connect cihazı (Biorad)
- Allsheng Soğutmalı Santrifüj (iCEN-24R)
- Mikro santrifüj (Allsheng)
- Pipet seti (Axygen)
- Nabi UV/Vis Nano Spektrofometre (Allsheng)
- -80^{0}C Buzdolabı (Bexel)
- -20^{0}C Buzdolabı (Vestel)
- ISOLAB Vortex Mixer

3.1.3. Çalışma gruplarının belirlenmesi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 03/03/2023 tarihli 05 sayılı etik kurul kararı ile onay alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya Ocak 2020-Mart 2023 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Ürolojik Onkoloji Bilim Dalı'nda prostektomi uygulanan PCa tanısı konulan 50 hasta ve 20 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Hastalardan kan örneklerinden Real Time- PCR yöntemi kullanılarak BRCA1, BRCA2 ve RAD51 genlerinin ekspresyonu retrospektif olarak değerlendirilmesi planlanmıştır. Hedef genlerin ekspresyonu seviyeleri prostektomi uygulanan hastaların örneklerinden ve sağlıklı kontrollerin örnekleri arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca hasta grubu içinde gruplandırmalar (yaş, nüks durumu, hastaneye yatış süresi, gleason skor, grade grup) yapılarak değerlendirme yapıldı. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics, United States) programı kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Total RNA İzolasyonu

RNA eldesi için Macherey-Nagel firmasının (Almanya menşeili REF: 740200.50) NucleoSpin® RNA Blood kiti kullanıldı.

1. Kanda Liziz

• 2 ml'lik kapaklı tüplere 200 µL kan eklenir.

• Üzerine 200 µL Lysis Buffer DL eklenir ve karıştırılır.

• 5 µL Liquid Proteinase K eklenir.

• Örnekler, 1.400 rpm hızda shakerda 15 dakika oda sıcaklığında (18–25 °C) inkübe edilir.

• Kapakları temizlemek için mini spin yapılır (1-3sn 2,000 x g).

2. RNA Bağlama Ortamına Hazırlık

• Tüplere 200 µL 70 % ethanol eklenir.

Not: Etonolü lizatla karıştırmak için kapakları kapatarak 5 kez up-down yapılır. Daha sonra kapakları temizlemek için mini spin yapılır. (1-3sn 2,000 x g)

3. RNA Bağlama

• 610 µL lizat çekilir ve toplama tüpüne yerleştirilmiş olan NucleoSpin® RNA Blood Column'a aktarılır.

Not: Kolona 650 µL'den fazla pipetleme yapılmamalı bu kolonun taşmasına neden olur.

• 11.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir. Toplama Tüpünü atılır yeni bir tüpe kolon yerleştirilir.

4. Silica Membranı Tuzdan Arındırma

• Kolona 350 µL MDB (Membrane Desalting Buffer) eklenir.

• 30 saniye 11,000 x g'de santrifüj edilir.

5. DNA Parçalanması

• 95 µL rDNase eklenir ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir.

6. Yıkama ve Membranı Kurutma

1.YIKAMA

• 200 µL Buffer RB2 kolona eklenir.

• 30 saniye 11,000 x g'de santrifüj edilir.

• Toplama tüpü boşaltılır ve kolon yeni bir tüpe yerleştirilir.

2.YIKAMA

• 600 µL Buffer RB3 kolona eklenir.

• 30 saniye 11,000 x g'de santrifüj edilir.

• Toplama tüpü boşaltılır ve kolon yeni bir tüpe yerleştirilir.

3.YIKAMA

• 250 µL Buffer RB3 kolona eklenir.

• 2 dakika 11,000 x g'de santrifüj edilir. * Kolonda sıvı kalmışsa bu adım tekrarlanır.

• Kolon 1,5 ml'lik tüplere yerleştirilir.

7. RNA Elüsyonu

• 60 µL RNase-free H2O eklenir.

• 30 saniye 11,000 x g santrifüj yaparak RNA elde edilir.

3.2.2. RNA miktarının belirlenmesi

RNA izolasyon kiti ile elde edilen RNA örneklerinin miktarı ve saflık derecesi Allsheng Nabi UV/Vis Nano spektrofotometresi ile ölçüldü. QRT-PCR analizlerin yapılabilmesi için, elde edilen RNA'nın yüksek saflıkta olması gerekmektedir. Tüm RNA örneklerinin Thermo Scientific NanoDropTM 1000 spektrofotometrenin 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçtüğü absorbans değerleri oranı (A260/A280) >1.8 olarak bulundu. Ölçümden sonra, RNA stok konsantrasyonu 50 ng/µL olacak şekilde örnekler elüsyon solüsyonu ile sulandırıldı.

3.2.3. cDNA Sentezi

RNA eldesinden sonra diğer işlem olan cDNA işlemi için hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience firmasının (Alman menşeili Cat no: PCR511) Script cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi. cDNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları şekilde eşitlendi. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde reaksiyon örnek başına aşağıdaki gibi gerçekleştirildi (Tablo 3).

Tablo 3: cDNA reaksiyonu

Reaktifler	**Hacimleri (µL)**
RNAse free su	10,5
Script RT buffer	4
dNTP mix	1
Oligo dT Primer	0,5
DTT	1
RNAse Inhibitor	0,5
RT Enzyme	0,5
RNA ürün	2

Hazırlanan reaksiyon karışımı pipetleme yapıldıktan sonra kuyucuklara dağıtıldı ve ardından RNA ürünleri dağıtıldı. Daha sonra 96 well plate içine konulan standart ve örnek karışımları Biorad CFX Connect cihazına konularak reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi (Tablo 4).

Tablo 4: Sıcaklık değerleri ve süreleri

Sıcaklık	**Süre**
42ºC	10 dakika
50ºC	60 dakika
70ºC	10 dakika

Elde edile ürün -20 ºC'de saklandı.

3.2.4. Real Time PCR Reaksiyonu (SYBRMasterMix)

cDNA eldesinden sonra diğer işlem olan Real Time PCR işlemi için hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience firmasının (Almanya menşeili Cat no: PCR 372) qPCR Sybr Master Mix kiti kullanılarak Real-Time PCR gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Bunun için 0.6µl forward primer, 0.6µl reverse primer 6,8 µl PCR grade su, 10 µl qPCR SybrMasterMix ve 2 µl cDNA içeren reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 5).

Tablo 5: RT PCR Primer Dizayni

Gen ismi	Primer dizisi (5’ ⟶ 3’)
BRCA1	F:CTGAAGACTGCTCAGGGCTATC R:AGGGTAGCTGTTAGAAGGCTGG
BRCA2	F:GGCTTCAAAAAGCACTCCAGATG R:GGATTCTGTATCTCTTGACGTTCC
RAD51	F:ACCGAGCCCTAAGGAGAGTG R:CCGCGCTCCGACTTCA
GAPDH	F:GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA R:TGACAAGCTTCCCGTTCTCAG

Daha sonra 96 well plate içine konulan Sıcaklık Süre 42ºC 10 dakika 50ºC 60 dakika 70ºC 10 dakika standart ve örnek karışımları Biorad CFX Connect cihazına konularak reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

*Cihaz protokolünde okuma, bağlanma ve uzama basamağının sonuna eklendi. Ayrıca, reaksiyon sonuna melt curve protokolü eklendi (Tablo 6).

Tablo 6: Melt Curve protokolü

Basamak	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon ve Polimeraz Aktivasyon	95ºC	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95ºC	15 saniye	45 döngü
Bağlanma ve Uzama	ºC (Primerin erime sıcaklığına göre değişmektedir)	1 dakika	

3.2.5. QRT-PCR yöntemi ile gen ekspresyon düzeylerinin tespit edilmesi

Tek merkezli retrospektif bir çalışma planlanmıştır. Hastalara ait alınan kan örnekleri ve sağlıklı kontrollere ait alınan kan örneklerinden QRT-PCR yöntemi kullanarak BRCA1, BRCA2 ve RAD51 genlerinin ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. Tüm laboratuvar analiz sonuçları hastaların klinik parametreleri, prognozu, sağ kalımı ve uygulanan tedavi yöntemlerine verdikleri yanıtlar yönünden araştırıldı.

3.2.6. İstatistiksel ve biyoinformatik değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme Bağımsız Örneklem T-Testi ile biyoinformatik değerlendirme ise Qiagen GeneGlobe Analiz Programı üzerinden yapılmıştır. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekspresyon seviyesindeki kat oranı (fold change) değerleri gruplara göre tespit edilmiştir.

Biyoinformatik analizde gen ekspresyonu verilerinin kümeleme analizi ve ısı haritası grafiği, renk kodlarıyla (genler) tek boyutlu olarak temsil edilir. Genlerin ekspresyon seviyeleri bir ısı haritası grafik (küme grafiği) ile gösterilir ve genler, ifade modellerine göre kümelenir. Isı haritası, QRT-PCR'de incelenen iki grup (hasta ve kontrol) arasındaki ekspresyon verilerinin katlanmış yukarı veya aşağı regülasyonunu grafiksel olarak gösterir. Renk doygunluğu, gen ekspresyonundaki değişimin

büyüklüğünü yansıtır. Yeşil kareler hasta örneklerinde düşük gen ekspresyonunu (oran: <1) temsil eder. Siyah kareler eşit olarak eksprese edilen genleri gösterir (oran 1'e yakındır). Kırmızı kareler, kontrol seviyelerinden daha yüksek (oran:>1) gen ekspresyonunu gösterir.

Katlı Değişimi ($2^{-\Delta\Delta CT}$), test örneğindeki normalleştirilmiş gen ifadesinin ($2^{-\Delta CT}$), kontrol örneğindeki normalleştirilmiş gen ekpresyonu ($2^{-\Delta CT}$) bölünmesiyle hesaplanır. Birden büyük katlı değişim değeri, pozitif veya yukarı regülasyonu belirtir ve birden küçük katlı değişim değeri ise, negatif veya aşağı regülasyonu belirtir. Katlı regülasyon, birden büyük katlı değişim değeri açısından katlı değişime ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) eşittir; bu sonuç, yukarı regülasyona karşılık gelmektedir. Birden küçük katlı değişim değeri, aşağı regülasyonu gösterir, bu durumda katlı regülasyon katlı değişimin negatif tersidir ($-1/2-\Delta\Delta Ct$).

Ct değerlerinin hesaplanmasında, Ct cut-off değerleri 35 olarak alınmıştır. p değerleri, kontrol grubu ve hasta gruplarındaki her gen için tekrarlanan 2^(-ΔCT) değerlerinin student t-testine dayalı olarak hesaplanmasıyla elde edilir ve 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Kullanılan p değeri hesaplaması, bilimsel literatürde yaygın olarak kabul edilen bir yöntem olan parametrik, eşleştirilmemiş, iki örnekli eşit varyansa, iki kuyruklu dağılıma dayanmaktadır.

Bir QPCR analizinde tüpteki örneğin çoğalması (amplikasyonu) ile oluşan floresan ışımanın (ör. SYBR green boyasının verdiği ışıma) QPCR cihazı tarafından görüldüğü döngü sayısı Ct (cycle threshold) değerini ifade eder.

QPCR sonuçlarının Livak yöntemi ile normalize edilmesi ve standardize edilmiş ekspresyon seviyelerinin hesaplanması için öncelikle QPCR Ct değerleri ele alınır ve öncelikle ΔCt değeri hesaplanır:

ΔCt= Ct (araştırılmak istenen genin Ct değeri)- Ct (referans genin Ct değeri)

Bu hesaplama tüm hasta ve kontrol grupları için yapılır ve her grubun ΔCt ortalaması hesaplanır. Daha sonra ΔΔCt değeri hesaplanır:

ΔΔCt= ΔCt (araştırılmak istenen genin ΔCt değeri) - ort. kont. ΔCt (kontrol grubunun ΔCt ortalaması

Son olarak standatize edilmiş ekspresyon için rölatif bir sayısal değerin belirlenmesi amacı ile her örnek için şu hesaplama yapılır:

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{\Delta\Delta Ct \text{ (Tüm örneklerin } \Delta\Delta Ct \text{ değerleri)}}$

Elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri örnekler için standardize edilmiş ekspresyon seviyesini belirlemek veya kontrol gruplarına göre hasta gruplarında kaç kat ekspresyon değişimi olduğunu hesaplamak için kullanılabilir

BRCA1,BRCA2 ve RAD51 genlerin standardize ekspresyon seviyeleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplandı.

Bu tez çalışmasında iki taraflı bir güven aralığı ile bir örneklem boyutu hesaplandı. 0.80 güç 0.05 hata dikkate alınarak 0,2 'lik bir standart sapma için 43 hastaya ihtiyaç olduğu hesaplandı. Veri toplama sırasında %15'lik bir kayıp olabileceği gözönüne alındığında çalışmaya toplam 50 hasta alınmasına karar verildi.

Kategorik değişkenler ki-kare testi ile tanımlandı. Sürekli değişkenlerin uygunluk analizleri için Kolmogrov-Smirnov analizi yapıldı. Normal dağılıma uyan verilerin analizinde T testi, normal dağılıma uymayan verilerin değerlendirilmesinde Mann-Whitney U analizi kullanıldı. Normal dağılıma uyan bağımsız gruplar arasındaki karşılaştırmalar ANOVA testi ile yapıldı. Birden çok parameterin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi uygulandı. Analiz sonuçları ve hastaların klinik verileri (operasyon öncesi ve sonrası PSA değerleri), parametrik Pearson Korelasyonu ile değerlendirildi. Ölçülen biyobelirteçlerin duyarlılık ve özgüllük değerlerinin saptanması için ROC (Receiver Operator Characteristic) eğrisi analizleri yapıldı. Tüm istatistiksel analizlerin sonuçları $p<0,05$ ise anlamlı olarak değerlendirildi.

4. SONUÇLAR

Çalışmaya Ocak 2020-Mart 2023 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Ürolojik Onkoloji Bilim Dalı'nda prostektomi uygulanan PCa tanısı konulan 50 hasta ve 20 sağlıklı kontrol dahil edildi. Hasta grubunda; yaş, nüks durumu, hastaneye yatış süresi, gleason skor, evreleme, PSA parametreleri ölçüldü. PCa olmayan kontrol grubu ve PCa tanısı konan hasta grubu olarak tanımlandı. Hastalardan alınan kan örneklerinden QRT-PCR yöntemiyle BRCA1, BRCA2 ve RAD51 genlerinin ekspresyon düzeyleri hesaplandı.

4.1. Hastalara ve kontrollere ait demografik veriler

Hastalara ve kontrollere ait demografik, klinik özellikler Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7: Hastalara ve kontrollere ait demografik, klinik özellikler

Özellikler	Hasta (n=50)	Kontrol (n=20)
Hasta yaşı (yıl) ortalama±standart sapma, ortanca, (aralık)	67.30±6.65, 67.50, (50-82)	-
Kontrol yaşı (yıl) ortalama±standart sapma, ortanca (aralık)	-	62.15±10.07, 51.50 (45-69)
Radikal prostatektomi n, %	50, %100	-
Operasyon öncesi Prostat spesifik antijen (PSA) seviyesi ortalama±standart sapma, ortanca (aralık)	10,98±9,58	
Operasyon sonrası Prostat spesifik antijen (PSA) seviyesi ortalama±standart sapma, ortanca (aralık)	0.284±0.94, 0.006, (0.001-5.110)	-
Hastane yatış süresi ortalama±standart sapma, ortanca, (aralık)	6.127±2.59,6.00, (2-19)	-
Gleason skor n, %	49,%100	

6	7, %14.28	-
7	31, %63.28	-
8	7, %14.28	-
9	4, %8.16	
Nüks (Yok/Var) n, %	46,%92.0/4,%8.0	
Evre n, %	45,%100	
1	4, %8.88	-
2	15, %33.34	-
3	13, %28.90	-
4	9, %20.00	-
5	4, %8.88	-

Pearson korelasyon analizi sonuçlarına göre, operasyon öncesi PSA değerleri ile BRCA1 Ct değerleri negatif korelasyon, BRCA2 ve RAD51 Ct değerleriyle pozitif korelasyon göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sırasıyla p:0.295, p:0.408, p:0.797 olarak tespit edildi.

Yine pearson korelasyon analizi sonuçlarını değerlendirdiğimizde, operasyon sonrası PSA değerleri ile BRCA1 ve BRCA2 Ct değerleri pozitif korelasyon, RAD51 Ct değerleriyle negatif korelasyon göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sırasıyla p:0.917 p:0.849 ve p:0.803 olarak tespit edildi.

4.2. Hastalara ve kontrollere ait BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekpresyonları

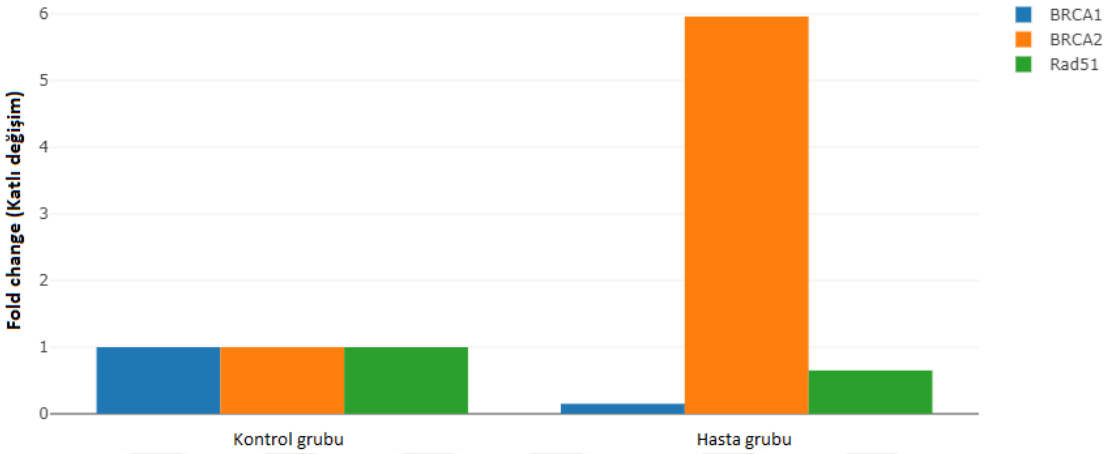
Elde ettiğimiz verilere göre BRCA1 ve RAD51 gen ekspresyonları hastalarda kontrollerden aşağı regüle iken BRCA2 gen ekspresyonu yukarı regüle saptandı. PCa'lı hastalarda BRCA1'in ekspresyon düzeyi aşağı regüle olarak istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.004561, katlı değişim: 0.15, katlı regülasyon: -6.53) (Tablo 8) (Şekil 5).

Tablo 8. Hasta ve Kontrol Gruplarında Ortalama BRCA1, BRCA2 ve RAD51 Ekspresyonu ve Değerlendirmesi

Genler	**AVG Ct**	**AVG ΔC_t**	**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**	**Fold Change**	**Fold Regulation**	

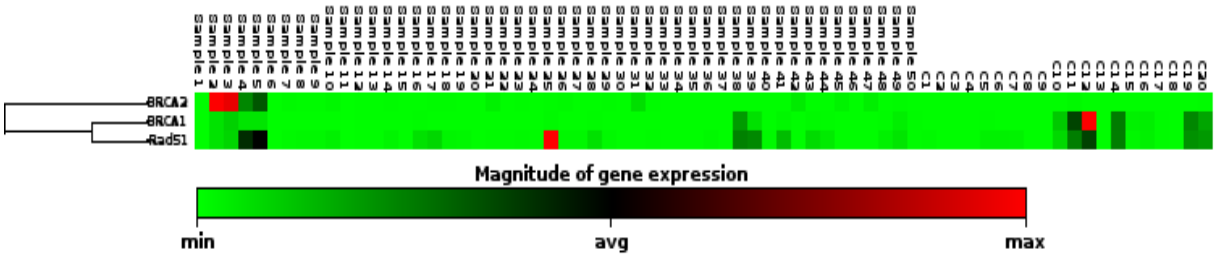
							(Katlı Değişim)	(Katlı Regülasyon)	p
	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol			
BRCA1	33.61	29.72	3.74	1.03	0.074822	0.490220	0.15	-6.55	**0.004561**
BRCA2	31.79	33.79	2.25	4.82	0.210808	0.035390	5.96	5.96	0.222315
RAD51	27.88	26.70	-1.36	-1.99	2.572195	3.970994	0.65	-1.54	0.802367

P değeri p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği



Şekil 5: Hasta ve kontrol grubunda incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.

Isı haritası grafiğinden elde ettiğimiz GAPDH housekeeping geninin de yer aldığı clustergram sonucuna göre, toplam hasta örneklerini kontrol gruplarına ait örneklerle karşılaştırdığımızda BRCA1'in (yeşil kareler ağırlıkta) ve RAD51'in (siyah ve yeşil kareler ağırlıkta) düşük gen ekspresyonlarının olduğu, BRCA2'in ise yüksek gen ekspresyonundan dolayı kırmızı ve siyah karelerin hasta gruplarında ağırlıkta olduğu görülmektedir (Şekil 6).



Şekil 6: QRT-PCR ile elde edilen hasta ve kontrol gruplarına ait clustergram sonuçları. Hasta grubu: Sample, kontrol grubu: C şeklinde gösterilmiştir.

4.3. Hastaların BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekpresyonları ve klinik ilişki

BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekpresyonları ile gleason skorları arasındaki ilişki Tablo 9'da, gen ekpresyonları ile yaş arasındaki ilişki Tablo 10'da, gen ekspresyonları ile nüks arasındaki ilişki Tablo 11'de verilmiştir. Gleason skorlarını 6 ve daha az, 7, 8 ve 10 arası olmak üzere üç gruba ayırdığımız zaman, BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekpresyonlarını bu üç grup içinde düşük ve yüksek ekpresyon olarak sınıfladığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 9).

Tablo 9: Gen ekpresyonları ile gleason skorları arasındaki ilişki tablosu

Gleason skor (n=49) (%100)	**Düşük BRCA1 no=34 (%69.4)**	**Yüksek BRCA1 no=15 (%30.6)**	**p**
GS 6 veya GS 6'dan az (n=7) (%14.3)	6 (%12.3)	1 (%2.0)	0.414
GS 7 (n=31) (%63.3)	23 (%46.9)	8 (%16.4)	0.356
GS 8'den GS 10'a (n=11) (%22.4)	5 (%10.2)	6 (%12.2)	0.069
Gleason skor (n=49) (%100)	**Düşük BRCA2 no=13 (%26.5)**	**Yüksek BRCA2 no=36 (%73.5)**	
GS 6 veya GS 6'dan az (n=7) (%14.3)	2 (%4.1)	5 (%10.2)	0.989
GS 7 (n=31) (%63.3)	8 (%16.4)	23 (%46.9)	1.000
GS 8'den GS 10'a (n=11) (%22.4)	3 (%6.0)	8 (%16.4)	1.000
Gleason skor (n=49) (%100)	**Düşük RAD51 no=23 (%46.9)**	**Yüksek RAD51 no=26 (%53.1)**	
GS 6 veya GS 6'dan az (n=7) (%14.3)	5 (%10.2)	2 (%4.1)	0.230
GS 7 (n=31) (%63.3)	15 (%30.6)	16 (%32.7)	1.000
GS 8'den GS 10'a (n=11) (%22.4)	3 (%6.1)	8 (%16.3)	0.180

GS: Gleason skor, P değerİ $p<0,05$'den küçük anlamlı olarak kabul edildi.

Hasta yaşlarını 60 ve daha az, 61-73, 74 ve üzeri olmak üzere üç gruba ayırdığımız zaman, BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekpresyonlarını bu üç grup içinde düşük ve

yüksek ekpresyon olarak sınıfladığımızda 60 yaş ve altı grupta yüksek BRCA1 ekpresyonuna sahip kişi daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Yetmişdört yaş ve üzeri grupta ise düşük BRCA2'ye sahip kişi sayısı fazla bulundu. Yine 60 yaş ve alı grupta yüksek RAD51 ekpresyonuna sahip kişi sayısı fazla saptandı. Bu karşılşatırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Tablo 10).

Tablo 10: Gen ekpresyonları ile yaş arasındaki ilişki tablosu

Yaş (n=50) (%100)	**Düşük BRCA1 no=35 (%70.0)**	**Yüksek BRCA1 no=15 (%30.0)**	**p**
≤60 (n=7) (%14.0)	1 (%2.0)	6 (%12.0)	**0.002**
61-73 (n=35) (%70.0)	27 (%54.0)	8 (%16.0)	0.107
≥74 (n=8) (%16.0)	7 (%14.0)	1 (%2.0)	0.407
Yaş (n=50) (%100)	**Düşük BRCA2 no=14 (%28.0)**	**Yüksek BRCA2 no=36 (%72.0)**	
≤60 (n=7) (%14.0)	0 (%0.0)	7 (%14.0)	0.168
61-73 (n=35) (%70.0)	9 (%18.0)	26 (%52.0)	0.732
≥74 (n=8) (%16.0)	5 (%10.0)	3 (%6.0)	**0.030**
Yaş (n=50) (%100)	**Düşük RAD51 no=23 (%46.0)**	**Yüksek RAD51 no=27 (%54.0)**	
≤60 (n=7) (%14.0)	0 (%0.0)	7 (%14.0)	**0.011**
61-73 (n=35) (%70.0)	17 (%34.0)	18 (%36.0)	0.758
≥74 (n=8) (%16.0)	6 (%12.0)	2 (%4.0)	0.121

P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi.

Hastaların klink takiplerinde nüks olup olmama durumlarına bakıp grupladığımız zaman, BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekpresyonlarının düşük ve yüksek olma durumuna sahip kişileri bu gruplarda karşılaştırdığımızda fark saptanmadı (Tablo 11).

Tablo 11: Gen ekpresyonları ile nüks arasındaki ilişki tablosu

Nüks (n=50) (%100)	**Düşük BRCA1 no=35 (%70.0)**	**Yüksek BRCA1 no=15 (%30.0)**
Var (n=4) (%8.0)	2 (%4.0)	2 (%4.0)
Yok (n=46) (%92.0)	33 (%66.0)	13 (%26.0)
p=0.574		
Nüks (n=50) (%100)	**Düşük BRCA2 no=14 (%28.0)**	**Yüksek BRCA2 no=36 (%72.0)**
Var (n=4) (%8.0)	0 (%0.0)	4 (%8.0)
Yok (n=46) (%92.0)	14 (%28.0)	32 (%64.0)
p=0.566		
Nüks (n=50) (%100)	**Düşük RAD51 no=23 (%46.0)**	**Yüksek RAD51 no=27 (%54.0)**
Var (n=4) (%8.0)	1 (%2.0)	3 (%6.0)
Yok (n=46) (%92.0)	22 (%44.0)	24 (%48.0)
p=0.614		

P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi.

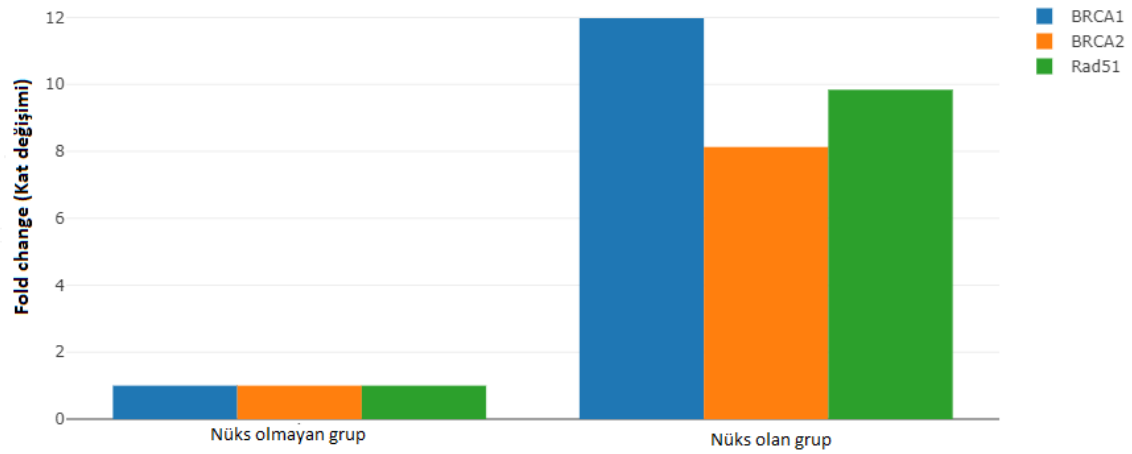
Çalışmamızda, BRCA1 ve RAD51 gen ekspresyonları nüks olan hastalarda nüks olmayan hasta grubundan yukarı regüle olarak tespit edilmiştir. Nüks olan prostat kanserli hastalarda BRCA1'in ekspresyon düzeyi anlamlı bulundu (p=0.000478, katlı değişim=11.98, katlı regülasyon=11.98) (Tablo 12) (Şekil 7).

Tablo 12. Nüks olan ve olmayan hastalarda Ortalama BRCA1, BRCA2 ve RAD51 Ekspresyonu ve Değerlendirmesi

Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı**	**Fold Regulation (Katlı**	**p**
	H1	H2	H1	H2	H1	H2			

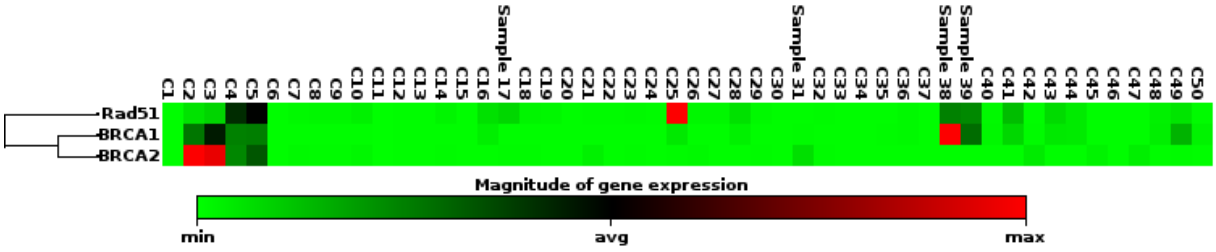
							Değişim)	Regülasyon)	
BRCA1	33.39	33.63	0.44	4.03	0.734584	0.061343	11.98	11.98	**0.000478**
BRCA2	31.95	31.78	-0.54	2.49	1.448942	0.178275	8.13	8.13	0.695177
RAD51	27.80	27.89	-4.40	-1.10	21.075574	2.142255	9.84	9.84	0.368219

H1: Nüks olan H2: Nüks olmayan P değeri p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği



Şekil 7: Nüks olan ve olmayan hasta gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.

Isı haritası grafiğinden elde ettiğimiz clustergram verilerine göre, nüks hasta örneklerini nüks olmayan hasta grubuna ait örneklerle karşılaştırdığımızda BRCA1'in (kırmızı ve siyah kareler ağırlıkta) yüksek gen ekspresyonunun, RAD51'in (siyah ve yeşil kareler ağırlıkta) düşük gen ekspresyonunun, BRCA2'in ise düşük gen ekspresyonundan dolayı yeşil karelerin nüks grubunda ağırlıkta olduğu görülmektedir (Şekil 8).



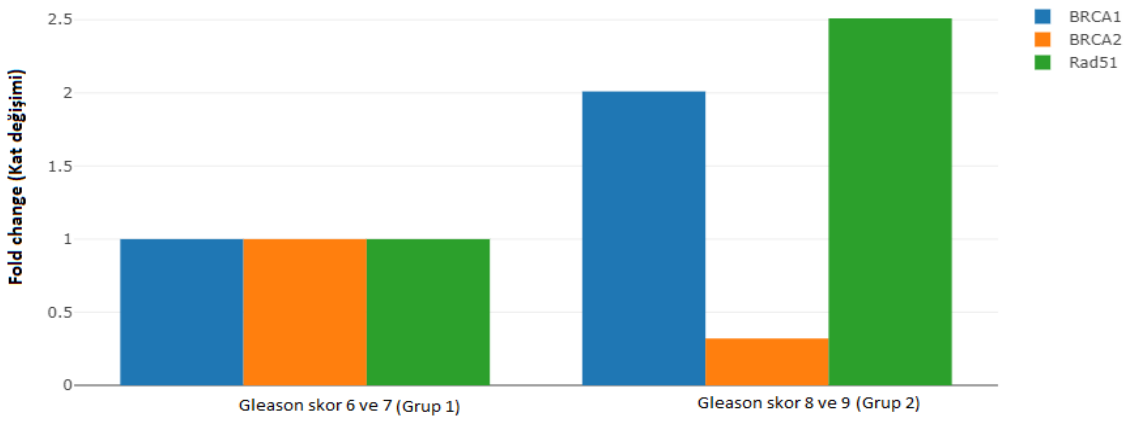
Şekil 8: QRT-PCR ile elde edilen nüks olan ve olmayan hasta gruplarına ait clustergram sonuçları. Nüks hasta grubu: Sample, nüks olmayan hasta grubu: C şeklinde gösterilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda BRCA1 ve RAD51 gen ekspresyonları gleason skor grup 6 ve 7 olan grup 1'de gleason skor grup 8 ve 9 olan grup 2'e göre yüksek (yukarı regüle) iken BRCA2 gen ekspresyonu düşük (aşağı regüle) bulunmuştur. gleason skor grup 6 ve 7 olan grup 1 hastalarında RAD51'in ekspresyon düzeyi anlamlı bulundu (p=0.019201, katlı değişim=2.51, katlı regülasyon=2.51) (Tablo 13) (Şekil 9).

Tablo 13: Gleason skor grup (6 ve 7: Grup 1) (8 ve 9: Grup 2)

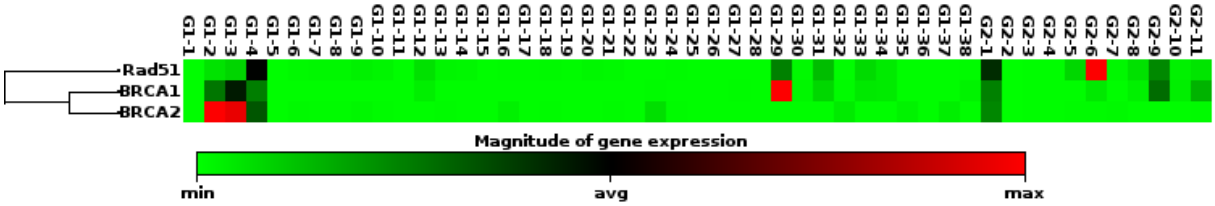
Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı Değişim)**	**Fold Regulation (Katlı Regülasyon)**	**p**
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2			
BRCA1	33.97	32.61	4.00	2.99	0.062614	0.125869	2.01	2.01	0.832534
BRCA2	31.27	33.35	1.81	3.47	0.285660	0.090018	0.32	-3.17	0.537188
RAD51	28.19	26.89	-1.05	-2.38	2.068265	5.195536	2.51	2.51	**0.019201**

P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği



Şekil 9: Gleason skor (6 ve 7: Grup 1) (8 ve 9: Grup 2) gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.

Isı haritası grafiğine göre, gleason skor grup 6 ve 7 olan grup 1'i gleason skor grup 8 ve 9 olan grup 2'e göre karşılaştırdığımızda BRCA1'in (kırmızı ve siyah kareler ağırlıkta) yüksek gen ekspresyonunun, RAD51'in (siyah kareler ağırlıkta) düşük gen ekspresyonunun, BRCA2'in ise yüksek gen ekspresyonundan dolayı kırmızı ve siyah karelerin gleason skor grup 6 ve 7 olan grup 1'de ağırlıkta olduğu görülmektedir (Şekil 10).



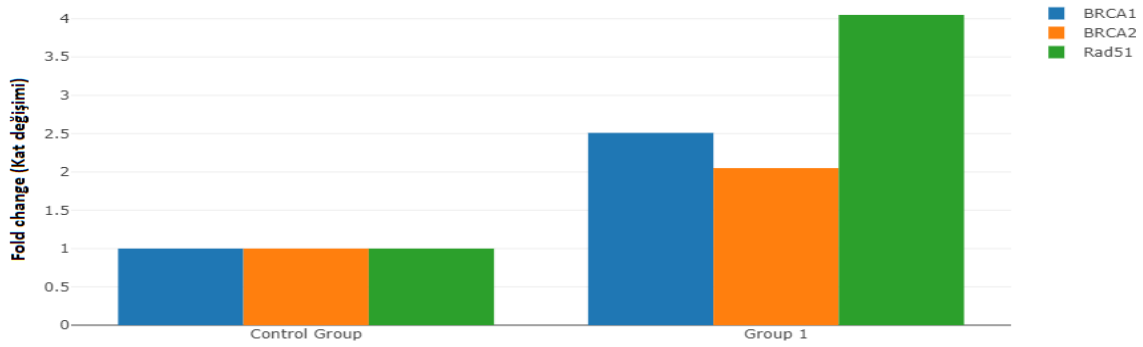
Şekil 10: QRT-PCR ile elde edilen Gleason skor (6 ve 7: Grup 1) (8 ve 9: Grup 2) gruplarına ait clustergram sonuçları. G1-1 ile G1-38 aralığı: Gleason skor 6 ve 7 olan Grup 1, G2-1 ile G2-11 aralığı: Gleason skor 8 ve 9 olan Grup 2.

Çalışma verilerine göre, BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekspresyonları gleason skor grup 6 olan grup 1'de gleason skor grup 7,8 ve 9 olan grup 2'e göre yukarı regüle olarak tespit edilmiştir. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 14) (Şekil 11).

Tablo 14: Gleason skor grup (6: Grup 1) (7,8, 9: Grup 2)

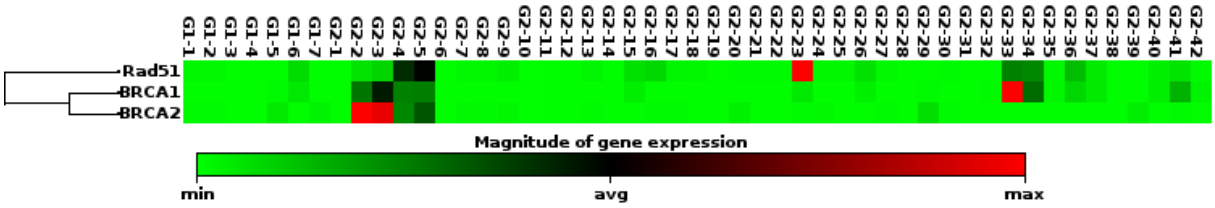
Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı Değişim)**	**Fold Regulation (Katlı Regülasyon)**	**p**
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2			
BRCA1	34.40	33.54	4.91	3.58	0.033295	0.083524	2.51	2.51	0.358000
BRCA2	32.27	31.65	3.07	2.03	0.119198	0.244209	2.05	2.05	0.506199
RAD51	28.99	27.72	0.38	-1.63	0.767677	3.105363	4.05	4.05	0.383230

P değerİ $p<0,05$'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği



Şekil 11: Gleason skor (6: Grup 1) (7,8, 9: Grup 2) gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.

Isı haritası sonuçları değerlendirildiğinde, gleason skor grup 6 olan grup 1'i gleason skor grup 7, 8 ve 9 olan grup 2'e göre kıyasladığımızda BRCA1'in (yeşil kareler ağırlıkta) ve RAD51'in (yeşil kareler ağırlıkta) ve BRCA2'in (yeşil kareler ağırlıkta) düşük gen ekspresyonları gözlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12: QRT-PCR ile elde edilen Gleason skor (6: Grup 1) (7,8, 9: Grup 2) gruplarına ait clustergram sonuçları. G1-1 ile G1-7 aralığı: Gleason skor 6 ve 7 olan Grup 1, G2-1 ile G2-42 aralığı: Gleason skor 8 ve 9 olan Grup 2.

Sonuçlar ele alındığında, BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekspresyonları gleason skor grup 6 olan grup 1'de, gleason skor grup 7 olan grup 2'ye göre kıyaslandığında yukarı regüle olarak tespit edilmiştir. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 15). BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekspresyonları, gleason skor grup 6 olan grup 1'de, gleason skor grup 8 ve 9 olan grup 3'e göre karşılaştırıldığında BRCA1 ve RAD51 yukarı regüle olarak bulunurken BRCA2 geni aşağı regüle olarak bulundu ($p>0.05$) (Tablo 16) (Şekil 13).

Tablo 15: Gleason skor grup (6: Grup 1) (7: Grup 2)

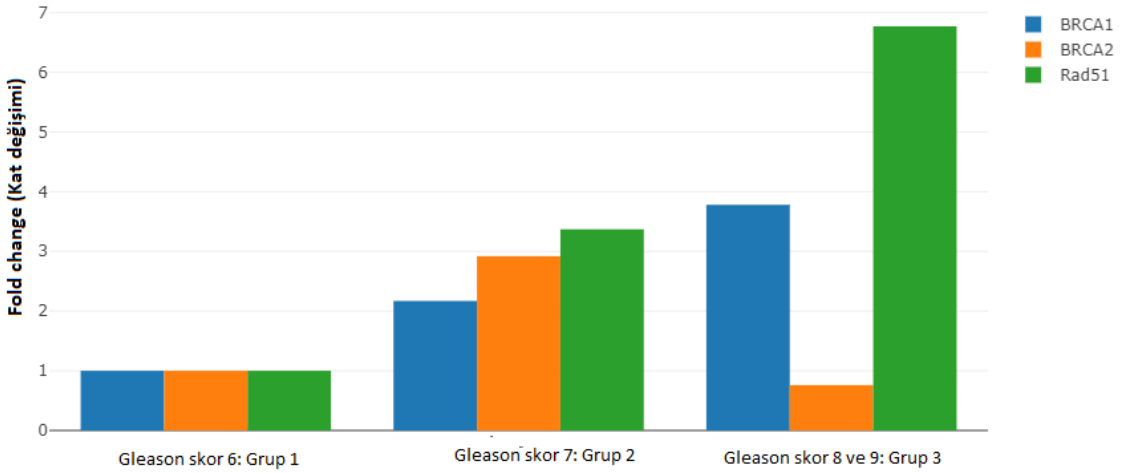
Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı Değişim)**	**Fold Regulation (Katlı Regülasyon)**	**p**
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2			
BRCA1	34.40	33.87	4.91	3.79	0.033295	0.072212	2.17	2.17	0.413655
BRCA2	32.44	31.05	3.07	1.52	0.119198	0.347985	2.92	2.92	0.465466
RAD51	28.99	28.01	0.38	-1.37	0.767677	2.587018	3.37	3.37	0.475593

P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği

Tablo 16: Gleason skor grup (6: Grup 1) (8,9: Grup 3)

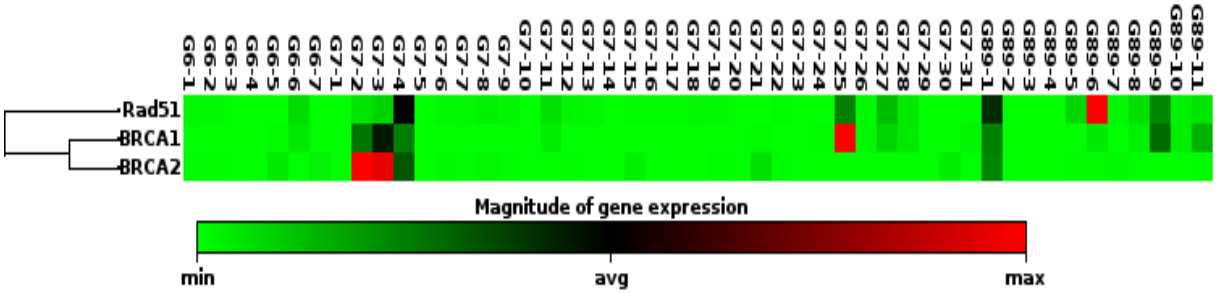
Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı Değişim)**	**Fold Regulation (Katlı Regülasyon)**	**p**
	Grup 1	Grup 3	Grup 1	Grup 3	Grup 1	Grup 3			
BRCA1	34.40	32.61	4.91	2.99	0.033295	0.125869	3.78	3.78	0.138967
BRCA2	32.44	33.35	3.07	3.47	0.119198	0.090018	0.76	-1.32	0.607492
Rad51	28.99	26.89	0.38	-2.38	0.767677	5.195536	6.77	6.77	0.199051

P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği



Şekil 13: Gleason skor (6: Grup 1) (7: Grup 2), (8,9: Grup 3) gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.

Clustergram sonuçlarına göre, gleason skor grup 7 olan grup 2 ile gleason skor grup 6 olan grup 1'i kıyasladığımızda BRCA1'in (siyah ve kırmızı kareler ağırlıkta) ve BRCA2'nin (siyah ve kırmızı kareler ağırlıkta) yüksek gen ekspresyonlarının olduğu, Rad51'in (yeşil ve siyah kareler ağırlıkta) ise düşük gen ekspresyonlarının olduğu gözlenmiştir. Gleason skor grup 8 ve 9 olan grup 3 ile gleason skor grup 6 olan grup 1'i karşılaştırdığımızda ise BRCA1'in (yeşil ve siyah kareler ağırlıkta) ve BRCA2'in (yeşil kareler ağırlıkta) düşük gen ekspresyonlarının olduğu, RAD51'in (siyah ve kırmızı kareler ağırlıkta) ise yüksek gen ekspresyonlarının olduğu gözlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14: QRT-PCR ile elde edilen Gleason skor (6: Grup 1), (7: Grup 2), (8,9: Grup 3) gruplarına ait clustergram sonuçları.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, BRCA1, BRCA2 gen ekspresyonları grade grup 1'de grade grup 2'ye göre aşağı regüle olarak tespit edilmiştir. RAD51 gen ekspresyonu ise, grade grup 1'de grade grup 2'ye göre yukarı regüle bulunmuştur. BRCA1 (p=0.087881), BRCA2 (p=0.073616) ve RAD51 (p=0.196756) ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 17) (Şekil 15).

Tablo 17: Grade grup (Grade 1: Grup 1) (Grade 2: Grup 2)

Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı Değişim)**	**Fold Regulation (Katlı Regülasyon)**	**p**
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2			
BRCA1	34.31	34.36	3.69	5.57	0.077616	0.021041	0.27	-3.69	0.087881
BRCA2	32.62	30.78	2.27	2.94	0.206613	0.130730	0.63	-1.58	0.073616
RAD51	30.40	27.65	0.60	-0.07	0.660898	1.051173	1.59	1.59	0.196756

P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekspresyonları grade grup 1'de grade grup 3'e göre yukarı regüle olarak tespit edilmiştir. BRCA1 (p=0.318952), BRCA2 (p=0.391309) ve RAD51 (p=0.352854) ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 18) (Şekil 15).

Tablo 18: Grade grup (Grade 1: Grup 1) (Grade 3: Grup 2)

Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı Değişim)**	**Fold Regulation (Katlı Regülasyon)**	**p**
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2			
BRCA1	34.31	32.58	3.69	1.53	0.077616	0.347017	4.47	4.47	0.318952
BRCA2	32.62	32.26	2.27	0.96	0.206613	0.515154	2.49	2.49	0.391309
RAD51	30.40	27.61	0.60	-3.14	0.660898	8.838773	13.37	13.37	0.352854

P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği

BRCA1, BRCA2 gen ekspresyonları grade grup 1'de grade grup 4'e göre düşük (aşağı regüle) olarak tespit edilmiştir. Rad51 gen ekspresyonu, grade grup 1'de grade grup 4'e göre yüksek (yukarı regüle) bulunmuştur. BRCA1 (p=0.603755), BRCA2 (p= 0.077213) ve RAD51 (p=0.594415) ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 19) (Şekil 15).

Tablo 19: Grade grup (Grade 1: Grup 1) (Grade 4: Grup 2)

Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı Değişim)**	**Fold Regulation (Katlı Regülasyon)**	**p**
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2			
BRCA1	34.31	33.69	3.69	4.69	0.077616	0.038711	0.50	-2.01	0.603755
BRCA2	32.62	33.04	2.27	3.89	0.206613	0.067244	0.33	-3.07	0.077213
RAD51	30.40	27.43	0.60	-1.05	0.660898	2.068936	3.13	3.13	0.594415

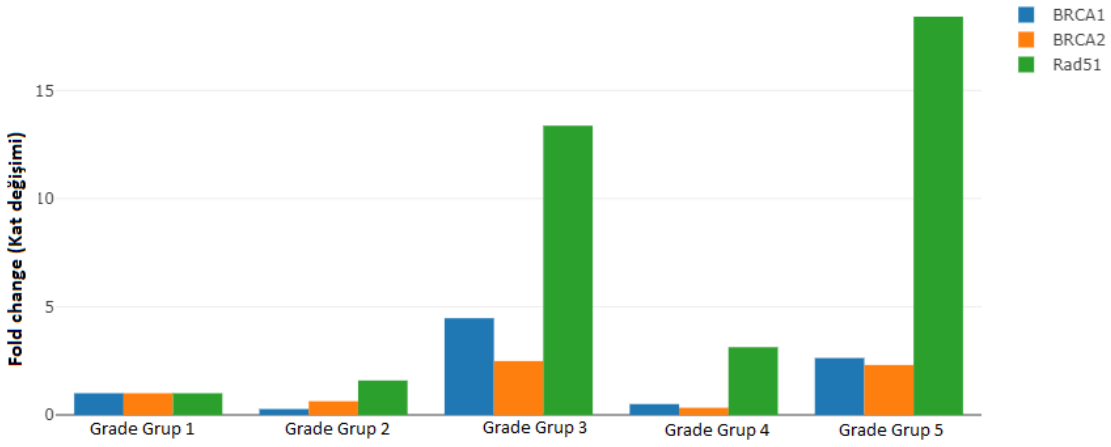
P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği

Çalışma sonuçlarımıza göre, BRCA1, BRCA2, Rad51 gen ekspresyonları grade grup 1'de grade grup 5'e göre yukarı regüle olarak tespit edilmiştir. BRCA1 (p=0.207763), BRCA2 (p=0.454905) ve RAD51 (p=0.267059) ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 20) (Şekil 15).

Tablo 20: Grade grup (Grade 1: Grup 1) (Grade 5: Grup 2)

Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı Değişim)**	**Fold Regulation (Katlı Regülasyon)**	**p**
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2			
BRCA1	34.31	31.92	3.69	2.29	0.077616	0.204476	2.63	2.63	0.207763
BRCA2	32.62	30.57	2.27	1.07	0.206613	0.476319	2.31	2.31	0.454905
RAD51	30.40	25.74	0.60	-3.60	0.660898	12.167830	18.41	18.41	0.267059

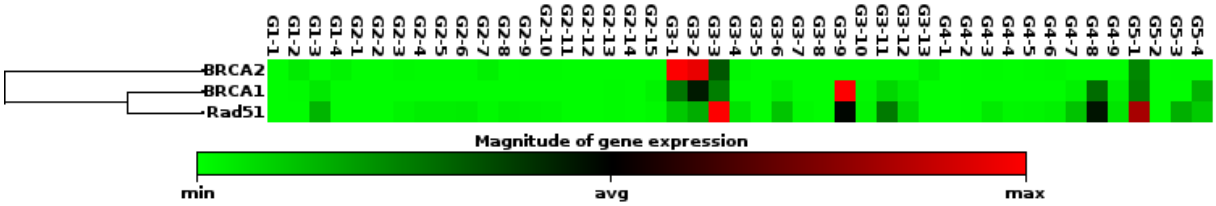
P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği



Şekil 15: Grade (G1: Grade 1, G2: Grade 2, G3: Grade 3, G4: Grade 4, G5: Grade 5) gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.

Isı haritası değerlendirildiğinde, grade grup 1'i grade grup 2'ye göre kıyasladığımızda BRCA1'in (yeşil kareler ağırlıkta), RAD51'in (yeşil kareler ağırlıkta) ve BRCA2'in (yeşil kareler ağırlıkta) düşük gen ekspresyonları gözlenmiştir. Grade grup 1'i grade grup 3'e göre karşılaştırdığımızda BRCA1'in (siyah ve kırmızı kareler ağırlıkta), RAD51'in (siyah ve kırmızı kareler ağırlıkta) ve BRCA2'in (siyah ve kırmızı kareler ağırlıkta) yüksek gen ekspresyonları görülmüştür. Grade grup 1'i grade grup 4'e göre karşılaştırdığımızda ise BRCA1'in (yeşil ve siyah kareler ağırlıkta), RAD51'in (yeşil ve

siyah kareler ağırlıkta) ve BRCA2'in (yeşil kareler ağırlıkta) düşük gen ekspresyonları tespit edilmiştir. Grade grup 1'i grade grup 5'e göre kıyasladığımızda BRCA1'in (yeşil ve siyah kareler ağırlıkta), RAD51'in (kırmızı ve siyah kareler ağırlıkta) ve BRCA2'in (yeşil kareler ağırlıkta) yüksek gen ekspresyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 16).



Şekil 16: QRT-PCR ile elde edilen Grade (G1: Grade 1, G2: Grade 2, G3: Grade 3, G4: Grade 4, G5: Grade 5) gruplarına ait clustergram sonuçları.

≤ 60 hasta bireyleri 61-73 yaş aralığındaki hasta bireylerle kıyasladığımızda BRCA1, BRCA2 ve RAD51 genlerinde (aşağı regüle olarak tespit edilmiştir. BRCA1 (p= 0.012191, katlı değişim=0.02, katlı regülasyon=-41.08), BRCA2 (p=0.000012, katlı değişim=0.02, katlı regülasyon=-63.22) ve RAD51 (p=0.000006, katlı değişim=0.03, katlı regülasyon=-38.94) ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 21) (Şekil 17).

Tablo 21: Yaş bilgileri (≤ 60: Grup 1, 61-73: Grup 2)

Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı Değişim)**	**Fold Regulation (Katlı Regülasyon)**	**p**
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2			
BRCA1	32.42	33.97	-1.23	4.13	2.350320	0.057216	0.02	-41.08	**0.012191**
BRCA2	29.83	31.71	-3.63	2.35	12.392785	0.196030	0.02	-63.22	**0.000012**
RAD51	27.20	29.05	-6.15	-0.86	70.801807	1.818276	0.03	-38.94	**0.000006**

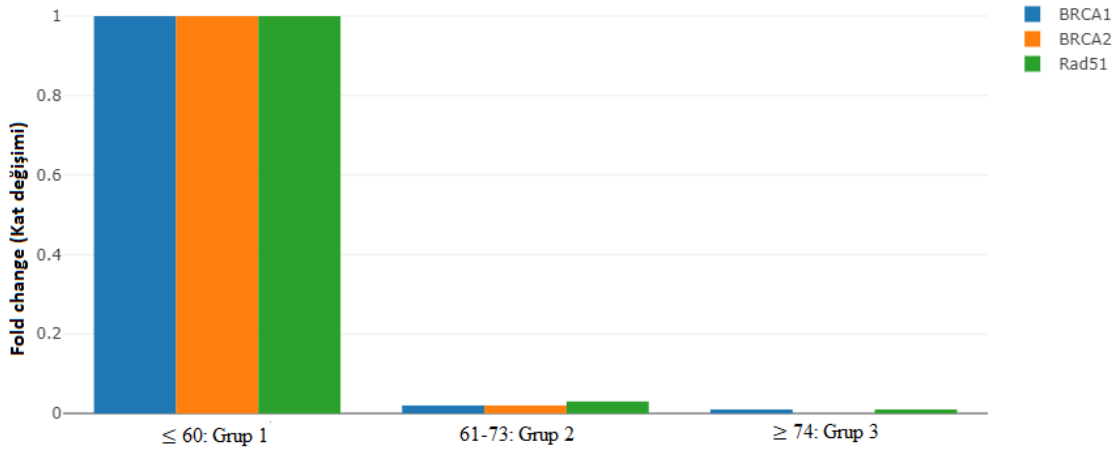
P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği

BRCA1 (p=0.002024, katlı değişim= 0.01, katlı regülasyon=-198.31), BRCA2 (p=0.036471, katlı değişim=0.00, katlı regülasyon=-1511.15) ve RAD51 (p=0.027714, katlı değişim=0.01, katlı regülasyon=-109.76) ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 22) (Şekil 17).

Tablo 22: Yaş bilgileri (≤ 60: Grup 1, ≥ 74: Grup 3)

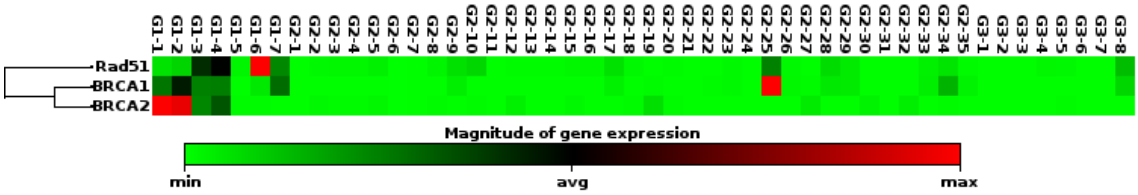
Genler	**AVG Ct**		**AVG ΔC_t**		**$2^{-AVG\ \Delta C_t}$**		**Fold Change (Katlı Değişim)**	**Fold Regulation (Katlı Regülasyon)**	**P**
	Grup 1	*Grup 3*	*Grup 1*	*Grup 3*	*Grup 1*	*Grup 3*			
BRCA1	32.42	33.09	-1.23	6.40	2.350320	0.011852	0.01	-198.31	**0.002024**
BRCA2	29.83	33.87	-3.63	6.93	12.392785	0.008201	0.00	-1511.15	**0.036471**
RAD51	27.20	26.78	-6.15	0.63	70.801807	0.645058	0.01	-109.76	**0.027714**

P değerİ p<0,05'den küçük anlamlı olarak kabul edildi. AVG: Ortalama, Ct: Döngü eşiği



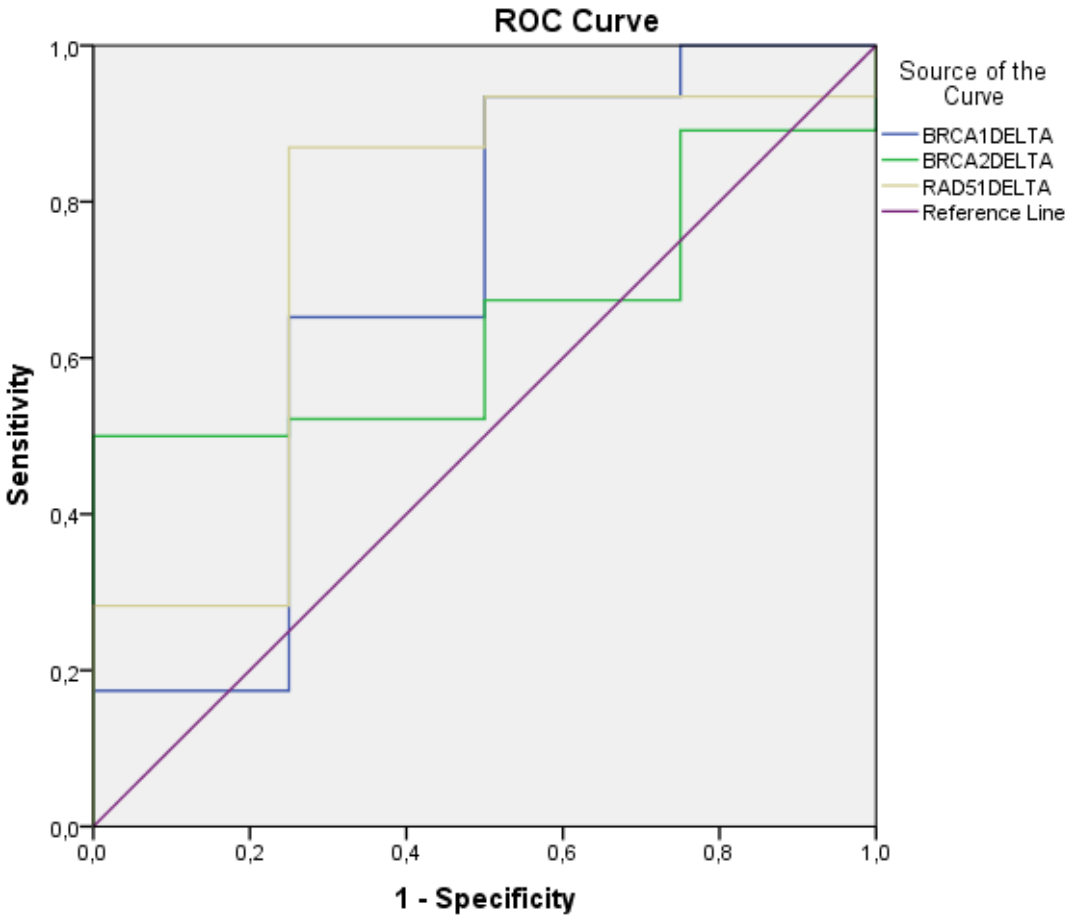
Şekil 17: Yaş (≤ 60: Grup 1, 61-73: Grup 2, ≥ 74: Grup 3) gruplarında incelenen genlerin kat değişim oranı ve anlamlılık değerleri.

Isı haritası değerlendirildiğinde, ≤ 60 yaş hasta bireylerin yer aldığı grup 1'i 61-73 yaş aralığındaki grup 2'ye göre kıyasladığımızda BRCA1'in (siyah kareler ağırlıkta), RAD51'in (siyah ve kırmızı kareler ağırlıkta) ve BRCA2'in (siyah ve kırmızı kareler ağırlıkta) yüksek gen ekspresyonları tespit edilmiştir. ≤ 60 yaş hasta bireylerin yer aldığı grup 1'i, ≥ 74 yaş aralığındaki grup 3'e göre karşılaştırdığımızda BRCA1'in (siyah kareler ağırlıkta), RAD51'in (siyah ve kırmızı kareler ağırlıkta) ve BRCA2'in (siyah ve kırmızı kareler ağırlıkta) yüksek gen ekspresyonları görülmüştür (Şekil 18).



Şekil 18: QRT-PCR ile elde edilen yaş (≤ 60: Grup 1, 61-73: Grup 2, ≥ 74: Grup 3) gruplarına ait clustergram sonuçları.

ROC analizi sonuçlarına göre, nüks olmayan PCa'lı hastalar ve nüks olan PCa'lı hastalar karşılaştırıldığında değişkenlerden BRCA1, BRCA2 ve RAD51 genleri istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmemiştir (p>0.05) (Şekil 19, Tablo 23).



Şekil 19: ROC eğrisi

Tablo 23: Eğri altında kalan değerler

Analiz sonucu değişkenler	Area	Std. Error[a]	Asymptotic Sig.[b]	% 95 Güven Aralığı	
				Alt Sınır	Üst Sınır
BRCA1	,690	,167	,211	,364	1,000
BRCA2	,647	,098	,334	,455	,839
RAD51	,755	,143	,093	,476	1,000

5. TARTIŞMA

BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar PCa riskiyle ilişkilidir. BRCA1/2 mutasyon taşıyıcıları arasında prostat kanseri insidansı ve taramasına ilişkin çeşitli prospektif çalışmalar, genel popülasyonla karşılaştırıldığında BRCA2 mutasyonu taşıyıcıları arasında prostat kanseri riskinde en az iki ila dört kat artış olduğunu göstermiştir. BRCA2 mutasyonları tanı sırasında daha agresif, yüksek dereceli hastalık özellikleri, daha agresif klinik davranış ve prostat kanserine özgü mortalitenin daha yüksek olmasıyla ilişkilidir. BRCA1 mutasyonlarına ilişkin risk, BRCA2'ye kıyasla azalmış gibi görünmektedir [34].

Mitra ve arkadaşları, BRCA1 veya BRCA2 mutasyonları olsun veya olmasın, eşleşen bir PCa serisinde, RAD51 protein ekspresyonunun BRCA mutasyon genotipleriyle bağlantılı olarak arttığı hipotezini test etmişlerdir. İmmünohistokimyasal olarak tanımlanan RAD51 ekspresyonu, BRCA1 veya BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında ortaya çıkan PCa'larda ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır. Benign dokuların sitoplazma ve çekirdeklerinde RAD51 protein ekspresyonu malign dokulara göre anlamlı derecede daha az bulunmuştur [32].

Bu tez çalışmasında sonuçlarımıza göre; BRCA1 ve RAD51 gen ekspresyonları hastalarda kontrollere göre aşağı regüle iken BRCA2 gen ekspresyonu yukarı regüle tespit edildi. PCa'lı hastalarda BRCA1'in ekspresyon düzeyi anlamlı bulundu. Çalışmamızda, BRCA1, BRCA2 ve RAD51 mutasyon durumundan bağımsız bir şekilde bazı PCa'lı hastalarda ailesel geçiş olduğu bildirilmiştir. Bu durum, hastalığın gelişiminde genetik yatkınlığın olduğu göstermektedir. Bu sebeple, ailesel prostat kanserine yönelik genetik yatkınlık testlerinin rutinde kullanılmasına yönelik gelişmelerin sağlanmasıyla kişiselleştirilmiş prostat kanser riski taramasının ve tedavi yaklaşımlarının değerlendirilmesi açısından önem arz etmektedir.

Tüm kanserlerde, RAD51'in sitoplazmik ekspresyonu daha yaygın bulunmuş olup, BRCA mutasyon durumuna bakılmaksızın iyi huylu dokulardaki ekspresyonuna göre daha yüksek Gleason skoru ile ilişkili olarak belirlenmiştir. Gleason skoru ≤7 olan BRCA ilişkili kanserlerde nükleer boyanma görülmemekle birlikte, diğer tüm PCa gruplarında benign dokuya göre anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir. RAD51 proteini, sporadik veya BRCA germ hattı mutasyonlarıyla ilişkili olsun ya da

olmasın, yüksek dereceli PCa'larda güçlü bir şekilde eksprese edilmektedir. RAD51'in sitoplazma ve çekirdek arasında belirgin lokalizasyonu, özellikle Gleason skoru ≤ 7 olan kanserlerde, transkripsiyondan DNA onarımına kadar farklı RAD51 düzenleyici aktivite seviyelerini yansıtmaktadır [32].

Çalışmamızda, BRCA1 ve RAD51 gen ekspresyonları gleason skor grup 6 ve 7 olan grup 1'de gleason skor grup 8 ve 9 olan grup 2'e göre yukarı regüle iken BRCA2 gen ekspresyonu aşağı regüle tespit edildi. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Gleason skor grup 6 ve 7 olan grup 1 hastalarında RAD51'in ekspresyon düzeyi anlamlı bulundu. BRCA1, BRCA2 ve Rad51 gen ekspresyonları gleason skor grup 6 olan grup 1'de gleason skor grup 7,8 ve 9 olan grup 2'e göre yukarı regüle olarak belirlendi. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekspresyonları gleason skor grup 6 olan grup 1'de, gleason skor grup 7 olan grup 2'ye göre kıyaslandığında yukarı regüle olarak bulundu. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Çalışmamızda, BRCA1, BRCA2 gen ekspresyonları grade grup 1'de grade grup 2'ye göre aşağı regüle olarak tespit edildi. RAD51 gen ekspresyonu, grade grup 1'de grade grup 2'ye göre yukarı regüle bulundu. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmedi. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 gen ekspresyonları grade grup 1'de grade grup 3'e göre yukarı regüle olarak tespit edildi. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. BRCA1, BRCA2 gen ekspresyonları grade grup 1'de grade grup 4'e göre aşağı regüle olarak belirlendi. RAD51 gen ekspresyonu, grade grup 1'de grade grup 4'e göre yukarı regüle bulundu. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Çalışma sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde, BRCA1, BRCA2, RAD51 gen ekspresyonları grade grup 1'de grade grup 5'e göre yukarı regüle olarak tespit edildi. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

BRCA2 taşıyıcılarında, taşıyıcı olmayanlara göre kastrasyon metastazı ilerleyen biyokimyasal nüks sıklığının daha yüksek olduğu yönünde bir eğilimi bulunmaktadır. BRCA1 taşıyıcılarında kontrollerle karşılaştırıldığında biyokimyasal nüksetme sonrası

kastrasyon metastazı sıklığında fark tespit edilmemiştir. Ayrıca, 7254 prostat kanserli olguların yıllık takibinin yapıldığı bir çalışmada, BRCA2 ve BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarında nüksetme ve prostat kanserine özgü ölüm riski, taşıyıcı olmayanlara göre daha yüksek olarak belirlenmiştir [35]. Bizim çalışmamızda ise, BRCA1 ve RAD51 gen ekspresyonları nüks olan hastalarda nüks olmayan hasta grubu göre yukarı regüle olarak tespit edildi. Nüks olan prostat kanserli hastalarda BRCA1'in ekspresyon düzeyi anlamlı olarak belirlendi.

Metastatik PCa'lı erkeklerde DDR genlerinde germ hattı mutasyonunun görülme sıklığı %11 ile %33 arasında değişmektedir ve lokalize PCa'lı erkeklerdeki görülme sıklığı ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksektir. Pritchard ve arkadaşları, metastatik PCa'lı 692 hastanın %11'inin 16 DDR geninde kalıtsal mutasyonlar barındırdığını göstermişlerdir. En sık görülen sapma BRCA2 (%5,3) olurken, onu ATM (%1,6), CHEK2 (%1,9), BRCA1 (%0,9) ve RAD51 (%0,4) izlemiştir. Mutasyon sıklığı PCa aile öyküsüne veya tanı anındaki yaşa göre farklılık göstermemiştir. Çok merkezli bütünleştirici bir klinik sıralama analizinde, 150 metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri (mCRPC) biyopsisinin %23'ünün DDR anormallikleri açısından pozitif olduğu bulunmuştur. BRCA2 örneklerin %13'ünde mutasyona uğramış, bunu ATM (%7,3), MSH2 (%2), BRCA1, FANCA, MLH1 ve RAD51 (%0,3) izlemiştir [36].

Yapılan çalışmalarda, hem BRCA1 hem de BRCA2 genlerindeki trans-heterozigot mutasyonlar, tek heterozigot BRCA mutasyon taşıyıcılarına kıyasla erken başlangıç yaşı ve ciddi hastalık ile klinik olarak ilişkili bulunmuştur [37]. Edwards ve arkadaşları, BRCA2 mutasyonlarının erken başlangıçlı prostat kanserine katkısını değerlendirmek için, 55 yaşında prostat kanseri tanısı alan 263 erkekte germline mutasyonları için BRCA2'nin tam kodlama dizisini taramışlardır. Zararlı bir germ hattı BRCA2 mutasyonundan kaynaklı 56 yaşına kadar prostat kanserine yakalanma göreceli riski 23 kat olduğunu tespit etmişlerdir [38].

Bizim çalışmamızda ise, ≤ 60 hasta bireyleri 61-73 yaş aralığındaki hasta bireylerle kıyasladığımızda BRCA1, BRCA2 ve Rad51 genlerinde aşağı regüle olarak belirlendi. BRCA1 BRCA2 ve RAD51 (p:0.000006) ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Elde ettiğimiz sonuçların yaşla ilişkili diğer çalışmalarla bağlantılı bir şekilde bulunduğunu ve erken yaşlarda prostat kanseri görülme riskini arttığını göstermektedir.

Bulgularımızdan 60 yaş altı genç populasyon oranının istatistiksel olarak BRCA1 yüksek ekspresyonu ile ilişkili olması literatür ile uyumlu iken, benzer uyumluluk BRCA2 yüksek ekspresyonu ile ilişkili bulunmamıştır. Bunun yanında, Gleason 8 ve üzeri olan yüksek riskli hasta grubunda da yüksek BRCA1 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı olmasa da klinik olarak dikkate değer düzeyde (p=0.069) bulunmuştur. Buna benzer bir ilişki BRCA2 yüksek ekspresyonu ile tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar, örneklem sayısının az olması ile açıklanabileceği gibi, toplumsal farklılıklarının farklı genetik bulgularla ilişki olabileceği yorumunu da beraberinde getirmiştir.

Çalışmadaki hastalar radikal prostatektomiye uygun olarak cerrahi tedavi ile kür elde etme olasılığı oldukça yüksek olan lokalize ve/veya lokal ileri evrede iken, tanı anında metastazı olan hasta yok idi. Bu durum, çalışma örnekleminin prostat kanserinin her evresini temsil etmemesi bakımından bulguların değerlendirilmesinde sınırlayıcı bir rol oynamıştır. Öte yandan; düşük riskli kabul edilen Gleason 6, orta riskli kabul edilen Gleason 7 ve yüksek riskli kabul edilen Gleason 8 ve üstü olan derecelerin sırasıyla, %14.3, % 63.3 ve % 22.4 oranlarında olması örneklemin görece dengesiz dağılması nedeniyle bir diğer sınırlayıcı faktör olarak kabul edilmiştir.

ROC analizi sonuçları değerlendirildiğinde, nüks olmayan prostat kanserli hastaları nüks olan prostat kanserli hastalarla kıyasladığımızda BRCA1, BRCA2 ve RAD51 genlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Tez çalışmamızda nüks olan hasta sayısı az olduğu için istatistiksel anlamlılık tespit edilememekle birlikte RAD51 geninin istatistiksel anlamlılığa yakın olduğunu düşünecek olursak nüks hasta sayısının artması durumunda istatistiksel açıdan anlamlı olabileceğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla RAD51 tanıda önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabilir.

BRCA genleri, prostat kanserinde hücresel hasar yanıtında önemli bir rol oynayan tümör baskılayıcılardır. BRCA mutasyonu, prostat kanseriyle ilişkili olduğu bilinen tek genetik faktördür. Çoklu etnik kökenler arasında yapılan çalışmalar, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının yalnızca prostat kanseri riskini arttırmakla kalmayıp aynı zamanda hastaları erken başlangıçlı ve agresif, potansiyel olarak ölümcül hastalığa yatkın hale getirdiğini tutarlı bir şekilde göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda özellikle BRCA1 geninin prostat Ca tanısı ve prognozunda biyomarker olarak kullanılabileceği görüşünü paylaşmaktayız. RAD51 bir biyobelirteç olarak, teşhis

sırasında acil tedavi gerektiren hastaların belirlenmesinde ve insan prostat kanserinin agresif fenotipinin altında yatan biyolojik mekanizmaların analiz edilmesinde değerli olabilir.

Sonuç olarak, BRCA1 ve BRCA2, DNA onarımında rol oynayan hücresel proteinlerdir. BRCA germline mutasyonlarının araştırılması prostat kanserinin moleküler etki mekanizmalarında ve terapötik etkilerinin tespitinde önemlidir. Hem BRCA1 hem de BRCA2 mutasyonlarının prostat kanseri riskini arttırmaktadır. BRCA1 ve BRCA2, S fazı sırasında ve DNA hasarından sonra bakteriyel protein RecA'nın memeli homologu olan RAD51 ile aynı yerde bulunur. RAD51 ise, DNA onarımı ve homolog rekombinasyonda hayati bir rol oynamaktadır. Dolayısıyla tez çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, DNA onarım mekanizmasında etkin role sahip olan bu üç genin prostat kanseriyle olan ilişkisine yönelik literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Rawla, P., *Epidemiology of Prostate Cancer.* World J Oncol, 2019. **10**(2): p. 63-89.
2. Rebbeck, T.R., *Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography.* Semin Radiat Oncol, 2017. **27**(1): p. 3-10.
3. Castro, E. and R. Eeles, *The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer.* Asian J Androl, 2012. **14**(3): p. 409-14.
4. Mehrgou, A. and M. Akouchekian, *The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development.* Med J Islam Repub Iran, 2016. **30**: p. 369.
5. Yoshida, K. and Y. Miki, *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage.* Cancer Sci, 2004. **95**(11): p. 866-71.
6. Roy, R., J. Chun, and S.N. Powell, *BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection.* Nat Rev Cancer, 2011. **12**(1): p. 68-78.
7. Prakash, R., et al., *Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(4): p. a016600.
8. *National Library of Medicine - National Institutes of Health*. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672.
9. Cavanagh, H. and K.M. Rogers, *The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers.* Hered Cancer Clin Pract, 2015. **13**(1): p. 16.
10. Schayek, H., et al., *Tumor suppressor BRCA1 is expressed in prostate cancer and controls insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) gene transcription in an androgen receptor-dependent manner.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(5): p. 1558-65.
11. Li, H., et al., *Functional annotation of variants of the BRCA2 gene via locally haploid human pluripotent stem cells.* Nat Biomed Eng, 2024. **8**(2): p. 165-176.
12. Reeves, F., et al., *The Surgical Anatomy of the Prostate.* Prostate Cancer (Second Edition), 2016: p. 253-263.
13. Wang, G., et al., *Genetics and biology of prostate cancer.* Genes Dev, 2018. **32**(17-18): p. 1105-1140.
14. Ittmann, M., *Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(5).
15. Langan, R.C., *Benign Prostatic Hyperplasia.* Prim Care, 2019. **46**(2): p. 223-232.
16. Devlin, C.M., M.S. Simms, and N.J. Maitland, *Benign prostatic hyperplasia - what do we know?* BJU Int, 2021. **127**(4): p. 389-399.
17. Zorlu, F., et al., *Prostate cancer incidence in Turkey: an epidemiological study.* Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(21): p. 9125-30.
18. Humphrey, P.A. and G.L. Andriole, *Prostate cancer diagnosis.* Mo Med, 2010. **107**(2): p. 107-12.

19. Pugliese, D., et al., *Clinical, pathological and molecular prognostic factors in prostate cancer decision-making process.* Urologia, 2016. **83**(1): p. 14-20.
20. Humphrey, P.A., *Histopathology of Prostate Cancer.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2017. **7**(10).
21. Sehn, J.K., *Prostate Cancer Pathology: Recent Updates and Controversies.* Mo Med, 2018. **115**(2): p. 151-155.
22. Woo, S., S. Ghafoor, and H.A. Vargas, *Contribution of Radiology to Staging of Prostate Cancer.* Semin Nucl Med, 2019. **49**(4): p. 294-301.
23. Borley, N. and M.R. Feneley, *Prostate cancer: diagnosis and staging.* Asian J Androl, 2009. **11**(1): p. 74-80.
24. Litwin, M.S. and H.J. Tan, *The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review.* JAMA, 2017. **317**(24): p. 2532-2542.
25. Faisal, F.A. and T.L. Lotan, *The Genomic and Molecular Pathology of Prostate Cancer: Clinical Implications for Diagnosis, Prognosis, and Therapy.* Adv Anat Pathol, 2020. **27**(1): p. 11-19.
26. Miyahira, A.K., et al., *Prostate cancer research: The next generation; report from the 2019 Coffey-Holden Prostate Cancer Academy Meeting.* Prostate, 2020. **80**(2): p. 113-132.
27. Vietri, M.T., et al., *Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(7).
28. Fontana, F., M. Anselmi, and P. Limonta, *Molecular mechanisms and genetic alterations in prostate cancer: From diagnosis to targeted therapy.* Cancer Lett, 2022. **534**: p. 215619.
29. Bergengren, O., et al., *2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors-A Systematic Review.* Eur Urol, 2023. **84**(2): p. 191-206.
30. Shah, S., et al., *BRCA Mutations in Prostate Cancer: Assessment, Implications and Treatment Considerations.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(23).
31. Nyberg, T., et al., *Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study.* Eur Urol, 2020. **77**(1): p. 24-35.
32. Mitra, A., et al., *Overexpression of RAD51 occurs in aggressive prostatic cancer.* Histopathology, 2009. **55**(6): p. 696-704.
33. Holeckova, K., et al., *Germline Mutations in DNA Repair Genes in Patients With Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer.* In Vivo, 2020. **34**(4): p. 1773-1778.
34. Rajwa, P., et al., *Prostate cancer risk, screening and management in patients with germline BRCA1/2 mutations.* Nat Rev Urol, 2023. **20**(4): p. 205-216.
35. Gallagher, D.J., et al., *Germline BRCA mutations denote a clinicopathologic subset of prostate cancer.* Clin Cancer Res, 2010. **16**(7): p. 2115-21.
36. Messina, C., et al., *BRCA Mutations in Prostate Cancer: Prognostic and Predictive Implications.* J Oncol, 2020. **2020**: p. 4986365.
37. Boussios, S., et al., *BRCA Mutations in Ovarian and Prostate Cancer: Bench to Bedside.* Cancers (Basel), 2022. **14**(16).
38. Edwards, S.M., et al., *Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene.* Am J Hum Genet, 2003. **72**(1): p. 1-12.

HAM VERİLER

Tablo 24: BRCA1 geni için tüm hasta grubundaki Ct değerleri

Hasta grubu	**Housekeeping gen Ct değeri**	**Hedef gen Ct değeri**	**ΔCt**	**ΔΔCt**	**2^-ΔΔCt**
H1	22,31	30,48	8,17	7,14	0,01
H2	36,56	32,18	-4,38	-5,41	42,52
H3	36,09	31,43	-4,66	-5,69	51,63
H4	32,64	29,95	-2,69	-3,72	13,18
H5	33,07	30,33	-2,74	-3,77	13,64
H6	23,68	28,01	4,33	3,3	0,10
H7	30,26	38,96	8,7	7,67	0,00
H8	29,81	36,83	7,02	5,99	0,02
H9	28,68	35,94	7,26	6,23	0,01
H10	30,53	35,6	5,07	4,04	0,06
H11	18,4	31,27	12,87	11,84	0,00
H12	25,09	31,76	6,67	5,64	0,02
H13	22,35	31,11	8,76	7,73	0,00
H14	29,4	35,73	6,33	5,3	0,03
H15	24,36	31,77	7,41	6,38	0,01
H16	31,58	31,94	0,36	-0,67	1,59
H17	27,86	36,17	8,31	7,28	0,01
H18	28,7	37,14	8,44	7,41	0,01
H19	27,1	38,34	11,24	10,21	0,00
H20	27,16	32,4	5,24	4,21	0,05
H21	31,47	37,69	6,22	5,19	0,03
H22	28,31	35,23	6,92	5,89	0,02
H23	28,98	36,05	7,07	6,04	0,02
H24	24,28	34,51	10,23	9,2	0,00
H25	39,23	34,82	-4,41	-5,44	43,41
H26	30,74	37,67	6,93	5,9	0,02
H27	27,5	37,75	10,25	9,22	0,00
H28	33,25	33,84	0,59	-0,44	1,36
H29	29,19	35,61	6,42	5,39	0,02
H30	26,01	33,66	7,65	6,62	0,01
H31	32,71	36,81	4,1	3,07	0,12
H32	29,59	35,92	6,33	5,3	0,03
H33	28,1	35,09	6,99	5,96	0,02
H34	22,28	30,68	8,4	7,37	0,01

H35	27,75	31,01	3,26	2,23	0,21
H36	28,99	31,22	2,23	1,2	0,44
H37	23,66	31,8	8,14	7,11	0,01
H38	34,17	29,45	-4,72	-5,75	53,82
H39	34,06	31,13	-2,93	-3,96	15,56
H40	29,4	30,71	1,31	0,28	0,82
H41	33,08	32,05	-1,03	-2,06	4,17
H42	31,96	37,19	5,23	4,2	0,05
H43	32,35	32,19	-0,16	-1,19	2,28
H44	31,66	31,67	0,01	-1,02	2,03
H45	31,27	36,09	4,82	3,79	0,07
H46	28,07	35,17	7,1	6,07	0,01
H47	31,71	38,27	6,56	5,53	0,02
H48	30,86	31,22	0,36	-0,67	1,59
H49	31,79	29,83	-1,96	-2,99	7,94
H50	28,46	29,23	0,77	-0,26	1,20

Tablo 25: BRCA2 geni için tüm hasta grubundaki Ct değerleri

Hasta grubu	**Housekeeping gen Ct değeri**	**Hedef gen Ct değeri**	**ΔCt**	**ΔΔCt**	**2^-ΔΔCt**
H1	22,31	32,09	9,78	4,68	0,04
H2	36,56	27,41	-9,15	-14,25	19483,97
H3	36,09	27,47	-8,62	-13,72	13493,72
H4	32,64	27,16	-5,48	-10,58	1530,73
H5	33,07	27,07	-6	-11,1	2194,99
H6	23,68	34,29	10,61	5,51	0,02
H7	30,26	29,27	-0,99	-6,09	68,12
H8	29,81	29,22	-0,59	-5,69	51,63
H9	28,68	29,02	0,34	-4,76	27,10
H10	30,53	29,21	-1,32	-6,42	85,63
H11	18,4	36	17,6	12,5	0,00
H12	25,09	35,63	10,54	5,44	0,02
H13	22,35	38,36	16,01	10,91	0,00
H14	29,4	28,96	-0,44	-5,54	46,53
H15	24,36	34,04	9,68	4,58	0,04
H16	31,58	37,65	6,07	0,97	0,51
H17	27,86	27,51	-0,35	-5,45	43,71
H18	28,7	29,03	0,33	-4,77	27,28
H19	27,1	29,29	2,19	-2,91	7,52
H20	27,16	30,62	3,46	-1,64	3,12
H21	31,47	29,28	-2,19	-7,29	156,50

H22	28,31	29,53	1,22	-3,88	14,72
H23	28,98	29,23	0,25	-4,85	28,84
H24	24,28	28,53	4,25	-0,85	1,80
H25	39,23	34,91	-4,32	-9,42	685,02
H26	30,74	29,56	-1,18	-6,28	77,71
H27	27,5	29,25	1,75	-3,35	10,20
H28	33,25	35,89	2,64	-2,46	5,50
H29	29,19	29	-0,19	-5,29	39,12
H30	26,01	36,88	10,87	5,77	0,02
H31	32,71	29,15	-3,56	-8,66	404,50
H32	29,59	29,01	-0,58	-5,68	51,27
H33	28,1	28,7	0,6	-4,5	22,63
H34	22,28	36,96	14,68	9,58	0,00
H35	27,75	34,04	6,29	1,19	0,44
H36	28,99	34,39	5,4	0,3	0,81
H37	23,66	37,14	13,48	8,38	0,00
H38	34,17	35,37	1,2	-3,9	14,93
H39	34,06	35,78	1,72	-3,38	10,41
H40	29,4	35,37	5,97	0,87	0,55
H41	33,08	36,9	3,82	-1,28	2,43
H42	31,96	29,18	-2,78	-7,88	235,57
H43	32,35	34,98	2,63	-2,47	5,54
H44	31,66	34,4	2,74	-2,36	5,13
H45	31,27	29,18	-2,09	-7,19	146,02
H46	28,07	28,98	0,91	-4,19	18,25
H47	31,71	29,16	-2,55	-7,65	200,85
H48	30,86	34,12	3,26	-1,84	3,58
H49	31,79	31,99	0,2	-4,9	29,86
H50	28,46	33,7	5,24	0,14	0,91

Tablo 26: RAD51 geni için tüm hasta grubundaki Ct değerleri

Hasta grubu	Housekeeping gen Ct değeri	Hedef gen Ct değeri	ΔCt	ΔΔCt	2^-ΔΔCt
H1	22,31	26,67	4,36	6,26	0,01
H2	36,56	30,51	-6,05	-4,15	17,75
H3	36,09	29,89	-6,2	-4,3	19,70
H4	32,64	25,16	-7,48	-5,58	47,84
H5	33,07	25,32	-7,75	-5,85	57,68
H6	23,68	26,98	3,3	5,2	0,03
H7	30,26	28,26	-2	-0,1	1,07
H8	29,81	27,23	-2,58	-0,68	1,60
H9	28,68	26,09	-2,59	-0,69	1,61
H10	30,53	27,01	-3,52	-1,62	3,07
H11	18,4	27,35	8,95	10,85	0,00
H12	25,09	27,64	2,55	4,45	0,05
H13	22,35	27,48	5,13	7,03	0,01
H14	29,4	26,42	-2,98	-1,08	2,11
H15	24,36	26,88	2,52	4,42	0,05
H16	31,58	26,97	-4,61	-2,71	6,54
H17	27,86	22,8	-5,06	-3,16	8,94
H18	28,7	25,9	-2,8	-0,9	1,87
H19	27,1	24,63	-2,47	-0,57	1,48
H20	27,16	37,7	10,54	12,44	0,00
H21	31,47	30,65	-0,82	1,08	0,47
H22	28,31	26,66	-1,65	0,25	0,84
H23	28,98	27,14	-1,84	0,06	0,96
H24	24,28	23,47	-0,81	1,09	0,47
H25	39,23	26,24	-12,99	-11,09	2179,83
H26	30,74	28,31	-2,43	-0,53	1,44
H27	27,5	25,1	-2,4	-0,5	1,41
H28	33,25	28,63	-4,62	-2,72	6,59
H29	29,19	27,18	-2,01	-0,11	1,08
H30	26,01	27,06	1,05	2,95	0,13
H31	32,71	33,53	0,82	2,72	0,15
H32	29,59	27,91	-1,68	0,22	0,86
H33	28,1	30,13	2,03	3,93	0,07
H34	22,28	26,98	4,7	6,6	0,01
H35	27,75	27,28	-0,47	1,43	0,37
H36	28,99	26,83	-2,16	-0,26	1,20
H37	23,66	27,92	4,26	6,16	0,01
H38	34,17	27,45	-6,72	-4,82	28,25
H39	34,06	27,43	-6,63	-4,73	26,54

H40	29,4	27,24	-2,16	-0,26	1,20
H41	33,08	27,27	-5,81	-3,91	15,03
H42	31,96	34,52	2,56	4,46	0,05
H43	32,35	27,42	-4,93	-3,03	8,17
H44	31,66	27,63	-4,03	-2,13	4,38
H45	31,27	31,77	0,5	2,4	0,19
H46	28,07	31,16	3,09	4,99	0,03
H47	31,71	32,28	0,57	2,47	0,18
H48	30,86	27,49	-3,37	-1,47	2,77
H49	31,79	27,36	-4,43	-2,53	5,78
H50	28,46	27,25	-1,21	0,69	0,62

FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI