

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra 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)

**B-HÜCRELİ HODGKİN DIŞI LENFOMADA
MIR-15A / MIR-16-1 GENLERİNİN İFADE
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ŞEREF BUĞRA TUNÇER

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YAZICI ÖZBEK**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
DENEYSEL VE MOLEKÜLER ONKOLOJİ
PROGRAMI**

İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Deneyisel ve Moleküler Onkoloji Programında Şeref Buğra TUNÇER tarafından
hazırlanan "B-Hücreli Hodgkin Dışı Lenfomada miR-15A/miR-16-1 Genlerinin İfade
Düzeylerinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz
tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

27 / 06 / 2012

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

1. Prof. Dr. M. Nejat DALAY / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı

2. Prof. Dr. Vildan YASASEVER / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı

3. Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji
Anabilim Dalı / Danışman

4. Prof. Dr. Fatma Canan ALATLI / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji Anabilim Dalı

5. Prof. Dr. Rasim MERAL / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ŞEREF BUĞRA TUNÇER

İTHAF

Kanser nedeniyle hayatını kaybeden tüm insanlara ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Müdürü Prof.Dr.Ahmet Kızır'e

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanımız, Prof. Dr.Mehmet Nejat Dalay'a

Yüksek Lisans Eğitimim ve Akademik kariyerime ilk adımım olan tez çalışmamın başından sonuna her aşamasında bana yön veren, yardım ve tavsiyelerde bulunan, tez danışmanım, değerli hocam Prof.Dr. Hülya Yazıcı Özbek'e

DBBHL hasta grubunu oluşturmamda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Melih Aktan'a, Uzm.Dr. Meltem Ekenel ve Uzm.Dr.Leyla Kılıç'a

Tezim ile ilgili istatistiksel analizleri gerçekleştiren Dr.Sevda Özel'e

Desteklerini esirgemeyen değerli meslektaşlarım; MSc.Seda Kılıç, MSc.Özge Şükrüoğlu, BSc.Mukaddes Avşar, BSc.Demet Akdeniz ve değerli teknisyenlerimiz Arzu Burnuva, Necmiye Koçak ile Türkan Şen Feradoğlu'na

Her zaman yanımda olan ve sonsuz destekleri için sevgili ailem Mustafa & Nurten Tunçer, Berk Tunçer ve Büşra Tangülü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 17516

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. B-Hücre gelişim aşamaları.....	3
2.2. Hodgkin Dışı Lenfomalar	6
2.2.1. Epidemiyolojisi	6
2.3. Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma (DBBHL).....	10
2.3.1. Genel Özellikleri ve Sıklığı.....	10
2.3.2. Sınıflandırılması.....	10
2.3.3. Klinik Özellikleri	10
2.3.4. Morfolojisi	12
2.3.5. İmmünofenotip.....	12
2.4. MikroRNA (miRNA).....	13
2.4.1. MikroRNA genleri ve yapısı.....	13
2.4.2. MikroRNA'ların oluşum mekanizması.....	14
2.4.3. mikroRNA'lar ve Kanser	17
2.4.4. Kanserde mikroRNA aktivitesinin çeşitli meknizmalarla bozulması	18
2.4.4.1. miRNA ifade düzeyinin değişmesi	18
2.4.4.2. miRNA işlenmesinin değişmesi	18
2.4.4.3. miRNA: mRNA eşleşmesini sağlayan dizilerde mutasyonlar	18
2.4.5. mikroRNA'larda mutasyonlar.....	18

2.4.6. miR-15a/16-1	19
2.4.6.1. Genel Özellikleri	19
2.4.6.2. Kanserde miR-15a/16-1 düzenlenme değişiklikleri.....	19
2.4.6.3. miR-15a/16-1'in kanser hücrelerindeki fonksiyonu	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Gereç	22
3.1.1. Materyal	22
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	22
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	23
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	23
3.2. Deney Yöntemleri.....	24
3.2.1. Periferik Kandan CD19 ⁽⁺⁾ ve CD20 ⁽⁺⁾ Hücre Ayırıştırılması.....	24
3.2.2. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu	25
3.2.3. miRNA İzolasyonu	26
3.2.4. miRNA'ların Saflık ve Konstransyon Analizleri.....	27
3.2.5. miRNA'lara Poli A Kuyruğu Ekleme Reaksiyonu	27
3.2.6. cDNA Sentezi	28
3.2.7. Gerçek Zamanlı PZR	29
4. BULGULAR.....	32
4.1. Gen İfade Düzeyleri.....	33
5. TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	53
FORMLAR	57
ETİK KURUL KARARI	60
PATENT HAKKI İZNİ	63
TELİF HAKKI İZNİ.....	64
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: WHO'ya göre Lenfoma Sınıflaması.....	8
Tablo 2.2: Türkiye'deki Beş Büyük Merkezin Hodgkin Dışı Lenfoma ile ilgili göreceli sıklık oranları	9
Tablo 2.3: Diffüz Büyük Hücreli Lenfomaların sınıflaması.....	11
Tablo 3.1: Poli A Kuyruğu Ekleme Reaksiyonu	27
Tablo 3.2: cDNA Oluşturma Reaksiyonu Öncesi Adaptör Bağlanması.....	28
Tablo 3.3: cDNA Sentez Reaksiyonu	29
Tablo 3.4: Gerçek Zamanlı PZR Koşulları	30
Tablo 4.1: Hasta ve kontrol gruplarının dağılımları ve yaş ortalamaları.....	32
Tablo 4.2: DBBHL'lı hastalarda miR-15a geni ile <i>LET-7</i> referans geni arasındaki farkın C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.....	36
Tablo 4.3: DBBHL'lı hastalarda miR-16-1 geni ile <i>LET-7</i> referans geni arasındaki farkın C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.....	37
Tablo 4.4: Sağlıklı kontrollerde miR-15a geni ile <i>LET-7</i> referans geni arasındaki farkın C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.....	38
Tablo 4.5: Sağlıklı kontrollerde miR-16-1 geni ile <i>LET-7</i> referans geni arasındaki farkın C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.	38
Tablo 4.6: miR-15a geni için hasta ve kontrol grubunun $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.	39
Tablo 4.7: miR-16-1 geni için hasta ve kontrol grubunda $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.	39
Tablo 4.8: Hasta ve kontrol grubunda yaş ile miR-15a hedef geni ile <i>LET-7</i> referans genine ait C_T değerlerinin ortalama, standart sapma, medyan minimum ve maksimum değerleri.	41
Tablo 4.9: Hasta ve kontrol grubunda miR-16-1 hedef geni ile <i>LET-7</i> referans genine ait C_T değerlerinin ortalama, standart sapma, medyan minimum ve maksimum değerleri.	42
Tablo 4.10: Kolmogorov-Smirnov testi ile hasta ve kontrol grubunda miR-15a genine ait ΔC_T değerlerinin karşılaştırılması.	42
Tablo 4.11: Kolmogorov-Smirnov Testi ile hasta ve kontrol grubunda miR-16-1 genine ait ΔC_T değerlerinin karşılaştırılması.....	43
Tablo 4.12: Mann-Whitney U Testi.....	47
Tablo 4.13: Test İstatistiği	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: B-Hücre Gelişimi.....	5
Şekil 2.2: Lenfoma Hücresinin Kökeni	6
Şekil 2.3: miRNA'nın işlevi	13
Şekil 2.4: miRNA'ların oluşum mekanizması.....	15
Şekil 2.5: miRNA'ların İşlevi.....	16
Şekil 2.6: miRNA'da gelişen mutasyonlar sonucu hücrel genlerin düzenlenmesinin azalması	21
Şekil 3.1: miRNA'nın gerçek zamanlı PZR ile çoğaltılmasının işleminin şematik anlatımı.	31
Şekil 4.1: DBBHL hastalarda miR-15a geni'ne ait gerçek zamanlı PZR eğrileri	33
Şekil 4.2: DBBHL hastalarda miR-16-1 geni'ne ait gerçek zamanlı PZR eğrileri.....	33
Şekil 4.3: DBBHL hastalarda <i>LET-7</i> referans genine ait gerçek zamanlı PZR eğrileri .	34
Şekil 4.4: Sağlıklı kontrollerde miR-15a geni'ne ait gerçek zamanlı PZR eğrileri.....	34
Şekil 4.5: Sağlıklı kontrollerde miR-16-1 geni'ne ait gerçek zamanlı PZR eğrileri	34
Şekil 4.6: Sağlıklı kontrollerde <i>LET-7</i> referans genine ait gerçek zamanlı PZR eğrileri	35
Şekil 4.7: Hasta ve kontrol grubunda miR-15a geni ifade düzeylerinin karşılaştırılması.	39
Şekil 4.8: Hasta ve kontrol grubunda mir-16-1 geni ifade düzeylerinin karşılaştırılması.	40
Şekil 4.9: Hasta grubundaki miR-15a geninin ifade düzeyine ilişkin ΔC_T dağılımı.	44
Şekil 4.10: Kontrol grubundaki miR-15a geninin ifade düzeyine ilişkin ΔC_T dağılımı.	44
Şekil 4.11: Hasta grubundaki miR-16-1 geninin ifade düzeyine ilişkin ΔC_T dağılımı...	45
Şekil 4.12: Kontrol grubundaki miR-16-1 geninin ifade düzeyine ilişkin ΔC_T dağılımı.	45
Şekil 4.13: Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda miR-15a geni ifade düzeylerinin ΔC_T değerlerinin karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.14: Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda miR-16-1 geni ifade düzeylerinin ΔC_T değerlerinin karşılaştırılması.....	46

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

miR: Mikro RNA
RNA: Ribonükleik asit
DNA: Deoksiribonükleik asit
mRNA: Mesajcı RNA
KLL: Kronik Lenfositik Lösemi
HDL: Hodgkin Dışı Lenfomalar
DBBHL: Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma
NK: Doğal Öldürücü
Ig: Immünglobülin
MCL: Mantle Hücreli Lenfoma
FL: Foliküler Lenfoma
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
WHO: World Health Organization
PBS: Fosfat Bufer Salın
BFB: Brom Fenol Mavisi
TEB: Tris Edta Borik Asit
RPM: Dakikada Devir Sayısı
EtBr: Etidyum Bromür

ÖZET

Tunçer B. Ş. B-Hücreli Hodgkin dışı Lenfomada miR-15a/miR-16-1 Genlerinin İfade Düzeylerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans. İstanbul. 2012.

MikroRNA (miRNA)'lar 21-23 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli, proteine dönüştürülmeyen RNA molekülleridir. Olgun miRNA molekülleri bir ya da birden fazla mesajcı RNA (mRNA) ile kısmi tamamlayıcılık göstermekte ve bağlandıkları genlerin ifadelerini düzenlemektedirler. miRNA'lar onkogenlerin ifadesini inhibe ederek tümör baskılayıcı etki, tümör baskılayıcı genleri susturarak onkogenik etki oluşturabilmektedirler. Hodgkin Dışı Lenfomalar kan kanserleri grubunun bir çeşididir. Etiyolojik, histolojik ve klinik açıdan son derece heterojen bir grup kanser türüdür. Son birkaç dekatta tüm dünyada Hodgkin Dışı Lenfoma sürekli olarak artmaktadır.

miRNA'lar ile kanser arasındaki etkileşim ilk olarak Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarında bildirilmiş ve bu hastaların çoğunda miR-15-a ve miR-16-1 ifadesinin çok düşük veya hiç olmadığı gösterilmiştir. Özellikle B-hücreli lenfoma ve Kronik Lenfositik Lösemiler CD19⁺ ve CD20⁺ B lenfositlerinden köken almaktadırlar. Bu konu ile ilgili, B-hücreli lenfomaları kapsayan literatürde henüz bir bilgi bulunmamaktadır.

Çalışmamızda B-hücreli Hodgkin Dışı Lenfoma'lı hastalar ile yaş, cinsiyet ve ırk olarak eşleştirilmiş sağlıklı kişilerin periferik kan lenfositlerinde miR-15a ile miR-16-1 miRNA gen ifade düzeyleri Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir reaksiyonu kullanılarak araştırıldı. miR-15a geni ekspresyon düzeyinde sağlıklı kontroller ile hastalar arasında istatistiksel bir fark bulunmazken ($p>0,05$), miR-16-1 geninin ekspresyon düzeyinin hasta grubunda 8,54 oranında azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diffüz büyük B hücreli Hodgkin Dışı Lenfoma, gen anlatımı, MikroRNA, miR-15-a, miR-16-1

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 17516

ABSTRACT

Tunçer B. Ş. The Investigation of miR-15-a and miR-16-1 Gene Expressions In B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas (NHLs). İstanbul University, Institute of Health Science, Basic Oncology Department Master Thesis. İstanbul (2012)

MicroRNAs (miRNA) are 21-23 nucleotide-long single-stranded RNA molecules that are not converted to proteins. Mature miRNA molecules show partial complementation to a part of one or more messenger RNAs (mRNAs) and regulate the expressions of binding genes. miRNAs can show tumor suppressor effect by inhibiting the expression of oncogenes and oncogenic effect by silencing tumor suppressor genes. Non-Hodgkin Lymphomas (NHLs) are strikingly heterogeneous in clinical course and in etiology because NHLs encompass a variety of histologically distinct forms. Non-Hodgkin Lymphoma occurrence has risen steadily and dramatically in most parts of the world for several decades.

The interaction between miRNAs and cancer was reported in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients initially. In a majority of these patients the expression levels of miR-15-a and miR-16-1 were shown to be very low or none. In particular, B-cell lymphomas and chronic lymphocytic leukemias are derived from CD19⁺ and CD20⁺ B lymphocytes. There is no evidence of the expression levels of miR-15a and miR-16-1 genes in B cell lymphomas which come from the same cell lineage like CLL in literature.

In this study, the expression levels of miR-15a and miR-16-1 genes in RNAs of peripheral lymphocytes for B-cell Non-Hodgkin Lymphoma patients and ethnicity, age and gender matched healthy controls were investigated using Real Time PCR. The level of miR-16-1 gene expression was found 8,54-fold higher in the patient group compared with healthy controls ($p < 0.05$) although the level of gene expression of miR-15a was not statistically different between patients and healthy controls ($p > 0.05$),

Key Words: Diffuse B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma, Gene expression, MicroRNAs, mir-15a, mir-16-1.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 17516

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lenfoma, tek bir lenfosit öncül hücrenin somatik mutasyonu sonucu ortaya çıkan klonal habis bir hastalık grubudur. Hastalık kliniği, morfolojik özellikleri, tedavileri ve tedavi cevaplarına göre Hodgkin Lenfoma ve Hodgkin Dışı Lenfomalar olarak başlıca iki büyük gruba ayrılır [1]. Hodgkin Dışı Lenfomalar (HDL) klinik, histolojik, immünolojik, moleküler ve genetik, özelliklerine göre birbirinden ayırt edilebilen oldukça heterojen bir hematolojik malignite grubudur. HDL çoğunlukla B ve T lenfositlerden daha az oranda doğal öldürücü (NK) hücrelerinden oluşmaktadır. HDL genellikle lenf düğümlerinden köken almakla birlikte diğer lenfoid dokulardan da kaynaklanmaktadır [2].

Hodgkin Dışı Lenfomalar tüm kanserlerin % 2,8'i kadarını oluşturur. HDL, erkeklerde %6,1 görülme sıklığı ve %3,5 ölüm oranı; kadınlarda ise % 4 görülme sıklığı ve %2,3 ölüm oranı ile 6. sırada yer alır ve 5/100.000 sıklıkta görülür [3]. Kadın/Erkek oranı 1/1.5 şeklindedir. Ayrıca gelişmiş ülkelerde HDL'lar artan oranı ile daha yaygın olarak görülmektedir [4].

Son yıllarda hızla gelişen ve yaygınlaşan laboratuvar incelemelerinin yardımıyla lenfoma hastalık grubunda da oldukça önemli gelişmeler kaydedilmiş ve morfolojik, immunofenotipik, sitogenetik ve özellikle de klinik ve prognostik özelliklerine göre 30'a yakın alt grup tanımlanmıştır. Bu alt gruplar arasında en önemlilerinden biri Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomadır (DBBHL). DBBHL tüm lenfoma olgularının %30-40'ını, agresif lenfomaların ise %80'inden fazlasını oluşturur. DBBHL, tutulan lenf gangliyonunun ya da ektranodal alanın normal yapısını bozan diffüz büyüme gösteren bir alt tipidir [1-2].

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalar (DBBHL) agresif lenfomaların prototipidir. Genel olarak lenfomalar tüm sistemik kanserler içinde beşinci sırada yer alırken bunların yaklaşık %30 ile 40'ını DBBHL'lar oluşturur. DBBHL'ler agresif lenfoma grubunun ise %80'inden fazlasını oluşturmaktadır [5].

DBBHL çocuklar dâhil her yaş grubunda görülmekle birlikte yaş ilerledikçe görülme sıklığı artar ve en sık yedinci dekatta görülür. Görülme sıklığı erkeklerde biraz daha fazladır [6].

MikroRNA(miRNA)'lar 21-23 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli, proteine dönüştürülmeyen RNA molekülleridir [7-8]. miRNA'lar DNA molekülünden ilk olarak pri-miRNA olarak yazılırlar..Daha sonra farklı enzimlerin yardımı ile işlenerek kısa sap ve ilmik yapısından oluşan pre-miRNA'ya ve son olarak da fonksiyonel formu olan olgun miRNA'ya dönüştürülürler. Olgun miRNA molekülleri bir ya da birden fazla mesajcı RNA (mRNA) ile kısmi tamamlayıcılık göstermekte ve bu tamamlayıcılık sayesinde bağlandıkları genlerin ifadelerini düzenlemektedirler [9].

Olgun miRNA'ların hedef mRNA'yı tanıyan özel bölgeleri (tohum bölgeleri) bulunmaktadır. miRNA'ların bir genin ifadesini durdurabilmesi için hedef mRNA ile bire bir tam anlamıyla bağlanması gerekmektedir. miRNA'lar, mRNA üzerinde genellikle 3'UTR (çevrilmeyen bölgeler) bölgeye ve çok nadir olarak da 5' UTR'ye bağlanmaktadırlar. miRNA'nın ilgili bölgeye bağlanması, mRNA çevirim ifadesinin azalmasına ve dolayısıyla mRNA'nın yıkımına neden olmaktadır [9-10]. miRNA'lar onkogenlerin ifadesini inhibe ederek tümör baskılayıcı etki, tümör baskılayıcı genleri susturarak onkogenik etki oluşturabilmektedirler. Örneğin miR-21'in bir tümör baskılayıcı olan p53 ile etkileşimi onkogenik etkiye yol açarken, miR-let-7 ve miR-15/16/dleu2 'nin onkogenik bir protein olan BCL-2 ile etkileşmesi tümör baskılayıcı etki yaratmaktadır [11-12].

İnsan miRNA genlerinin çoğu kromozomlar üzerindeki kırılğan bölgelerde yer almaktadır. Bu kırılğan bölgelerin ve dolayısıyla bu noktalarda bulunan miRNA genlerinin kanserle ilişkili olduğu bilinmektedir. miRNA'lar ile kanser arasındaki etkileşim ilk olarak Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarında bildirilmiş ve bu hastaların çoğunda miR-15-a ve miR-16-1 ifadesinin çok düşük veya hiç olmadığı gösterilmiştir [13].

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma ile Kronik Lenfositik Lösemiler CD19+ ve CD20+ B lenfositlerinden köken almaktadırlar. Daha önce CD19+ KLL'lerde yapılan çalışmalarda 26 farklı miRNA'nın ifadesinin azaldığı bildirilmiştir [14].

C19+ KLL'lerde varolan miRNA'ların aynı hücrelerden köken alan Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma'da varlığını bildiren literatürde henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda öncelikle Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfomalı hastaların periferik kanında dolaşan tümör hücrelerinde miR-15a ve miR-16-1 genlerinin ifade düzeyleri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. B-Hücre gelişim aşamaları

Kemik iliğindeki pluripotent kök hücre, lenfosit dizisi dahil tüm kan hücrelerinin kaynağıdır [15]. Pluripotent kök hücreler bölünerek lenfoid kök hücre ve miyeloid kök hücre olmak üzere iki özelleşmiş öncül hücreye değişir. Lenfoid kök hücre hem B hem de T lenfositlerinin öncül hücresidir. Miyeloid kök hücre ise lökosit, eritrosit, megakaryosit ve makrofajların öncülüdür [16].

Olgun B-hücre neoplazileri normal B-hücre farklılaşma aşamalarını taklit eder. İsimlendirme ve sınıflama da öncül hücre kökenine dayanılarak yapılmaktadır. Normal B hücre farklılaşmasında başlangıç hücresi öncül B lenfoblastı'dır. Bu hücrelerde Ig VDJ geni yeniden düzenlenmeye uğrar ve yüzey Ig farklılaşması gerçekleşir, sonuçta naif B hücreleri gelişir. Naif B hücreleri IgM(+), IgD(+) ve CD5(+)’tir [17-18]. Naif B hücreleri normalde kan dolaşımındaki küçük ve dinlenme halindeki B lenfositleridir, primer lenfoid folikül içinde folikülün mantle bölgesinde yerleşirler. Tümörleri düşük gradlı ve yavaş seyirlidir. Sıklıkla normal naif B hücrelerinin davranışına uygun olarak geniş alana yayılır, lösemik olabilir. CD5(+) B hücrelerinden B hücreli KLL (%50) ve mantle hücreli lenfoma gelişir [17-18]. Antijenle karşılaşan naif B hücreleri blastlara dönüşür, çoğalma olur ve sonunda IgG ve IgA antikoru salgılayan plazma hücreleri ve bellek B hücrelerine olgunlaşırlar.

Antijenle karşılaşan naif B hücrelerinin dönüşümü sonucu oluşan blastik hücreler primer foliküle göç ederler. Primer foliküller dendritik hücre ağı ile birlikte germinal merkezi oluştururlar. Germinal merkezin blastik hücreleri sentroblast olarak bilinir. Bu hücreler vesiküler çekirdekli, 1-3 adet belirgin ve periferik yerleşimli nükleol ve dar bazofilik sitoplazmalı büyük hücrelerdir. Çoğunda yüzey immünoglobülini ve BCL-2 protein ifadesi yoktur. Bu durum aşırı derecede apoptotik hücre ölümüne uğradıklarını gösterir.

Sentroblastlar BCL-6 proteinini ifade ederler. Bu bir nükleer zincir yazılım faktörüdür. Sentrosit ve sentroblastların her ikisinde de ifade edilir. Naif B hücreleri, bellek B hücreleri, mantle hücreleri ve plazma hücrelerinde BCL-6 ifadesi görülmez. Aynı özellikler CD10 için de geçerlidir.

Germinal merkezde Ig değişken (IgV) bölge geninde somatik mutasyon meydana gelir, sonuçta sadece az sayıda nc hcrenden kaynaklanan ve belirgin intraklonal farklılık gösteren bir hücre popülasyonu oluşur ve bazı hücrelerden IgM, IgG ve IgA yapımı tetiklenir. Bu mekanizma ile geç primer veya sekonder immün yanıtta uygun IgG veya IgA yapımı meydana gelir. Germinal merkezde *BCL-6* geni, Ig genlerinden daha az oranda somatik mutasyona uğrar [17-18].

DBBHL'nın lenf düğümleri ya da sekonder lenfoid organların germinal merkezlerine göç eden, antijenik uyarıya maruz kalmış normal B hücrelerinden köken aldığı düşünülmektedir. Germinal merkezde B lenfositlerinin gelişimi süresince immünglobulin değişken ağır zincir bölge (IgV) genlerinde somatik hipermutasyon oluşmakta ve mutasyon olgunlaşma sürecinin bu basamağında belirteç görevi görmektedir. Somatik hipermutasyon antikor çeşitliliğine neden olmakta, antijene eğilimi arttırmakta ve aynı zamanda kromozomal translokasyonların oluşumu için zemin yaratmaktadır. Büyük B-hücreli lenfoma hücrelerinin bir kısmı sentroblastları anımsatan hücrelerden oluşur. Sıklıkla *BCL-6* gen mutasyonu göstermeleri germinal merkezden köken aldıklarını işaret eder [17-18]. Burkitt lenfoma hücreleri de *BCL-6* (+) ve *Ig* gen mutasyonu gösterir. Burkitt ve Büyük B-hücreli lenfomaların her ikisi de klinik olarak agresif tümörlerdir [17, 19].

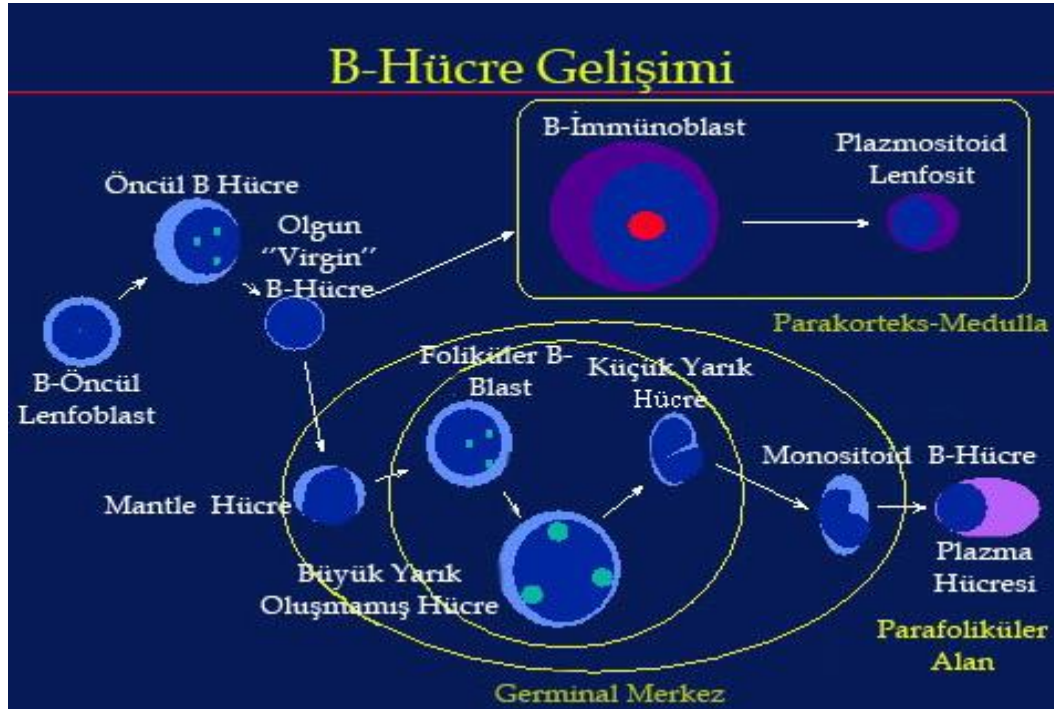
Sentroblastların olgunlaşmış hali sentrositlerdir. Bunlar entikli folikül merkez hücreleridir. Orta boyutlu, düzensiz nüveli, belirsiz nükleollü ve dar sitoplazmalı hücrelerdir. Sentrositler yüzey immünoglobülini ifade ederler. Progenitor hücreleri ile karşılaştırıldığında, ağır zincir sınıfında meydana gelen somatik mutasyonlar sonucu değişmiş bir antikor bağlanma bölgesi içerirler. Mutasyonlu sentrositlerde, foliküler dendritik hücrelerin uzantılarının antijene karşı afinitelerinin artması sonucu, apoptotik ölümden kaçması kolaylaşır ve dolayısıyla *BCL-2* protein ifadesi başlar.

Foliküler dendritik hücre ve T-hücrelerinin yüzey molekülleri (*CD23* ve *CD40* ligand) ile etkileşimleri sayesinde sentrositler *BCL-6* ifadesini kaybeder ve sentrosit, bellek B-hücreleri ya da plazma hücrelerine farklılaşır. Foliküler lenfomanın germinal merkezin B-hücreleri olan sentrosit ve sentroblastların tümörü olduğuna inanılmaktadır. Ancak daha çok sentrosit içerir çünkü sentrositlerin apoptoza gidişi, t(14;18) translokasyonu ve buna bağlı olarak normal *BCL-2* protein ifadesinin kaybı yoluyla engellenmektedir [17].

Bellek B-hücreleri, tipik olarak folikülün marjinal bölgesinde bulunurlar. Bu hücreler yuvarlak veya hafifçe düzensiz nüve, hafif yoğun kromatin ve az miktarda soluk sitoplazma içerir. Bu hücreler tipik olarak yüzey IgM ifade eder ancak bu hücrelerde IgD ve Pan B antijenleri, CD5 ve CD10 ifadesi gözlenmemektedir. Plazma hücreleri, yoğun kromatin ve bol bazofilik sitoplazma ile baskın olarak IgG veya IgA'ya sahipken, yüzey Ig ve Pan B antijenlerini taşımamakta ancak CD138 ve CD79'a antijenlerini de eksprese etmektedirler.

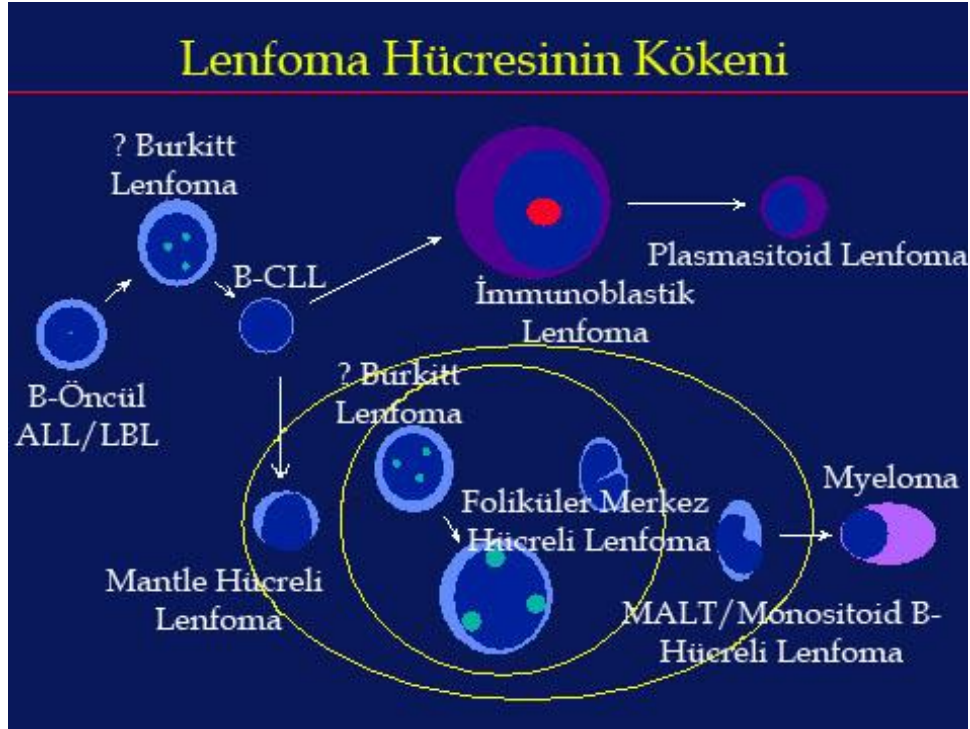
Bellek B-hücreleri ile plazma hücrelerinde IgV bölgesi genleri mutasyona uğramıştır ancak var olan mutasyonlara yenileri eklenmediği için intraklonal farklılık göstermezler. Postgerminal merkez hücreleri yüzeylerindeki integrin ifadesi yoluyla antijen stimülasyonuna uğrayan dokulara yerleşirler. Marjinal Zon lenfoma, postgerminal merkez hücrelerinden özellikle de marjinal bölgenin bellek B hücrelerinden gelişmektedir [17-18]. Plazma hücreli miyelom ise kemik iliği yerleşimli IgG veya IgA üreten plazma hücrelerinden gelişir [17].

B lenfosit gelişim aşamaları, lokalizasyonları ve gelişen lenfoma tipleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: B-Hücre Gelişimi

Ayrıca B-Öncül hücre kökenli Lenfoma oluşumu aşamaları Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Lenfoma Hücresinin Kökeni

2.2. Hodgkin Dışı Lenfomalar

2.2.1. Epidemiyolojisi

Hodgkin Dışı Lenfomalar tüm kanserlerin %2,8'ini oluştururlar. HDL, erkeklerde %6,1 görülme sıklığı ve %3,5 ölüm oranı; kadınlarda ise %4 görülme sıklığı ve %2,3 ölüm oranı ile 6.sırada yer alır ve 5/100.000 sıklıkta görülür [3].

HDL çocukluk çağı kanserlerinin %6-7'sini oluşturur. Yirmi yaşın altındaki tüm lenfoma olgularının %45'ini HDL oluşturmaktadır. 15 yaş altındaki çocuklarda son yirmi yıldır görülme sıklığında bir değişiklik olmamışken, 15-19 yaş arasında görülme sıklığında %50 artış saptanmıştır. Kadın/Erkek oranı 1/1.5 şeklindedir. Ayrıca gelişmiş ülkelerde HDL'lar artan oranı ile daha yaygın olarak görülmektedir [4].

HDL, hematopoetik kök hücrelerin çeşitli diferansiyasyon aşamalarından kaynaklanır. Orjinlerini aldıkları diferansiyasyon aşamasına göre farklı morfolojik, immunolojik ve klinik tablo oluştururlar. Her bir lenfoma tipi lenfosit olgunlaşmasının herhangi bir basamağında kalıp, malign hücreye transforme olabilmektedir. HDL’lar %90 B hücre orjinlidir, %10’luk bölümü ise T ve NK hücrelerinden gelişmektedir. Genel olarak HDL sıklığı 20.yüzyıl’da belirli bir şekilde artış göstermiştir. Bu artış HDL’nın tüm histolojik tipleri, cinsiyet tipleri ve tüm yaş gruplarını kapsamaktadır. HDL sıklığındaki bu artış, AIDS sıklığındaki artışa paralellik gösterse de tek nedenin bu olmadığı düşünülmektedir [1, 20].

Bunun yanı sıra etkili antiviral tedavinin yaygınlaşması ile HIV ile ilişkili lenfoma sıklığı azalmıştır [21]. Bazı HDL’ların birkaç alt tipinde etiyoloji belli olsa da, çoğunluğunda bilinmemektedir.

Bazı enfeksiyöz ajanlarla ilişkili lenfoma tipleri mevcuttur. Özellikle tarım ile uğraşanlarda ve bazı kimyasal toksinlere maruz kalanlarda HDL daha sık olarak görülmektedir. Ancak sonuç olarak bütün lenfomaların immün sistem bozukluğundan kaynaklandığı söylenebilir. Gelişen teknoloji ve sağlıktaki ilerlemeninde hastalık sıklığındaki artışa katkısı olduğu düşünülmektedir [1].

Lenfoid hücre kaynaklı hastalıklar için halen yaygın olarak kullanılan WHO sınıflama sisteminde B hücreli, T / NK hücreli ve Hodgkin Lenfoma olmak üzere üç ana başlık oluşturulmuştur. B hücreli ve T / NK hücreli hastalıklar “prekürsör ve olgun” olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. WHO sınıflamasında lenfomaların klinik seyir özelliklerinden çok patolojik özelliklerine vurgu yapılmıştır (Tablo 2.1) [22]

Tablo 2.1: WHO'ya göre Lenfoma Sınıflaması

<i>Lenfoid neoplaziler için WHO sınıflaması</i>	
<i>B hücre neoplazileri</i>	<i>T ve NK hücre neoplazileri</i>
<i>Prekürsör B hücre neoplazileri</i>	<i>Prekürsör T hücre neoplazileri</i>
Prekürsör B hücreli lenfoblastik Lösemi/ Lenfoma	Prekürsör T hücreli lenfoblastik Lösemi/ Lenfoma
<i>Olgun B hücre neoplazileri</i>	<i>Olgun B hücre neoplazileri</i>
<i>Predominant Dissemine/Lösemik Neoplaziler</i>	<i>Predominant Dissemine/Lösemik Neoplaziler</i>
Kronik Lenfositik Lösemi/ Küçük Lenfositik Lenfoma B-hücreli Prolenfositik Lenfoma LenfoplazmositikLenfoma/Waldenström Makroglobulinemi Splenik Marjinal Zon B-hücreli Lenfoma Hairy-cell (tüylü hücreli) Lösemi Plazma Hücre Neoplazileri Plazma Hücreli Miyelom Plazmositom Monoklonal İmmunoglobulin Depo Hastalığı Ağır Zincir Hastalığı	T-hücreli Prolenfositik Lenfoma T-hücreli Large Granüler Lenfoma Agresif NK hücreli Lösemi Erişkin T hücreli Lösemi/Lenfoma
<i>Primer Ekstranodal Neoplaziler</i>	<i>Primer Ekstranodal Neoplaziler</i>
Ekstranodal Marjinal Zon B-hücreli Lenfoma (MALT lenfoma) Mediastinal (Timik) Büyük B-hücreli Lenfoma İntravasküler Büyük B-hücreli Lenfoma Primer Efüzyon Lenfoması Lenfomatoid Granülomatozis	Ekstranodal NK/T hücreli Lenfoma, Nazal Tip Enteropati-tip T hücreli Lenfoma Hepatosplenik T hücreli Lenfoma Subkutan Pannikülit-benzeri T hücreli Lenfoma Blastik NK hücreli Lenfoma Mycosis Fungoides/Sezary Sendromu Primer Kutanöz CD-30 pozitif T hücreli
<i>Predominant Nodal Neoplaziler</i>	<i>Predominant Nodal Neoplaziler</i>
Nodal Marjinal Zon B-hücreli Lenfoma Foliküler Lenfoma Mantle cell Lenfoma Büyük B-hücreli Lenfoma Burkitt Lösemi/Lenfoma	Anjioimmunoblastik T hücreli Lenfoma Periferik T hücreli Lenfoma, Belirtilmemiş Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma
<i>Hodgkin Lenfoma</i>	
Nodüler Lenfositten Baskın Hodgkin Lenfoma Klasik Hodgkin Lenfoma Nodüler Skleroz Hodgkin Lenfoma Miks Sellüler Hodgkin Lenfoma Lenfositten Zengin Hodgkin Lenfoma	

Tablo 2.2: Türkiye’deki Beş Büyük Merkezin Hodgkin Dışı Lenfoma ile ilgili göreceli sıklık oranları

TÜRKİYE'DE BEŞ BÜYÜK MERKEZİN LENFOMA DÖKÜMLERİ						
Merkezlər	Merkez 1	Merkez 2	Merkez 3	Merkez 4	Merkez 5	TOPLAM
Yıllar-----	1999-2002 (Kemik iliği Bx + Flow + LN ve Diğer)	2003 (Kemik iliği Bx %30, LN ve Diğer %70)	1999-2003 (LN ve Diğer %100)	Haziran 1999- 2003 (LN ve Diğer %100)	2002 Lenf Nodu + Kemik iliği + Diğer	
Süre (yıl)-----	4	1	5	4.5	1	
WHO SINIFLAMASI						
B Hücreli Lenfomalar						
9728 ve 9835	Prekürsör B lenfoblastik lenfoma/lösemi	8	7	9	3	27 (%0.72)
9670	SLL/KLL	185	98	31	41	385 (%10.4)
9833	B Hc Prolenfolistik Lösemi	0	0	0	0	0
9671	Lenfoplazmatik Lenfoma	18	7	2	3	33 (%0.9)
9689	Splenik Marjinal Zon Lenfoma	12	5	4	1	23 (%0.6)
9940	Hairy Cell Lösemi	49	10	0	6	69 (%1.9)
9699	Ekstranodal Marjinal Zon B hc'li Lenfoma (MALT)	36	13	20	33	88 (%2.9)
9699	Nodal Marjinal Zon B hc'li Lenfoma	3	5	6	6	26 (%0.7)
9690	Foliküler Lenfoma	60	39	45	51	209 (%5.6)
9673	Mantle Cell Lenfoma	58	16	17	22	88 (%2.9)
9680	Diffüz Büyük B hc'li Lenfoma	268	152	262	379	1115 (%30.1)
9679	Mediastinal Büyük B hc'li Lenfoma	19	19	7	8	55 (%1.5)
9680	İntravask. Büyük B hc'li L.	2	1	1	0	4 (%0.1)
9731	Ekstrasosöz Plazmasitom		2			2 (%0.01)
9732	Plazma Hc Miyeloma		63		13	76 (%2.1)
9734	Ekstrasosöz Plazmasitoma	30	2			32 (%0.9)
9678	Primer Eritroyon Lenfomasi		0	0		0
9687	Burkitt Lenfoma	37	9	27	19	98 (%2.6)
SINIFLANDIRILAMAYAN			67	31	19	117 (%3.1)
T Hücreli Lenfomalar						
9729 ve 9837	Prekürsör T Lenfoblastik Lenfoma /lösemi	35	18	12	18	87 (%2.3)
9727 ve 9837	Blastik NK hc'li Lenfoma/lösemi	3		0	0	3 (%0.08)
9834	T hc'li Prolenfolistik Lösemi			0	0	0
9831	T hc'li Large Granüler Lenfositik Lösemi			0	0	2 (%0.05)
9948	Agresif NK hc'li Lösemi			0	2	2 (%0.05)
9827	Erişkin T hc'li Lösemi/Lenfoma			0	0	0
9719	Ekstranodal NK/T hc'li Lenfoma, Nazal Tip	4	5	2	3	16 (%0.4)
9717	Enteropati-Tipinde T hc'li Lenfoma			1	6	7 (%0.2)
9716	Hepatosplenik T hc'li Lenfoma		3	0	1	4 (%0.1)
9708	Sc Pankikült benz. T hc'li Lenfoma	1		0	0	1 (%0.03)
9700	Mycosis fungoides	32		13		45 (%1.2)
9718	Primer Kutanöz Anaplastik Büyük hc'li Lenfoma	18		2	0	20 (%0.5)
9702	Periferik T hc'li Lenfoma	33	11	25	18	96 (%2.6)
9705	Anjiyomimoblastik T hc'li Lenfoma	3	1	3	1	8 (%0.2)
9714	Anaplastik Büyük hc'li Lenfoma	56	14	11	15	107 (%2.9)
SINIFLANDIRILAMAYAN			3	11		14 (%0.4)
Hodgkin Lenfoma						
9650	HL-Klasik Tip		15	19	41	75 (%2.0)
9651	HL-Lenfositlen Zengin Klasik Tip	10	4	7	8	36 (%0.9)
9652	HL-Mikst Sellüler Klasik Tip	103	31	35	50	227 (%6.1)
9663	HL-Nodüler Siderozan Klasik Tip	148	45	86	89	368 (%10.4)
9653	HL-Lenfositlen Fakir Klasik Tip	5	3	2	6	16 (%0.4)
9659	HL-Nodüler Lenfosit Predominan Tip	18	6	11	4	40 (%1.1)
SINIFLANDIRILAMAYAN						
TOPLAM SAYI	1246	611	733	871	243	3704

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Ankara Tıp Fakültesi, Ege Tıp Fakültesi, Hacettepe Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın Katkısıyla Muayenlenmiştir.

Tablo 2.2 de Türkiye’de beş büyük merkezin lenfoma dökümleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir Yurtdışında yapılan istatistiklerde HDL sıklığının artış hızı son yıllarda biraz azalsada 1950’lerle karşılaştırıldığında yükselmeye devam ettiği görülmektedir. HDL sıklığında artışın nedeni olarak mesleki ve çevresel kimyasallara maruziyet, virütik hastalıklara yakalanma sıklığında artış olması ile birlikte görüntüleme yöntemlerinde ve patolojik incelemelerdeki teknik ilerlemelerde bu artışta önemli rol oynamaktadır. 1999-2003 arasında kaydedilen hasta tetkik ve teşhislerinde elde edilen istatistiki bilgi ile HDL B hücreli Lenfomalar alt sınıfında Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma %30 gibi bir oranla görülme sıklığında birinci olarak yer almaktadır.

2.3. Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma (DBBHL)

2.3.1. Genel Özellikleri ve Sıklığı

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalar agresif özellik gösteren lenfomalar sınıfında yer alır. DBBHL lenfomaların %30–40’ını, agresif lenfomaların ise %80’ini oluşturmaktadır [23]. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalar çocuklar dahil her yaş grubu ve her iki cinsiyette görülmekle birlikte daha sık olarak orta ve ileri yaşta rastlanılan bir hastalıktır. Bu hastalık kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülmektedir [1, 24]

2.3.2. Sınıflandırılması

DBBHL klinik, patolojik ve moleküler düzeyde heterojen bir hastalıktır. Önceleri birçok farklı isimle tanımlanan diffüz büyük B hücreli lenfomalar WHO 2008 sınıflamasında daha geniş bir şekilde kısmen homojen olarak alt sınıflara ayrılmıştır. WHO 2008 sınıflamasına göre DBBHL varyantları, alt grupları ve alt tipleri tabloda belirtilmektedir. Ayrıca WHO 2008 sınıflandırmasında kronik iltihapla birlikte DBBHL, bacak tipi primer kutanöz DBBHL, yaşlılarda EBV pozitif DBBHL gibi DBBHL 3 yeni alt tip eklenmiştir (Tablo 2.3) [25].

2.3.3. Klinik Özellikleri

Klinik olarak agresif bir lenfoma olan Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalar lenf nodu ve/veya ektranodal alanlarda ortaya çıkabilir. En sık ektranodal tutulum alanları gastrointestinal bölge, cilt, kemik iliği, paranazal sinusler, tiroid, merkezi sinir sistemi, karaciğer ve dalak olarak sıralanabilir [26-27]. Ancak tanı esnasında kemik iliği tutulumu nadirdir [28].

Çoğu olgu de novo olarak ortaya çıkmakla beraber düşük dereceli HDL'ların dönüşümü ile hastalık oluşabilmektedir. Foliküler lenfoma (FL), KLL/SLL ve Mantle Cell Lenfoma (MCL) gibi lenfoma alt tipleri Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomaya dönüşebilmektedir [1].

Tablo 2.3: Diffüz Büyük Hücreli Lenfomaların sınıflaması

Yaygın morfolojik varyantlar	Diğer büyük B-hücreli lenfomalar
-Sentroblastik -İmmünoblastik -Anaplastik	-Primer mediastinal (timik) DBBHL -İntravasküler büyük B hücreli lenfoma -Kronik inflamasyon ilişkili DBBHL Lenfomatoid -Lenfomatoid granülomatozis -ALK (anaplastik lenfoma kinaz)-pozitif DBBHL -Plasmablastik lenfoma
Nadir morfolojik varyantlar Moleküler alt gruplar -Germinal merkez B-hücre (GCB) benzeri -Aktive B-hücre (ABC) benzeri	-HHV-8 ilişkili multisentrik Castleman hastalığı - zemininde gelişen DBBHL -Primer effüzyon lenfoması
İmmünolojik alt gruplar -CD5-pozitif DBBHL -Germinal merkez B-hücre benzeri (GCB) -Germinal merkez B-hücre benzeri dışı (non-GCB)	
DBBHL alt tipler -T-hücre/histiyositten zengin büyük özelliklerB hücreli lenfoma -SSS'nin primer DBBHL'sı -Bacak tipi primer kutanöz DBBHL -Yaşlılarda EBV pozitif DBBHL -Kronik iltihapla birlikte DBBHL	
	Borderline vakalar -DBBHL ile BL arasında özellikler içeren BHL -DBBHL ile KHL arasında özellikler içeren -içeren BHL

2.3.4. Morfolojisi

Hücreler morfolojik olarak tutulan lenf nodunun ya da ektranodal alanın normal yapısını bozan diffüz büyüme paternine ve büyük hücre boyutuna sahiptir [28]. Fakat hücrel morfolojileri heterojendir. Çoğu vakada neoplastik büyük lenfoid hücreler, sentroblastlara (büyük çentiksiz hücreler) ya da immünoblastlara (tek, merkezi yerleşimli çekirdeği olan büyük lenfoid hücreler) benzer. Ayrıca Reed-stenberg hücresine benzer veya anaplastik (garip pleomorfik çekirdekli) görünümde olabilirler, ve bazen ayırım için immunofenotipleme yapmak gerekebilir [5].

Patolojik değerlendirmede tanımlanan başlıca morfolojik varyantlar sentroblastik, immünoblastik, T hücre histiyositten zengin, anaplastik şeklindedir [29]. Bunlara ilave olarak plazmablastik alt tip nadir olarak görülmekte olup sıklıkla HIV pozitif hastalarda ortaya çıkmaktadır [30].

2.3.5. İmmünofenotip

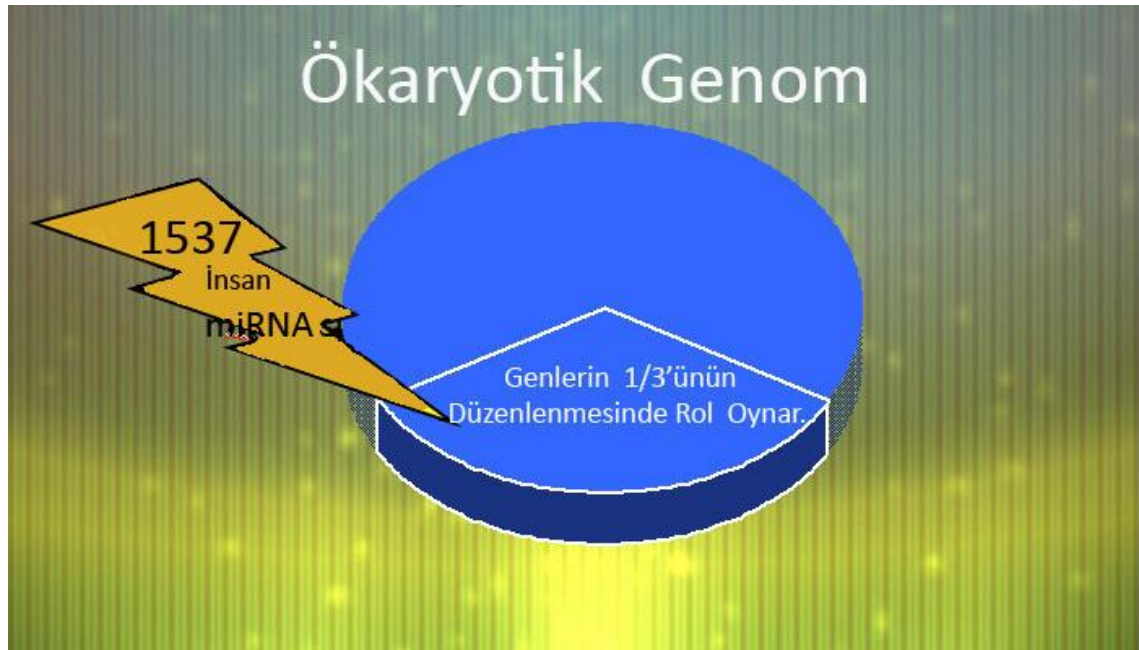
Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalar genelde CD19, CD20, CD22, BSAP/PAX5 ve CD79a gibi Pan-B antijenlerini ifade etmekle beraber vakaların %75’lik bölümünde yüzey immunglobulinlerinin de ifade edildiği gösterilmiştir [28-29]. Bazı vakalarda bu antijenlerin bir ya da birden fazlası saptanamayabilir. CD30 ifadesi ise sıklıkla anaplastik varyantta görülür [29]. CD10 antijeni yaklaşık %30-%50 olguda, *BCL-6* ifadesi ise %80 olguda, CD5 ifadesi ise %10 olguda görülebilir [29]. *BCL-2* gen ekspresyonu ise vakaların %75’inde eksprese edilirken CD138 ifadesine nadir olarak rastlanmaktadır [29, 31].

Normalde T hücrelerinde ve miyeloid kökenli hücrelerde ifade edilen CD43 ifadesi DBBHL’de yaklaşık %20–40 arasındadır [32]. Bunlar de novo olabileceği gibi KLL/SLL ve MCL’den transforme olmuş olabilir. MCL’den transforme vakalarda *BCL-1* ifadesi olurken, KLL/SLL den transforme vakalarda CD23 ifadesi korunur [33].

2.4. MikroRNA (miRNA)

MikroRNA'lar (miRNA) ilk olarak 1993 yılında *C. Elegans*'ta keşfedilmiş ve daha sonra insanda da bu mikroRNA'ların homologları olduğu anlaşılmıştır [34]. İlk olarak gelişimde görev aldıkları belirlenen miRNA'ların bugün birçok hücresel olayda faaliyet gösterdikleri bilinmektedir (Şekil 2.3).

Bu nedenle son yıllarda miRNA'ların yapı ve işlevlerini belirlemek ve hangi tiplerin hastalığa yol açtıklarının belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma yürütülmektedir.



Şekil 2.3: miRNA'nın işlevi

2.4.1. MikroRNA genleri ve yapısı

MikroRNA (miRNA)'lar 21-23 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli, proteine dönüştürülmeyen RNA molekülleridir [7]. mikroRNA'lar diğer genler gibi DNA üzerinden transkribe edilir ve proteine dönüştürülmeden küçük RNA molekülleri halinde gen düzenlenmesinde görev alırlar [35-36]. miRNA genleri Y kromozomu hariç bütün kromozomlara dağılmış halde bulunmaktadır. İlk zamanlar miRNA genlerinin intergenik bölgelerde bulunduğu düşünülmese de, günümüzde miRNA'lar kodlandıkları genomik bölgeye göre gruplara ayrılmışlardır.

Bunlar;

1. Protein kodlayan yazılım birimlerindeki intronik miRNAlar: İçinde bulundukları genin promotorunu paylaştıkları için bu genle aynı ifade paterni gösterirler.
2. Kodlamayan yazılım birimlerindeki intronik miRNAlar.
3. Kodlamayan yazılım birimlerindeki ekzonik miRNAlar: Protein kodlayan genlerde bulunan promotorlara benzer promotorlara sahiptirler [37-38].

2.4.2. MikroRNA'ların oluşum mekanizması

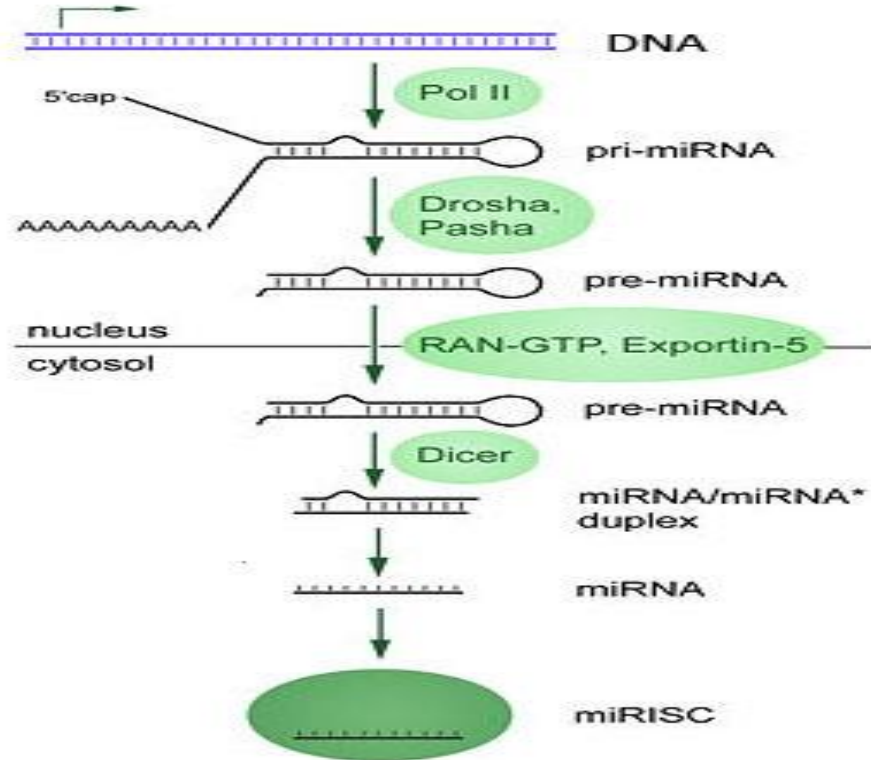
miRNA genleri RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilir. Oluşturulan transkript “CAP” ve Poli(A) kuyruğuna sahiptir. miRNA'lar DNA molekülünden ilk olarak pri-miRNA olarak transkripte olurlar. Daha sonra farklı enzimlerin yardımı ile işlenerek kısa sap ve ilmik yapısından oluşan pre-miRNA'ya ve son olarak da fonksiyonel form olan olgun miRNA'ya dönüştürülürler [39]. Bu dönüşüm aşamaları belirli moleküler mekanizmalarla gerçekleşmektedir.

İlk olarak pri-miRNA Drosha isimli enzim ile kesilerek pre-miRNA oluşturulur. 160 kD'luk bir nüklear Ribonükleaz III endonükleaz olan Drosha yaklaşık 200 nükleotidlik pre-miRNA'nın dizilerini keserek 70–80 nükleotidlik pre-miRNA'yı ortaya çıkarır. Drosha enzimi pri-miRNA'nın gövde-ilmek yapısını tanıyarak gövdede belli bir noktadan kesme işlemini yapar. Drosha'nın tanımadaki bu özgünlüğünün, yardımcı proteinlerle sağlandığı düşünülmektedir. Bu proteinlerden DGCR8 (veya Pasha) genine ait iki molekül Drosha'nın iki molekülü ile birleşerek heterotetramerik bir yapı oluşturur.

Daha sonra Exportin-5(exp5) / ranGTP ile birleşerek pre-miRNA heterotrimerik yapı oluştururlar. Bu yapı pre-miRNA'nın yapısını koruyarak sitoplazmaya taşınmasını sağlar. Sitoplazmaya ulaşıldığında RanGTP RanGDP'ye hidrolize olarak pre-miRNA'nın serbest kalması sağlanır.

Son olarak pre-miRNA, RNase III Dicer tarafından 18-22 nükleotitlik çift zincirli miRNA'ya dönüştürülür. miRNA dubleksinden sadece biri RISC kompleksine dahil olur. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonaute'un etkisiyle bu iki iplikten 5'ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Bu iplik kılavuz iplik olarak adlandırılır.

Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. Tek zincirli miRNA'yı içeren aktif haldeki RISC kompleksi baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanarak ya argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar [35, 37-38, 40]. miRNA'ların bu oluşum mekanizması Şekil 2-4'de gösterilmiştir.



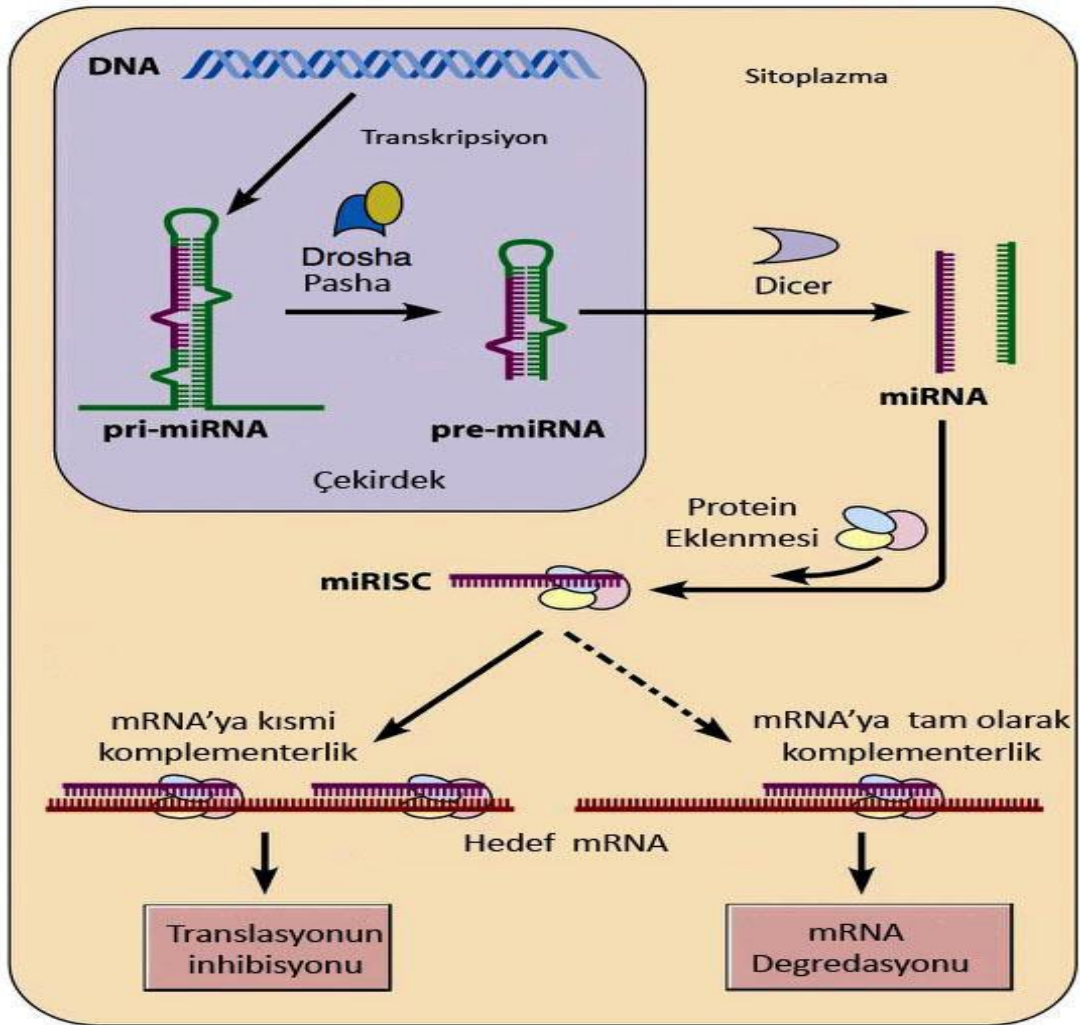
Şekil 2.4: miRNA'ların oluşum mekanizması

DICER aynı zamanda RNA indüklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex (RISC)) yani bir başka deyişle RISC oluşumunu başlatır. Bu kompleks miRNA ifadesi ve RNA interferanstan aracılı oluşturulan gen susturulmasından sorumlu olup ve ayrıca olgun miRNA hedef genlerin gen ifadesinde düzenleyici rol oynamaktadır.

miRNA'lar hedef mRNA'daki komplementer diziyi tanır. miRNA-RISC kompleksi mRNA'ya baz eşleştirme yaparak bağlanır. Böylece protein translasyonunun inhibisyonuna veya mRNA'nın yıkımına neden olur. miRNA, mRNA'ya 3'UTR (3' Çevrilmeyen Bölge) bölgesinden veya ORF (Açık Okuma Alanı) denilen bölgeden bağlanmaktadır.

Bu bağlanma pozisyonu miRNA'nın mRNA'ya ne oranda komplementer olma durumuna göre farklılık gösterir. 3'UTR bölgesine bağlılık tam olarak kusursuz bir komplementerlik göstermez ve sonuç olarak translasyon inhibe olur. ORF bölgesine bağlanma ise tam bir komplementerlik gerektirir yani miRNA'nın mRNA bölgesine tam olarak komplementer olması gerekir ve sonuç olarak mRNA degradasyonu gerçekleşir.

mRNA degradasyonu yalnızca hedef ile miRNA'nın komplementer olması sonucu oluşur, bu da bir miRNA'nın birçok mRNA'ya bağlanabileceğini ve her bir mRNA'nın birçok miRNA'ya hedef olabileceğini kanıtlanmaktadır [9, 41]. miRNA'nın işlevi Şekil 2.5'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.5: miRNA'ların İşlevi

2.4.3. mikroRNA'lar ve Kanser

mikroRNA'ların ortaya çıkarılmasından kısa bir süre sonra bu düzenleyici moleküllerin kanserdeki rolleri de araştırılmaya başlanmıştır. İlk olarak KLL hastalarında yapılmış bir çalışmada, bu hastaların yarısından fazlasında görülen 13q14 delesyonunun daha önce düşünüldüğü gibi bir “tümör baskılayıcı” geni hedeflemek yerine miR-15 ve miR-16'yı hedeflediği gösterilmiştir [13].

Yapılan bir çalışmada bu miRNA'ların anti-apoptotik faktör olan *BCL2*'nin ifadesini negatif olarak düzenlediği açığa kavuşturulmuştur [42]. miRNA genleri ve kanser arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bu ilk çalışmadan sonra buna benzer birçok çalışma yapılmış ve bilinen birçok miRNA ve bunların çoğunun kanserli hücrelerde ifade düzeylerinde farklılıkların ortaya konmasına rağmen kanserdeki etki mekanizması açıklanan miRNA sayısı sınırlıdır [43].

Aşırı c-myc (çesitli kanserlerde rol oynayan protein) üreten bir fare türünde yapılan araştırmalar miRNA'nın kanser gelişmesine etki ettiğini göstermiştir. Lenfomalarda bulunan miRNA'ları özellikle çok miktarda üretmek üzere tasarlanmış farelerde 50 gün içinde kanser gelişmiş ve bunlar iki hafta sonra ölmüşlerdir [44].

Bir diğer çalışmada, hücre çoğalmasını düzenleyen E2F1 proteininin iki tip miRNA tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir [45].

miRNA, mRNA'ya bağlanarak gen aktivitesine etki eden proteinlerin çevrimini engellemektedir. miRNA kodlayan 217 genin etkinliği ölçülerek farklı kanser tiplerini ayırt edebilen gen aktiviteleri bulunmuştur [46].

Bu konuda çalışmalar yoğun şekilde sürmektedir. Bu çalışmalar ışığında kanserde etkili miRNA'lar protein kodlayan genlerde olduğu gibi “tümör baskılayıcı” miRNA'lar ve “onkogenik” miRNA'lar olarak iki gruba ayrılmıştır [47].

Çesitli kanser türlerinde ifade düzeyleri azalan bazı miRNA'ların tümör baskılayıcı miRNA'lar olduğu düşünülmüştür. İfade düzeyi azalan bu miRNA'larla fonksiyonel çalışmalar yapıldığında bunların genelde onkogenleri hedef aldıkları görülmüştür [42-43]. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'nın ifadesinin azalması onkogenlerin ifadelerinin artmasına ve tümör oluşumuna sebep olmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerde olduğu gibi, tümör baskılayıcı miRNA'ları inaktive etmek için de kanserli hücrelerin çeşitli mekanizmalar kullandığı düşünülmektedir.

İfade çalışmalarında, çeşitli kanser türlerinde ifadesi azalan mikroRNA'lar onkogenik miRNA'lar olarak düşünülür. Bunlara “onkomir” adı verilir [48].

2.4.4. Kanserde mikroRNA aktivitesinin çeşitli meknizmalarla bozulması

2.4.4.1. miRNA ifade düzeyinin değişmesi

Birçok kanser türünde miRNA'ların ifade düzeylerinin normal dokulara göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bazı miRNA'ların ifade düzeyleri artarken bazılarının ki azalmıştır. Bu ifade değişimini açıklamak için birçok mekanizma öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar; miRNA'ların promotor bölgelerindeki metilasyon, miRNA'lardaki mutasyonlar, miRNA işlenmesinin değişmesi olarak sıralanabilir [43].

2.4.4.2. miRNA işlenmesinin değişmesi

Olgun miRNA'ların, hedef genlerin anlatımını baskılayabilmeleri için Argonaute-2 (Ago2) proteinine yüklenip RNA-indüklenmiş susturma kompleksini (RISC) meydana getirmeleri gerekir. miRNA işlenmesinde görev alan Drosha ve RISC yapısının oluşmasında yer alan Argonate ailesi üyesi proteinlerini etkileyen mutasyon veya ifade değişimleri de olgun miRNA oluşmasını ve RISC kompleksinin görevini yerine getirmesini engeller. Bu nedenle bazı kanser türlerinde bu proteinlerin ifade düzeyleri ve kodlayan genlerin mutasyonlarının da moleküler patogeneze rol oynadığı gösterilmiştir [49-50].

2.4.4.3. miRNA: mRNA eşleşmesini sağlayan dizilerde mutasyonlar

Bu mutasyonlar miRNA'lardaki mutasyonlar ve mRNA'nın 3'UTR bölgesindeki mutasyonlar olarak iki gruba ayrılabilir. mRNA'nın 3'UTR kısmındaki mutasyonlar, ya miRNA'nın bağlanmasını azaltabilir veya arttırabilir ya da miRNA'lar için yeni bağlanma bölgeleri oluşturabilir [51].

2.4.5. mikroRNA'larda mutasyonlar

Birçok kanser türünde kansere yakalanan bireyler için aile öyküsü bulunduğu halde, bu durumdan sorumlu kalıtsal mutasyonları taşıyan genler sadece belli kanserler için tanımlanabilmiştir. miRNA'ların kanserde oynadıkları rol göz önünde bulundurulduğunda bu miRNA'ları kodlayan genlerdeki mutasyonların da protein kodlayan genlerde olduğu gibi ailesel kanserlerde yatkınlık etkisi veya kanser oluşumunda etkisi olabileceği düşünülebilir [52].

Bu mutasyonlar ya olgun miRNA'nın yapısını değiştirerek hedef transkripti ile eşleşmesini değiştirebilir ya pri-miRNA ya da pre-miRNA'daki mutasyonlar miRNA'nın işlenmesini etkileyebilir veya pri-miRNA'nın promotor bölgesindeki mutasyonlar transkripsiyon oranını değiştirebilir [51].

KLL ile ilgili yapılan çalışmada miRNA genlerinde %15 somatik mutasyon saptanması ve pri-miR-15a/16-1'da germ-line bir mutasyon bulunması miRNA'ların da bu açıdan incelenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur [53]. Ayrıca bir miRNA'nın birçok genin transkriptini hedefliyor olması, küçük bir değişikliğin bile malign dönüşümde önemli sonuçları olacağını düşündürmektedir [54].

2.4.6. miR-15a/16-1

2.4.6.1. Genel Özellikleri

miR 15a/16-1 kümeler tarafından kodlanmış mikroRNA'lardır ve tümör baskılayıcı olarak bilinmektedirler. Bu miRNA'ların ifadesi hücre proliferasyonunu inhibe ederek kanser hücrelerini apoptoza götürmekte böylece hem in vitro hem de in vivo şartlarda tümör oluşumunu baskılamaktadırlar. *BCL2*, *MCL1*, *CCND1* ve *WNT3A* gibi birçok onkogenin fonksiyonu miR-15a/16-1 tarafından düzenlenmektedir. Bu miRNA'ların ifadesinin azalması KLL, hipofiz adenomları ve prostat kanserinde rapor edilmiştir [55]. miR 15a/16-1 kromozomun 13q14.3 bölgesine yerleşmiştir ve KLL'de bu bölge silinmiş ya da düzenlenmesi azalmıştır [13]. Bu bulgular miRNA genlerinin tümör oluşumunda önemli olabileceğinin ilk kanıtıdır.

KLL hastalarının yarısından fazlasında kromozomun 13q14.3 bölgesinde. homozigotluk kaybı gibi genetik değişimler belirtilmiştir [56]. Bu bölgedeki delesyonlar multiple miyelom, mantle hücreli lenfoma ve prostat kanserinde de rapor edilmiştir [57].

2.4.6.2. Kanserde miR-15a/16-1 düzenlenme değişiklikleri

Kanserde çoğunlukla değişmiş bir bölgede miR-15a/16-1'in haritalanması bu iki miRNA'nın 13q14.3 bölgesinin hedef genleri olabileceğini desteklemektedir. KLL ve solid tümörlerde yapılmış birçok çalışmada miR-15a/16-1'in tümör hücrelerinde silindiği ya da ifadesinin azaldığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar bu iki miRNA geninin kanser hücrelerinin değişiminde etkin bölgeler "hot stops" olabileceği sonucunu desteklemektedir [58-61].

miR-15a/16-1'in hipofiz adenomlarında normal hipofiz dokularına kıyasla daha düşük seviyede ifade edildiği gösterilmiştir [61]. Bu bilgi miR-15a/16-1'in tümör baskılayıcı bir role sahip olduğunu ve allelik kayıpla miR-15a/16-1'in inaktivasyonunun tümör oluşumuna yol açabileceği hipotezini doğrulamaktadır.

Anormal olarak ifade edilen kanser genleri çoğunlukla miR-15a/16-1'in aktivasyon ya da inaktivasyonuna yol açan mutasyonlar için hedeftir [62]. miRNA'lardaki mutasyonların belirlenmesi kanser gelişimine neden olan yeni gen sınıflarının ve onların düzenlenmesinin azalmasından sorumlu genetik mekanizmaların tanımlanmasında kritik bir aşama oluşturmaktadır. Tüm bunlar yine miR-15a/16-1'in tümör baskılayıcı rolünün olduğunu ve bu genlerdeki genetik mutasyonların onların ifadesini inaktive edebileceği olasılığını desteklemektedir.

Ayrıca heterozigosite kaybı, epigenetik düzenlemeler, miRNA biyogenezindeki hatalar gibi diğer mekanizmalar da miRNA ifadesinin azalmasına neden olabilmektedirler [63]. Bu bulgular, miR-15a/16-1 dizisinin kanserin oluşması ve yayılmasına yol açan nokta mutasyonları tarafından inaktive edildiklerini göstermektedir.

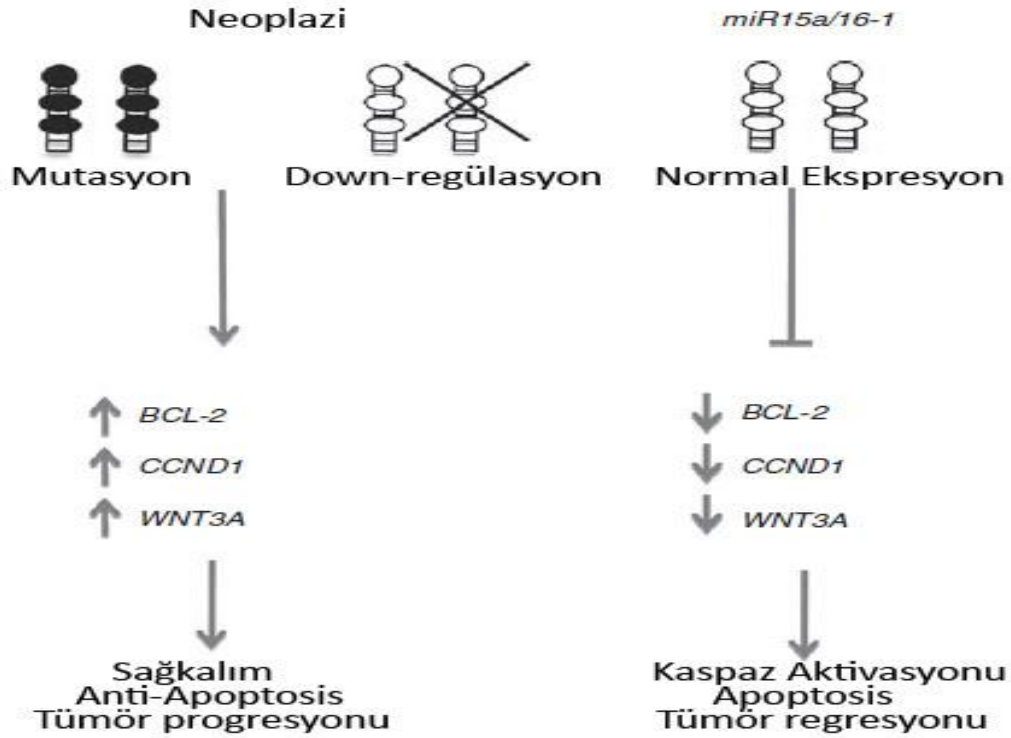
2.4.6.3. miR-15a/16-1'in kanser hücrelerindeki fonksiyonu

Bu genlerin hem doku homeostazisinde hem de karsinogenezde farklı ifade profili gösterdiği belirlenmiştir [64]. Bu profiller sayesinde normal insan hücreleri ile insan tümör hücreleri arasında farklılık gösteren miRNA'lar belirlenmiş ve bu seviye farklılıkları sayesinde onkomiR olarak adlandırılan miRNA onkogenleri tanımlanmıştır. OnkomiR'ler 3'-UTR, 5'-UTR ya da tümör baskılayıcı genlerin mRNA dizilerini hedef almaktadırlar. Bu şekilde hücrel tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin azalmasına neden olurlar. Kısaca miRNA'lar onkogenlerin ifade düzeylerinde artışa ve tümör baskılayıcı fonksiyona sahip genlerin ifadelerinde azalma ve kayıplara yol açmaktadır [65].

miR-15a/-16-1, BCL2, CCND1 (encoding cyclin D1), WNT3A mRNA olmak üzere birçok onkogeni hedef almaktadır. Bu onkogenler hayatta kalma, çoğalma ve invazyon gibi karakteristik tümör davranışını oluştururlar. miR-15a/16-1'in yıkımı bu genlerin düzenlenmesinin artmasına yol açarak prostat hiperplazisine neden olmaktadır. Bu oluşum miRNA'ların karsinogenez aşamasında etkili olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca miR-15a/-16-1 genlerinin BCL2 ile doğal anti-sense etkileşimleri olabileceği ve

BCL2'nin aşırı ifade düzeyleri, tümör tiplerinde terapötik olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [42, 60].

miR-15a/16-1'deki genetik değişimler apoptoz, çoğalma ve tümör gelişimini tetiklemektedir. miR-15a/16-1 değişimindeki ana mekanizmalar arasında delesyon, düzenlenmesinin azalması ve mutasyonlar sayılabilir.



Şekil 2.6: miRNA’da gelişen mutasyonlar sonucu hücresel genlerin düzenlenmesinin azalması

Şekil 2.6’da miR-15a/16-1’in deneysel hedefleri (apoptoz düzenleyici bir gen olan *BCL2* geni, siklin D1 (*CCND1*) ve *WNT3A* geni) gösterilmektedir. Tümör hücrelerinde miR15a/16-1 genlerinin miktarı ya da başka bir değişle anlatımları değişmekte, bu da onların hücresel hedeflerinin ifadelerini etkileyerek çoğalmaya neden olarak tümör gelişimine yol açmaktadır. Tümör hücrelerinde miR-15a/16-1 genlerinin yeniden restorasyonu bu genlerin ifadesini inhibe ederek kaspaz aktivasyonu yoluyla apoptoza neden olarak tümör regresyonuna yol açmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Materyal

04.03.2011 tarih ve 05 sayılı Etik Kurul kararı ile İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmesinin uygun olduğu onayını alan çalışmada, 2011-2012 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı ile Onkoloji Enstitüsü'ne yeni başvuran, hiç tedavi almamış Diffuz Büyük B Hücreli Hodgkin Dışı Lenfomalı hastalar kullanılmıştır. Her bir hasta konu ile ilgili olarak bilgilendirilmiş ve onay formu imzalatıldıktan sonra çalışmaya katılmıştır. Çalışmaya katılmayı kabul eden 40 hastadan hastaya ait periferik kan örnekleri hastanın rutin tetkiki için kan alınması sırasında gerçekleştirilmiş olup, kan alma işlemi için hastanın damarına ikinci kez girilmemesine özen gösterilmiştir. Çalışmanın kontrol grubu ise yaş ve cinsiyet açısından hasta grubu ile eşleşecek şekilde, bilgilendirilerek ve gönüllü onay formu imzalatılarak seçilen 15 kişiden oluşturulmuştur.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Biocoll Separating Solution (Ficoll) [BIOCHROM]

Etilen-diamin-tetraasetikasit(EDTA),

β -Merkaptoetanol, Tris(hidroksimetil aminometan), Borik Asit [MERCK]

Etidyum Bromid (EtBr), Bromfenol Mavisi (BFB) [SIGMA]

miRNeasy Mini Kiti [QIAGEN] ve QIAzol Lysis Reagent [QIAGEN]

Poli(A) Kuyruğu Reaksiyon Kiti [AMBION]

miRNA cDNA Sentez Kiti, EvaGreen miRNA QPZR Karışımı, hsa-miR-15a Primer, hsa-miR-16-1 Primer, hsa-let-7 Primer [ABM]

Lightcycler 480II Multiwell Plak [ROCHE]

Lysis Buffer ve Buffer R.

Medium, CD19⁽⁺⁾ CD20⁽⁺⁾ Pozitif Seçilim Karışımı

Manyetik Nanopartikül Pozitif Seçilim Karışımı [STEMCELL]

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

-30 Derin Dondurucu [SANYO]
 -80 Derin Dondurucu [SANYO]
 Azot Tankları [MVY]
 Yüksek Hızlı Soğutmalı Santrifüj [HERAEUS]
 Soğutmalı Eppendorf Santrifüj [HERAEUS]
 Santrifüjler Soğutmasız [HETTICH, JOUAN]
 Termal Döngü Cihazı [TECHNE]
 Mikropipetler [GILSON]
 Yatay Gel Elektrophorez Tankları ve Jel Dökme Sistemleri [BRL]
 Vorteks [FINEPZR]
 Distile Su Cihazı [MILLIPORE]
 The Big Easy ‘‘EasySep’’Magnet [STEMCELL]
 Spektrofotometre NanoDrop 2000 [THERMO SCIENTIFIC]
 LightCycler 480 [ROCHE]
 Mikrodalga Fırın [ARÇELİK]
 Gel Dökümantasyon Sitemi [BRL]
 Etüvler (37°C ve 56°C) [NÜVE]
 Manyetik Karıştırıcı [NÜVE]

3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

10X BFB Yükleme Tamponu (2mL)

- %1 SDS
- 5mg Bromfenol Mavisi
- 2ml Gliserol

10X PBS Tampon Çözeltisi (1L)

- 80 gr NaCl
- 2 gr KCl
- 11,5 gr Na₂HPO₄
- 2 gr KH₂PO₄

10X TEB (Tris-EDTA-Borik Asit) Tampon Çözeltisi (1L)

- 0.88 M Borik Asit
- 5M Tris
- 0.02 EDTA (pH :8.00)

%1,5'lik Agaroz Hazırlanması

- 1,5 gr Agaroz,
- 100mL 0.5X TEB
- 5µL Etidyum Bromür (10mg/mL)

1X Lysis Buffer (100mL)

- 10 mL 10X Lysis Buffer (ABM)
- 90 mL distile su

Buffer R.(100mL)

- 49 mL PBS
- 2 mL FBS
- 50 µL EDTA

3.2. Deney Yöntemleri

3.2.1. Periferik Kandan CD19⁽⁺⁾ ve CD20⁽⁺⁾ Hücre Ayırıştırılması

- 2mL EDTA'lı tüpe alınmış kan, üzerine 4mL Buffer R. eklenerek dilue edildi.
- Buffer R. buffer eklenen kan tüpü oda sıcaklığında 300g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Kalan pellet üzerine 2 mL Lysis Buffer eklenerek pellet çözöldü.
- Çözölen pellet üzerine 100 µL Pozitif Selection Cocktail eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Karışım üzerine 100 µL manyetik nanopartiköl pozitif seçim solüsyonu eklenerek karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

- İnkübasyondan sonra tüp içindeki karışım CD19⁽⁺⁾ ve CD20⁽⁺⁾ hücrelerinin manyetik ayrımını sağlamak amacıyla manyetik ayırıcı mıknatısın ortasındaki tüpe üzerine 8mL Buffer R. ilave edilerek aktarıldı ve hücrelerin mıknatıs yardımıyla tüpün kenarlarına tutunması için 10 dk oda sıcaklığında bırakıldı.
- Çok yavaş ve hassas bir şekilde tüp magnet cihazında sabit tutularak tüpün içindeki sıvı kısım dikkatlice döküldü. Böylece ayrılması istenen hücrelerin tüpün etrafında yapışık olarak kalması sağlandı.
- Pozitif seçilmiş hücreler üzerine 10 mL Buffer R. eklendi ve 5dk oda sıcaklığında bekletilmek suretiyle tüpün kenarına yapışmış hücreler yıkandı. Üst sıvı dökülerek bu işlem üç kez tekrarlanarak yıkama işlemi tamamlandı.
- Özel mıknatıslı taşıyıcı içerisindeki tüp çıkartıldı ve 500 µL Buffer R. eklenerek tüpün çeperlerindeki hücreler çözüldü.
- Krio tüplere alınan örnekler 2000 RPM’de 5 dk. santrifuj edildi.
- Süpernatant döküldü. Pellet halindeki hücreler önce -80°C’de 1 gün, ardından uzun süreli saklanmak üzere azot tankına kaldırıldı.

3.2.2. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

- EDTA’lı tüpe alınıp 6 mL kan 1/1 oranında %0.9’luk NaCl ile dilue edildi.
- Dilüe edilmiş kan örneği 2 mL Ficoll üzerine yavaş yavaş pipet yardımıyla eklendi. 2000 RPM’de 30 dk. süreyle santrifuj edildi.
- Üst fazında serum, alt fazında eritrosit ve diğer beyaz kan hücreleri bulunan tüpten lenfositler pastör pipet yardımıyla temiz bir tüpte toplandı.
- 2000 RPM’de tekrar 10 dk. santrifuj edildi.
- Süpernatant dökülerek pellet üzerine 4 mL PBS eklendi ve pipetlenerek pellet çözüldü. Çözülmüş pellet 4 krio tüpe 1’er mL olacak şekilde dağıtıldı.
- Krio tüpler 2000 RPM’de 5 dk. santrifuj edildi.
- Süpernatant döküldü. Elde edilen hücreler -80°C’de 1 gün süreyle inkübe edildi.
- Daha sonra Krio tüplerdeki hücreler uzun süreli saklanmak üzere azot tankına aktarıldı.

3.2.3. miRNA İzolasyonu

Ayrıştırılan lenfositlerden miRNA izolasyon işlemi miRNA'ya özel olan miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) kullanılarak ve firmanın verdiği protokole göre gerçekleştirildi. Buna göre işlem;

- Azot tankında saklanan hücreler üzerine 700 μ L QIAzol solüsyonu eklendi.
- Vorteks yardımıyla karıştırılarak hücrelerin parçalanmaları sağlandı.
- Nükleoproteinlerin tamamen parçalanması için 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Üzerlerine 140 μ L kloroform eklenerek 15 saniye boyunca elde çalkalanarak karıştırıldı.
- 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12.000g'de, 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda oluşan üst faz pipet yardımıyla alınarak toplama tüpüne aktarıldı. Üzerine 525 μ L %100 Etanol eklenerek vorteks yardımıyla karıştırıldı.
- Elde edilen karışımdan 700 μ L alınarak, 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy MinElute spin kolona aktarıldı.
- Tüpler oda sıcaklığında 8000g'de 15 saniye boyunca santrifüj edildi.
- Spin kolonlara 700 μ L RWT tamponu eklenerek, 8000g'de 15 saniye santrifüj edilmek suretiyle kolonlar yıkandı.
- Kolonlara iki kez üst üste 500 μ L RPE tamponu eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı.
- 2 mL'lik temiz tüplere yerleştirilen kolonlar maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmek suretiyle kurutuldu.
- 1.5 mL'lik steril tüplere yerleştirilen kolonlar, 50 μ L saf su eklenerek 8000g'de 1 dakika santrifüj edilerek miRNA'larca zengin 200 nt'ten kısa RNA'lar toplandı.
- miRNA'larca zengin 200 nükleotit'ten kısa RNA'lar cDNA sentezine kadar -80°C 'de saklandı.

3.2.4. miRNA'ların Saflık ve Konstrasyon Analizleri

Öncelikle miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) kullanılarak izole edilen miRNA'larca zengin 200 nt'ten kısa RNA'ların varlığı ve kalitesi % 1.5 agaroz jelde 150V'da elektroforez edilerek incelendi.

Ardından saflık ve konsantrasyon analizi için nanodrop ölçümleri yapıldı. miRNA'nın 1µL'si Nanodrop da ölçüldü. Nanodrop ölçüm sonucuna göre her bir hasta ve kontrol grubuna ait miRNA'ların konsantrasyonları 200 ng/µL olacak şekilde sulandırıldı. Böylece miRNA'lar cDNA sentez reaksiyonu için hazır hale getirildi.

3.2.5. miRNA'lara Poli A Kuyruğu Ekleme Reaksiyonu

20-22 nükleotit uzunluğa sahip mikroRNA'ların in vitro ortamda çoğaltılabilmeleri mümkün değildir. miRNA'ların PZR ile çoğaltılabilmeleri için cDNA'ya dönüştürülmeleri ve bunun için de boylarının uzatılması gerekmektedir. miRNA'ların boy uzatma işlemi, miRNA'lara Poli(A) kuyruğu eklenerek sağlanmaktadır. Çalışmamızda bu işlem için Poli(A) Kuyruğu Reaksiyon Kiti (Ambion) kullanılarak mikroRNA moleküllerinin cDNA'ya dönüşümü ve dolayısıyla PZR'da çoğaltılabilecek uzunluğa erişmeleri sağlandı.

Tablo 3.1: Poli A Kuyruğu Ekleme Reaksiyonu

miRNA	Total miRNA miktarı 200ng
5X PoliA buffer	2 µL
25mM MgCl₂	1 µL
5Mm ATP	1, 5 µL
PoliA polimeraz	0, 5 µL
Su	Son hacim 10 µL olacak şekilde ayarlandı.

İzole edilen miRNA'lara Poli(A) kuyruğu ekleme reaksiyonu Tablo 3.1'de belirtilen miktarlarda 5XPoliA buffer, 25mM MgCl₂, 5mM ATP ve PoliA polimeraz'ı sırasıyla eklemek suretiyle gerçekleştirildi.

Buz içinde hazırlanan reaksiyon karışımı 37⁰C sıcaklıkta 30 dakika inkübasyon için Termal Döngü cihazına yerleştirildi. İnkübasyonun ardından Poli(A) işlemi tamamlanmış olan miRNA örnekleri cDNA sentezine kadar -30 ⁰C’de saklandı.

3.2.6. cDNA Sentezi

mikroRNA’lardan cDNA sentezi işlemi, miRNA cDNA Sentez Kiti (ABM) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit içinde bulunan primerler iki amaca hizmet eden kombine primerlerdir. Bu kombine primer üzerinde, boyu Poli (A) kuyruğu eklenerek uzatılmış miRNA’lara bağlanacak Poli(A) antisense kısım (Oligo(dT)) ile miRNA’nın cDNA reaksiyonundan sonra PZR ile çoğaltılmasını sağlayacak olan evrensel dizi bulunmaktadır. cDNA reaksiyonu sırasında eklenen kombine primerin Poli(A) antisense kısım ile miRNA tanınırken, primer üzerindeki ikinci kısım olan evrensel diziler yoluyla miRNA’ların PZR ile çoğaltılması sağlandı.

Tablo 3.2: cDNA Oluşturma Reaksiyonu Öncesi Adaptör Bağlanması

	Reaksiyon Hacmi	Final Konsantrasyon
Poli A eklenmiş miRNA kalıbı	10 µL	200ng miRNA
miRNA Oligo(dT) adaptör	2µL	1 µM

Poli(A) kuyruğu eklenmiş miRNA’lar öncelikle Oligo(dT) adaptör molekül olarak ifade edilen Oligo(dT) primerlerle inkübe edildi. Tablo 3.2’de belirtilen oranlarda hazırlanan karışım Termal Döngü cihazı kullanılarak 65⁰C’de 5 dk, inkübe edildi. Bu işlem sonrasında Oligo(dT) adaptörü takılan ya da başka bir deyişle Oligo(dT) primerleri ile hibridize edilmiş miRNA’lar cDNA sentez reaksiyonunun tamamlanması için gerekli ikincil karışım hazırlanana kadar buz içinde bekletildi.

Tablo 3.3: cDNA Sentez Reaksiyonu

	Reaksiyon Hacmi	Total Konsantrasyon
dNTP	1 µL	500 µM
5X RT buffer	4 µL	1X
RNasin	0, 5 µL	20U
EasyScript RTase	1 µL	200U
Su	1, 5 µL	
Toplam Hacim	20 µL	

Tablo 3.3’de verilen dNTP, 5X RT buffer, RNasin, EasyScript RTase, su belirtildikleri miktarda karıştırılarak yukarıda hazırlanmış ve buz içinde bekletilen Poli(A) içeren Oligo(dT) adaptörü takılmış miRNA’ya ilave edildi. Bu işlemin ardından karışım 42⁰C’de 15 dk, 70⁰C’de 10 dk inkübe edilmek üzere Termal Döngü cihazına yerleştirildi. İnkübasyon sonrası Gerçek Zamanlı PZR işlemi için kalıp olarak kullanılmak üzere hazır hale getirilen cDNA örnekleri Gerçek Zamanlı PZR işlemi yapılana kadar -30 ⁰C’de saklandı.

3.2.7. Gerçek Zamanlı PZR

Çalışmamızda miR-15a ve miR-16-1 genlerinin anlatım düzeyleri ilgili genlerin miR primerleri (ABM) ve EvaGreen miRNA qPZR Karışımı (ABM) kullanılarak LightCycler 480II’de (ROCHE) gerçek zamanlı PZR kullanılarak analiz edildi. Reaksiyon sırasında çoğalan miRNA gen ürünleri EVAGreen floresan (ABM) molekülü kullanılarak gerçek zamanlı olarak belirlendi. Çalışmamızda gen ifade analizi için gerekli normalizasyon ve cDNA’nın kontrolü için referans gen olarak *LET-7* geni kullanıldı. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu için gerekli maddeler ile miktarları Tablo3.4’de verilmektedir.

Tablo 3.4: Gerçek Zamanlı PZR Koşulları

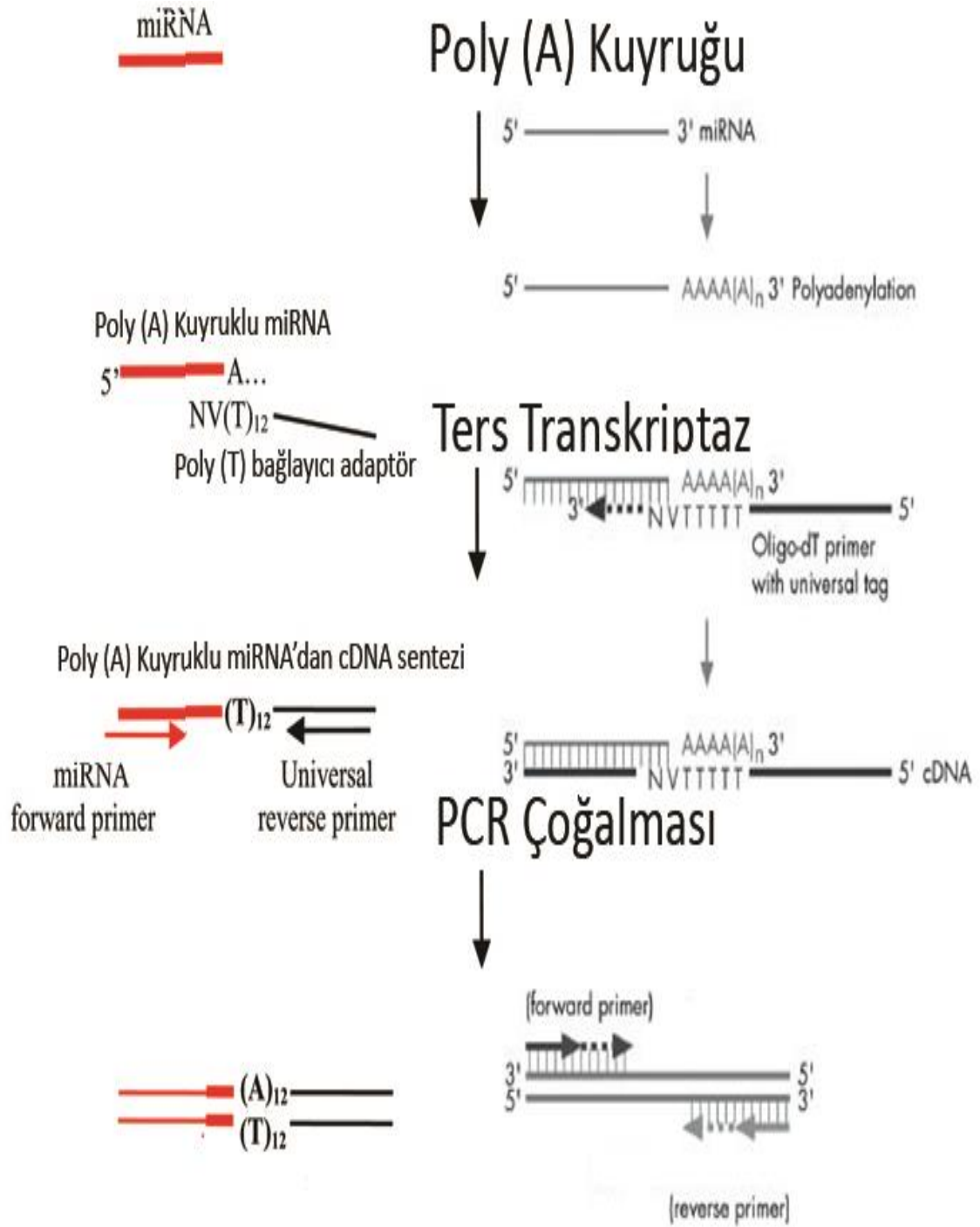
	Reaksiyon Hacmi	Son Hacim
EVAGreen miRNA karışımı	10 µL	1X
Forward Primer	0, 6 µL	300nM
Reverse Primer	0, 6 µL	300nM
Kalıp cDNA	1 µL	< 500 ng
Steril Su	7, 8 µL	
Toplam Hacim	20 µL	

Her hasta ve kontrol için iki hedef gen ile bir referans gen için Tablo 3.4’de gösterildiği gibi gerçek zamanlı PZR reaksiyon karışımı hazırlandı.

Hazırlanan karışım gerçek zamanlı PZR için mikropiçle yüklendi. 95°C’de 10 dakika genel denatürasyon işleminden sonra 95°C’de 10sn, 63°C’de 15sn, 72°C’de 5sn olacak şekilde 40 döngü olmak üzere gerçek zamanlı PZR işlemi gerçekleştirildi.

Gerçek zamanlı PZR işlemi sırasında iki hedef genimiz olan miR-15a ve miR-16-1 ile referans genimiz dışında başka bir ürünün çoğalıp çoğalmadığından emin olmak ve çoğalan ürünün hesaplamalarını yapabilmek için PZR döngüsü sonuna “erime eğrisi analizi (melting curve analysis)” için ilave bir döngülük reaksiyon eklendi.

Gerek referans, gerekse hedef genlere ait primerler kullanarak yapılan gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen nicel ölçümler ile gen ekspresyonları arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Şekil 3.1’de miRNA’nın gerçek zamanlı PZR ile çoğaltılmasının tüm aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 3.1: miRNA'nın gerçek zamanlı PZR ile çoğaltılması işleminin şematik anlatımı.

4. BULGULAR

Tez çalışması kapsamında, 2011-2012 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı ile Onkoloji Enstitüsü polikliniklerine başvuran morfolojik ve patolojik özelliklerine göre Diffuz Büyük B hücreli Hodgkin Dışı Lenfoma tanısına sahip ve o ana kadar hiç tedavi almamış 40 hastanın periferik kan örnekleri ile kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet bakımından hasta grubu ile eşleştirilerek seçilen 15 sağlıklı bireyin periferik kanları kullanılmıştır.

Lenfadenopati gözlenen hastalarda tutulumlar nodal ve ektranodal olarak saptanmıştır. Nodal tutulum daha çok boyun, omuz bölgesi ve servikal bölgedeki lenf nodlarında görülürken ektranodal tutulum gösteren hastalarda tutulumlar gastrointestinal sistem, burun boşlukları, tükürük bezi, böbrek, çene, pankreas ve ön kolda yerleşim göstermektedir.

Çalışmada kullanılan hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımları ile gruplardaki yaş ortalamaları Tablo 4.1’de verilmiştir. Çalışma grubunda bulunan erkek ve kadın oranları ile kontrol grupları arasında deneysel sonuçlarda istatistiksel bir fark yaratacak farklılık olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Gruplar arasında gerek cinsiyet gerekse yaş açısından bir farklılık olmadığı ve buna bağlı olarak deney grubu ile kontrol grubunun karşılaştırılabilir nitelikte olduğu belirlendi.

Tablo 4.1: Hasta ve kontrol gruplarının dağılımları ve yaş ortalamaları

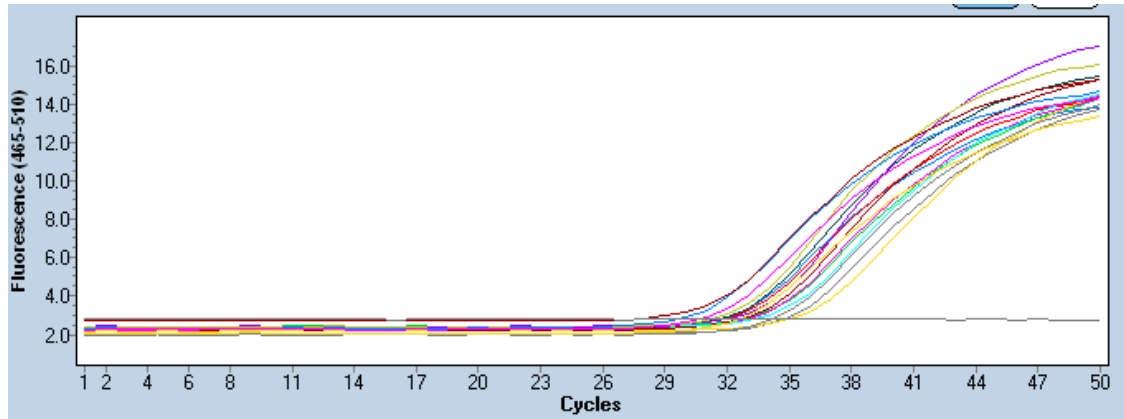
Cinsiyet	Hasta n %	Kontrol n %	Hasta Yaş Ort. Ort. SD	Sağlıklı Yaş Ort. Ort. SD
Kadın	15 (%37, 5)	7 (%45)	53, 5 (± 15 , 7)	53 (± 5 , 6)
Erkek	25 (%62, 5)	8 (%55)	55. 3(± 16 , 1)	51, 1 (± 5 , 05)

4.1. Gen İfade Düzeyleri

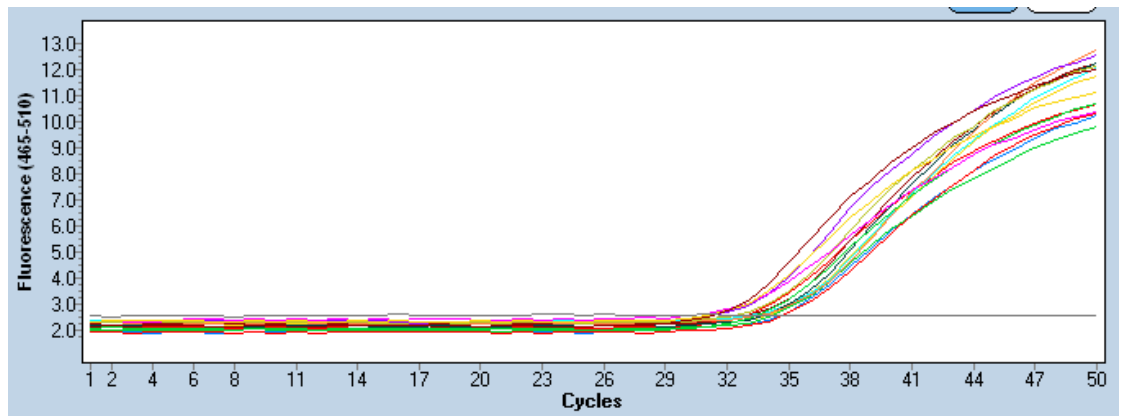
Çalışmada hiç tedavi görmemiş de novo Diffüz büyük B hücreli lenfomalı 40 hasta ile hasta grubu ile yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş 15 sağlıklı bireyin periferik kan lenfositlerinden izole edilen 200 nükleotitten küçük RNA'larda, lenfositlerinde miR-15a, miR-16-1 gen anlatım düzeyleri *LET-7* kontrol gen varlığında gerçek zamanlı PZR yöntemiyle incelendi.

Hasta ve kontrol grubundaki kişilerin periferik kanlarından izole edilen ve daha sonra cDNA'ya dönüştürülen RNA örnekleri çalışma kapsamında araştırılan miR-15a ve miR-16-1 genleri ile *LET-7* referans geninin gerçek zamanlı PZR işlemi sırasında çoğalmaya başladığı, ilk döngü değeri yani C_T değerleri kullanılarak gen anlatım düzeyleri hesaplandı ve bu değerler birbiri ile karşılaştırıldı.

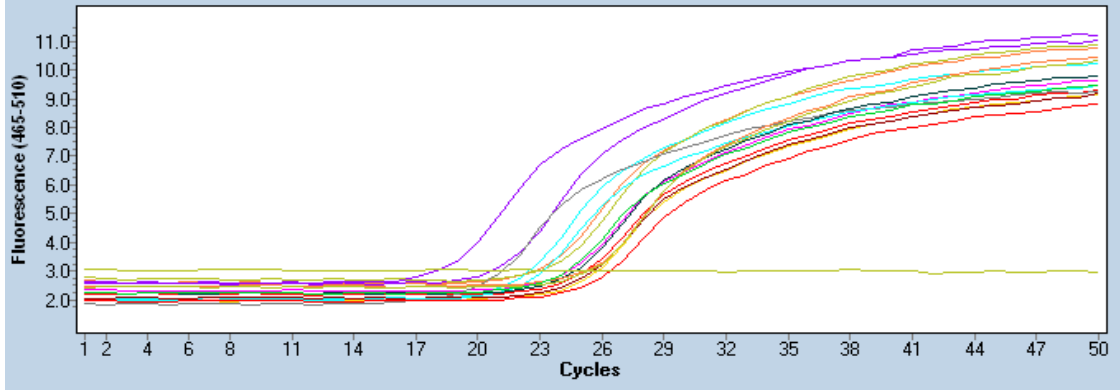
Hastalara ait miR-15a, miR-16-1 hedef genleri ile *LET-7* referans genine ait gerçek zamanlı PZR çoğalma eğrileri sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de, görülmektedir.



Şekil 4.1: DBBHL hastalarda miR-15a geni'ne ait gerçek zamanlı PZR eğrileri

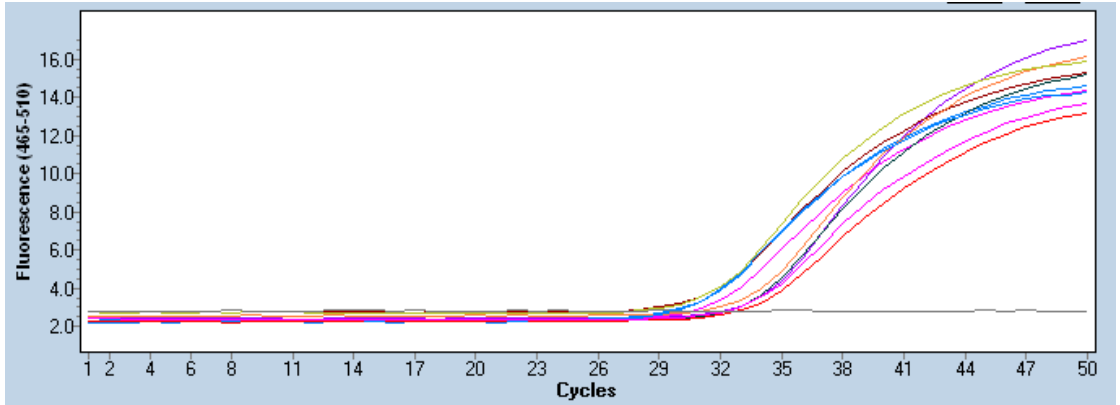


Şekil 4.2: DBBHL hastalarda miR-16-1 geni'ne ait gerçek zamanlı PZR eğrileri

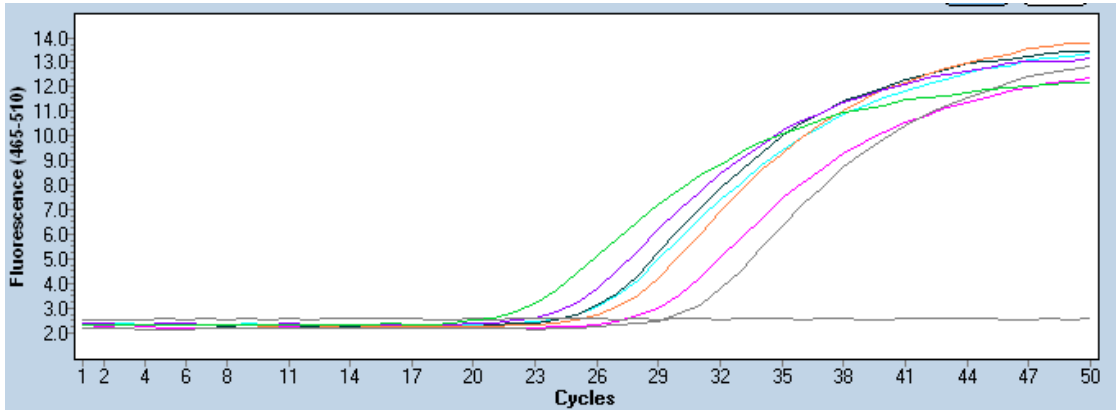


Şekil 4.3: DBBHL hastalarda *LET-7* referans genine ait gerçek zamanlı PZR eğrileri

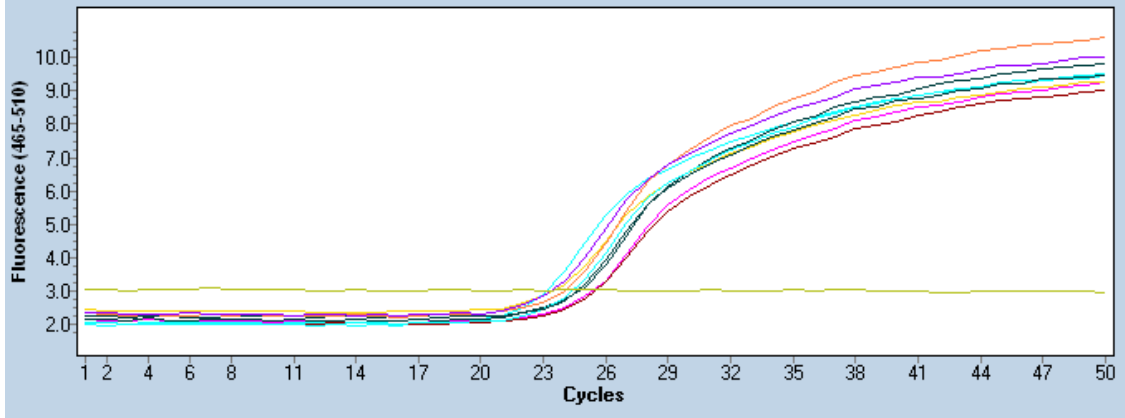
Kontrol grubuna ait miR-15a, miR16 hedef genleri ile *LET-7* referans genine ait gerçek zamanlı PZR çoğalma eğrileri sırasıyla Şekil 4-4, Şekil 4-5 ve Şekil 4-6'da verilmektedir.



Şekil 4.4: Sağlıklı kontrollerde miR-15a geni'ne ait gerçek zamanlı PZR eğrileri



Şekil 4.5: Sağlıklı kontrollerde miR-16-1 geni'ne ait gerçek zamanlı PZR eğrileri



Şekil 4.6: Sağlıklı kontrollerde *LET-7* referans genine ait gerçek zamanlı PZR eğrileri

Gerçek zamanlı PZR verilerinin analizi için en yaygın kullanılan method bağıntılı ölçme yöntemidir. Bu yöntemde hedef genin hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki PZR sinyaller göz önünde bulundurulur. Gerçek zamanlı PZR deneylerinde gen ifadelerindeki göreceli değişikliklerin analizinde $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu kullanılır. Hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında hedef genlerimiz olan miR-15a ile miR-16-1 ve *LET-7* referans genimiz için C_T değerlerini belirleyerek aşağıdaki formül ile genlerin ifade düzeylerindeki artış veya eksilme oranları belirlendi.

$$\Delta C_T = C_{T(\text{hedef})} - C_{T(\text{referans})}$$

ΔC_T ; Hedef ve Referans genler için belirlenen C_T yani döngü sayısı farkını ifade etmektedir.

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T(\text{hedef})} - C_{T(\text{referans})})_{\text{hasta}} - (C_{T(\text{hedef})} - C_{T(\text{referans})})_{\text{sağlıklı kontrol}}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{Ürün Miktarı Oranı}$$

Bu yöntem doğrultusunda hedef gen ile referans gen arasındaki fark yani ΔC_T miR-15a ve miR-16-1 genleri için hem hasta hem de kontrol grubu için hesaplandı. Her bir hasta örneğine ait ΔC_T değerinden sağlıklı gruba ait ortalama ΔC_T değerinin çıkartılmasıyla ise her bir hasta örneğine ait $\Delta\Delta C_T$ değeri bulundu. $\Delta\Delta C_T$ değerlerinin hesaplanmasından sonra bu değer üstel fonksiyonu olarak $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri hem miR-15a ve hem de miR-16-1 geni için her iki deney grubunda da hesaplandı. Her iki deney grubundaki $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Hasta ve sağlıklı gruba ait örneklerin hem referans gen (*LET-7*) için hem de hedef genler yani araştırdığımız miR-15a ve miR-16-1 genleri için C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri sırasıyla Tablo 4.2 , 4.3, 4.4 , 4.5’de görülmektedir.

Tablo 4.2: DBBHL'lı hastalarda miR-15a geni ile *LET-7* referans geni arasındaki farkın C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri

no	miR-15a hedef C_T	miR-15a referans C_T	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	grup
1	32, 73	21, 24	11, 49	1, 80	0, 287718	DBBHL
2	33, 10	13, 63	19, 47	9, 77	0, 001142	DBBHL
3	34, 23	22, 77	11, 47	1, 77	0, 293319	DBBHL
4	34, 03	20, 69	13, 34	3, 65	0, 079856	DBBHL
5	35, 17	23, 44	11, 72	2, 03	0, 245087	DBBHL
6	36, 07	24, 62	11, 45	1, 75	0, 297429	DBBHL
7	33, 88	24, 03	9, 85	0, 16	0, 896617	DBBHL
8	34, 84	15, 75	19, 09	9, 40	0, 001484	DBBHL
9	32, 95	23, 60	9, 70	-0, 34	1, 268631	DBBHL
10	28, 02	19, 59	8, 43	-1, 27	2, 412872	DBBHL
11	33, 96	24, 23	9, 73	0, 04	0, 974385	DBBHL
12	32, 84	24, 18	8, 66	-1, 03	2, 047623	DBBHL
13	31, 06	21, 77	9, 68	-0, 40	1, 317447	DBBHL
14	25, 95	23, 79	2, 16	-7, 54	185, 6137	DBBHL
15	25, 19	25, 02	0, 17	-9, 53	738, 5757	DBBHL
16	31, 75	18, 16	13, 59	3, 89	0, 06723	DBBHL
17	34, 60	24, 9	9, 7	-0, 06	1, 042858	DBBHL
18	32, 85	24, 70	8, 15	-1, 55	2, 92662	DBBHL
19	31, 40	24, 82	6, 58	-3, 11	8, 656452	DBBHL
20	23, 79	23, 19	0, 60	-9, 09	545, 3312	DBBHL
21	29, 64	24, 64	5, 00	-4, 70	25, 90927	DBBHL
22	26, 55	22, 57	3, 98	-5, 72	52, 59935	DBBHL
23	30, 01	22, 16	7, 84	-1, 85	3, 611616	DBBHL
24	34, 17	13, 51	20, 66	10, 96	0, 000501	DBBHL
25	33, 47	23, 25	10, 22	0, 53	0, 694578	DBBHL
26	28, 14	16, 10	12, 04	2, 34	0, 197231	DBBHL
27	33, 92	22, 02	11, 89	2, 20	0, 218357	DBBHL
28	33, 21	23, 84	9, 37	-0, 33	1, 253006	DBBHL
29	34, 05	24, 97	9, 09	-0, 61	1, 524443	DBBHL
30	34, 33	22, 47	11, 86	2, 16	0, 223581	DBBHL
31	33, 85	16, 91	16, 93	7, 24	0, 006621	DBBHL
32	33, 65	24, 52	9, 13	-0, 57	1, 480151	DBBHL
33	30, 44	25, 24	5, 20	-4, 49	22, 53122	DBBHL
34	31, 44	26, 72	4, 72	-4, 97	31, 40899	DBBHL
35	33, 73	24, 64	9, 09	-0, 60	1, 517589	DBBHL
36	30, 81	24, 54	6, 27	-3, 43	10, 74871	DBBHL
37	35, 98	16, 17	19, 81	10, 12	0, 000901	DBBHL
38	32, 49	24, 27	8, 22	-1, 47	2, 778557	DBBHL
39	32, 11	24, 59	7, 52	-2, 17	4, 514424	DBBHL
40	21, 85	14, 83	7, 03	-2, 67	6, 363178	DBBHL

Tablo 4.3: DBBHL'lı hastalarda miR-16-1 geni ile *LET-7* referans geni arasındaki farkın C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri

no	miR-16-1 hedef C_T	miR-16-1 referans C_T	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	grup
1	34, 70	21, 24	13,46	6, 48	0,011231	DBBHL
2	33, 61	13, 63	19,98	12,99	0,000123	DBBHL
3	34, 46	22, 77	11,69	4, 71	0,038334	DBBHL
4	28, 82	20, 69	8, 13	1, 15	0,451829	DBBHL
5	30, 66	23, 44	7, 21	0, 23	0,853012	DBBHL
6	35, 06	24, 62	10,43	3, 45	0,091523	DBBHL
7	34, 65	24, 03	10,62	3, 63	0,080572	DBBHL
8	35, 45	15, 75	19,70	12,71	0,000149	DBBHL
9	34, 90	23, 60	11,30	4, 32	0,050137	DBBHL
10	35, 71	19, 59	16,12	9, 13	0,001783	DBBHL
11	33, 30	24, 23	9, 07	2, 08	0,235986	DBBHL
12	34, 09	24, 18	9, 92	2, 93	0,130975	DBBHL
13	22, 69	21, 77	0, 93	-6, 06	66,63279	DBBHL
14	35, 03	23, 79	11,24	4, 26	0,052374	DBBHL
15	33, 89	25, 02	8, 87	1, 89	0,270739	DBBHL
16	33, 03	18, 16	14,87	7, 89	0,004222	DBBHL
17	29, 00	24, 96	4, 04	-2, 95	7,720388	DBBHL
18	32, 85	24, 70	8, 15	1, 17	0,445496	DBBHL
19	32, 45	24, 82	7, 64	0, 65	0,636217	DBBHL
20	26, 03	23, 19	2, 84	-4, 14	17,62723	DBBHL
21	35, 00	24, 64	10,36	3, 38	0,096313	DBBHL
22	27, 14	22, 57	4, 58	-2, 41	5,300328	DBBHL
23	30, 74	22, 16	8, 58	1, 59	0,331647	DBBHL
24	25, 02	13, 51	11,51	4, 52	0,043457	DBBHL
25	21, 49	23, 25	-1, 76	-8, 74	428,2738	DBBHL
26	35, 55	16, 10	19,44	12,46	0,000178	DBBHL
27	35, 36	22, 02	13,33	6, 35	0,012261	DBBHL
28	21, 89	23, 84	-1, 94	-8, 93	487,0419	DBBHL
29	36, 10	24, 97	11,13	4, 15	0,056371	DBBHL
30	33, 48	22, 47	11,01	4, 02	0,061481	DBBHL
31	24, 64	16, 91	7, 72	0, 74	0,598791	DBBHL
32	39, 26	24, 52	14,74	7, 75	0,004634	DBBHL
33	40, 63	25, 24	15,39	8, 41	0,002947	DBBHL
34	38, 73	26, 72	12,01	5, 03	0,030703	DBBHL
35	36, 20	24, 64	11,56	4, 58	0, 04185	DBBHL
36	20, 25	24, 54	-4, 29	11,27	2474,787	DBBHL
37	33, 43	16, 17	17,26	10,28	0,000804	DBBHL
38	27, 66	24, 27	3, 39	-3, 59	12,07001	DBBHL
39	36, 78	24, 59	12,19	5, 21	0, 02701	DBBHL
40	35, 18	14, 83	20,35	13,36	0,000095	DBBHL

Tablo 4.4: Sağlıklı kontrollerde miR-15a geni ile *LET-7* referans geni arasındaki farkın C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri

no	miR-15a hedef C_T	miR-15a referans C_T	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	grup
1	33, 47	24, 09	9, 38	-0, 32	1, 247695848	KONTROL
2	33, 39	24, 38	9, 01	-0, 68	1, 603406965	KONTROL
3	25, 36	22, 81	2, 55	-7, 15	141, 9382311	KONTROL
4	31, 54	24, 06	7, 48	-2, 22	4, 657098235	KONTROL
5	30, 84	23, 09	7, 74	-1, 95	3, 869189406	KONTROL
6	33, 79	23, 52	10, 27	0, 57	0, 672064327	KONTROL
7	23, 87	23, 36	0, 52	-9, 18	579, 4336769	KONTROL
8	33, 49	22, 64	10, 85	1, 15	0, 449567539	KONTROL
9	34, 10	22, 26	11, 85	2, 15	0, 224876149	KONTROL
10	32, 81	14, 70	18, 11	8, 41	0, 002930315	KONTROL
11	32, 04	19, 91	12, 12	2, 43	0, 185704875	KONTROL
12	32, 61	23, 75	8, 87	-0, 83	1, 777225697	KONTROL
13	29, 16	13, 14	16, 02	6, 32	0, 012491682	KONTROL
14	30, 82	25, 04	5, 78	-3, 92	15, 0878061	KONTROL
15	26, 59	11, 69	14, 89	5, 20	0, 027235324	KONTROL

Tablo 4.5: Sağlıklı kontrollerde miR-16-1 geni ile *LET-7* referans geni arasındaki farkın C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.

no	miR-16-1 hedef C_T	miR-16-1 referans C_T	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	grup
1	25, 95	24, 09	1, 86	-5, 13	34, 910970	KONTROL
2	27, 21	24, 38	2, 83	-4, 16	17, 819369	KONTROL
3	24, 68	22, 81	1, 87	-5, 11	34, 570717	KONTROL
4	32, 31	24, 06	8, 25	1, 27	0, 414995	KONTROL
5	32, 78	23, 09	9, 69	2, 70	0, 153685	KONTROL
6	32, 65	23, 52	9, 14	2, 15	0, 224901	KONTROL
7	22, 32	23, 36	-1, 03	-8, 02	258, 968986	KONTROL
8	31, 18	22, 64	8, 54	1, 55	0, 340486	KONTROL
9	37, 71	22, 26	15, 45	8, 47	0, 002822	KONTROL
10	33, 55	24, 70	8, 85	1, 87	0, 274085	KONTROL
11	40, 82	19, 91	20, 90	13, 92	0, 000065	KONTROL
12	30, 31	23, 75	6, 56	-0, 42	1, 338369	KONTROL
13	28, 32	23, 14	5, 19	-1, 80	3, 480169	KONTROL
14	22, 73	25, 04	-2, 31	-9, 30	629, 451062	KONTROL
15	30, 67	21, 69	8, 98	2, 00	0, 250790	KONTROL

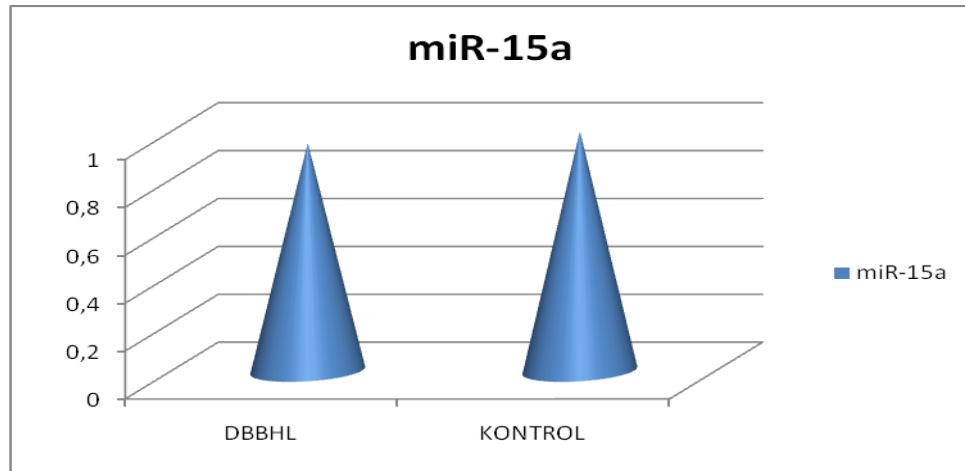
miR-15a gen ekspresyon düzeyi için DBBHL'lı hastalardaki ΔC_T ortalaması (9,75) ile kontrol grubundaki ΔC_T ortalaması (9,68) karşılaştırıldığında istatistiksel bir farkın olmadığı belirlendi ($p=0.895$) (Tablo 4.6) (Şekil 4.7). miR-16-1 genine ait ekspresyon düzeyi için DBBHL'lı hastalardan elde edilen ΔC_T ortalaması (10,07) ile kontrol grubuna ait ΔC_T ortalaması (6,98) karşılaştırıldığında ise iki grup arasında istatistiksel fark olduğu saptandı ($p= 0.032$) (Tablo 4.7) (Şekil 4.8).

Tablo 4.6: miR-15a geni için hasta ve kontrol grubunun $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.

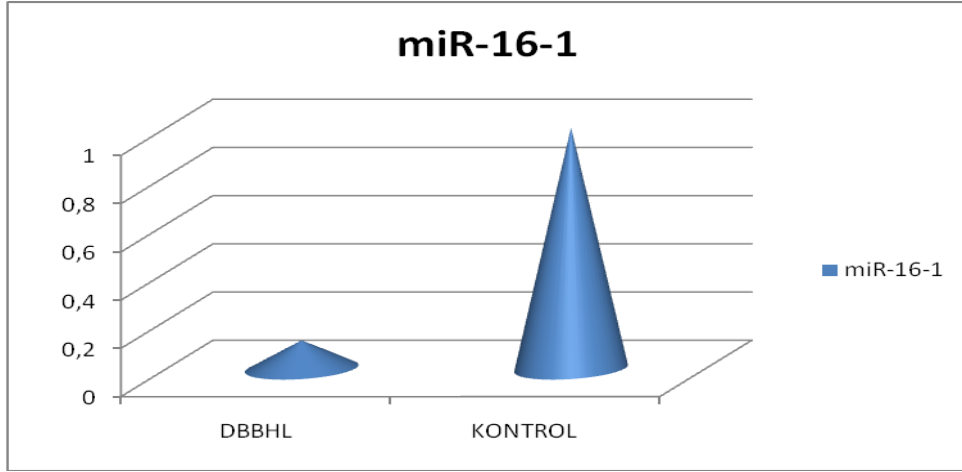
	miR-15a Hedef C_T	miR-15a Referans C_T	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
DBBHL	31, 8	22, 05	9, 75	0, 07	0, 95
KONTROL	30, 9	21, 22	9, 68	0	1

Tablo 4.7: miR-16-1 geni için hasta ve kontrol grubunda $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.

	miR-16-1 Hedef C_T	miR-16-1 Referans C_T	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
DBBHL	32, 12	22, 05	10, 07	3, 09	0, 117
KONTROL	30, 21	23, 23	6, 98	0	1



Şekil 4.7: Hasta ve kontrol grubunda miR-15a geni ifade düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.8: Hasta ve kontrol grubunda mir-16-1 geni ifade düzeylerinin karşılaştırılması.

Tablo 4.8 ve 4.9’da, çalışmaya alınan DBBHL hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasındaki yaş, miR-15a ve miR-16-1 genlerinin ifade düzeyleri ΔC_T değerleri kullanılarak ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleri belirtilmiştir. Çalışmada değerlendirilen grupların dağılımının normallik varsayımı ve standart sapmaların istatistiksel hesaplamalar için uygunluğunu anlamak üzere deneysel sonuçlar Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Bu test sonucu ortaya çıkan normallik dağılımları Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de gösterilmektedir.

Bu test sonucu miR-15a ve miR-16-1 genlerine ilişkin verilerin, normal dağılım gösterdiği ancak standart sapmalarının yüksek oluşu, çalışmada iki grubun karşılaştırılıyor olması nedeniyle verilerin çözümlemesinde nonparametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı (Tablo 4-12).

Mann-Whitney U Testi, iki grup verilerinden elde edilen değerlerin birbirlerinden anlamlı bir şekilde farklılık gösterip göstermediğini tespit eder.

Bu test iki grubun, ilgilenilen değişken bakımından evrende benzer dağılımlara sahip olup olmadığını test eden Mann-Whitney U testi, verilerin değersel olarak parametrik test varsayımlarını karşılamadığı durumlarda t testinin alternatifi olarak kullanılan en güçlü testlerden birisidir. Ayrıca söz konusu test kişi sayısının az olduğu durumlarda kullanılan bir testtir.

Tablo 4.8: Hasta ve kontrol grubunda yaş ile miR-15a hedef geni ile *LET-7* referans genine ait C_T değerlerinin ortalama, standart sapma, medyan minimum ve maksimum değerleri.

		Gruplar	
		Hasta	Kontrol
YAŞ	Ortalama	54, 63	52, 00
	Std.Sapma	15, 80	5, 18
	Geçerli N	40	15
	Medyan	53, 50	52, 00
	Minimum	18, 00	43, 00
	Maksimum	83, 00	61, 00
miR-15a Hedef Gen C_T	Ortalama	31,8066	30, 9109
	Standart Sapma	3, 3443	3, 2526
	Geçerli N	40	15
	Medyan	32, 9005	32, 0398
	Minimum	21, 8540	23, 8736
	Maksimum	36, 0702	34, 1048
miR-15a Referans Gen C_T	Ortalama	22, 0534	21, 2290
	Standart Sapma	3, 5787	4, 3630
	Geçerli N	40	15
	Medyan	23, 5209	23, 0922
	Minimum	13, 5100	11, 6944
	Maksimum	26, 7209	25, 0414
miR-15a ΔC_T (Hedef Gen C_T) – (ReferansGen C_T)	Ortalama	9, 7532	9, 6819
	Standart Sapma	4, 7803	4, 7108
	Geçerli N	40	15
	Medyan	9, 3254	9, 3767
	Minimum	, 1673	, 5174
	Maksimum	20, 6578	18, 1107

Tablo 4.9: Hasta ve kontrol grubunda miR-16-1 hedef geni ile *LET-7* referans genine ait C_T değerlerinin ortalama, standart sapma, medyan minimum ve maksimum değerleri.

		Gruplar	
		Hasta	Kontrol
miR-16-1 Hedef Gen C_T	Ortalama	32, 1230	30, 2135
	Standart Sapma	5, 0745	5, 1928
	Geçerli N	40	15
	Medyan	33, 7507	30, 6744
	Minimum	20, 2540	22, 3241
	Maksimum	40, 6294	40, 8163
miR-16-1 Referans Gen C_T	Ortalama	22, 0534	23, 2290
	Standart Sapma	3, 5787	1, 2932
	Geçerli N	40	15
	Medyan	23, 5209	23, 3562
	Minimum	13, 5100	19, 9149
	Maksimum	26, 7200	25, 0414
miR-16-1 ΔC_T (Hedef Gen C_T) – (ReferansGen C_T)	Ortalama	10, 0696	6, 9845
	Standart Sapma	5, 9003	6, 0512
	Geçerli N	40	15
	Medyan	10, 8132	8, 2534
	Minimum	-4, 2886	-2, 3134
	Maksimum	20, 3487	20, 9014

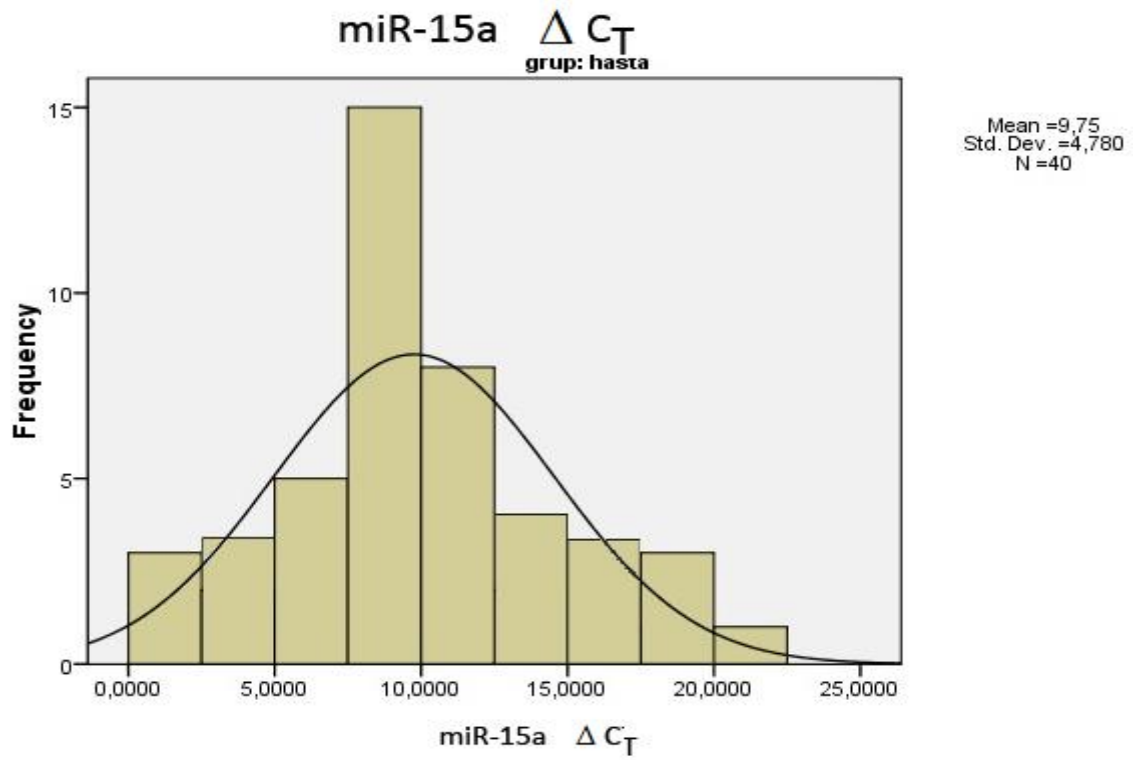
Tablo 4.10: Kolmogorov-Smirnov testi ile hasta ve kontrol grubunda miR-15a genine ait ΔC_T değerlerinin karşılaştırılması.

Gruplar			miR-15a ΔC_T
Hasta	Normal Parametreler ^{a, b}	Geçerli N	40
		Ortalama	9, 753183
		Standart Sapma	4, 7802612
	En Aşırı Farklar	Mutlak	, 141
		Pozitif	, 141
		Negatif	-, 075
		Kolmogorov-Smirnov Z	, 894
		Asymp. Sig. (2-tailed)	, 401

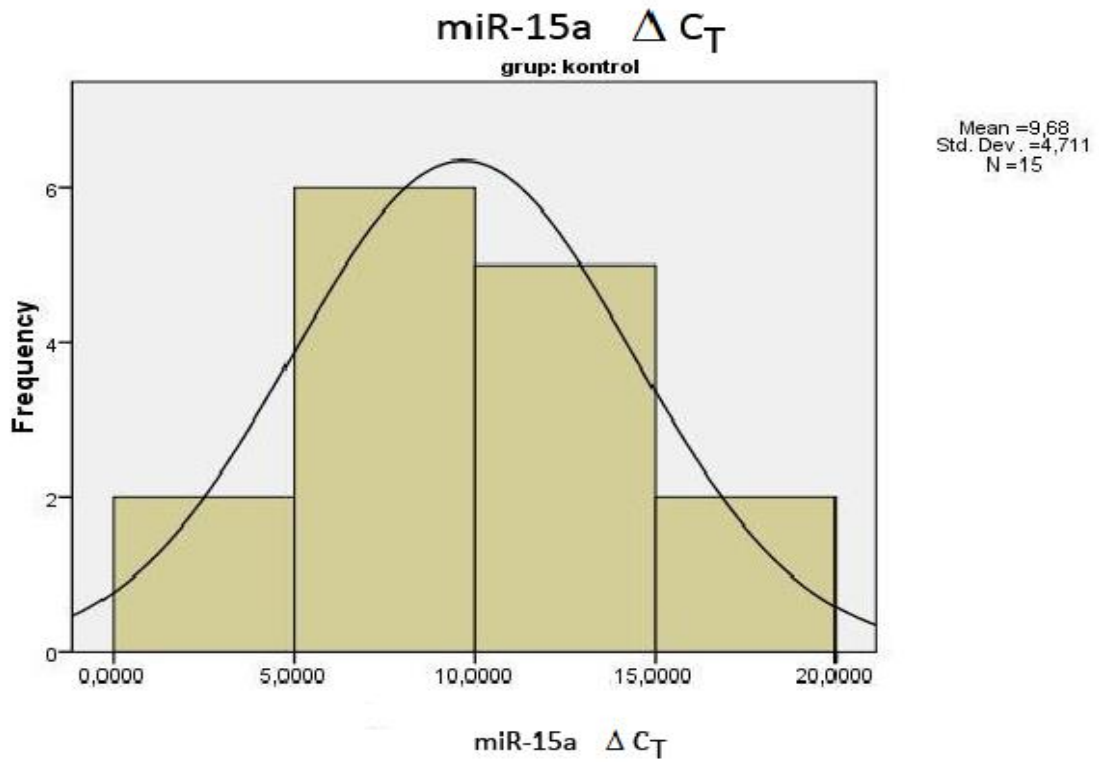
Kontrol	Normal Parametreler ^{a, , b}	Geçerli N	15
		Ortalama	9, 681946
		Standart Sapma	4, 7107611
	En Aşırı Farklar	Mutlak	, 119
		Pozitif	, 103
		Negatif	-, 119
		Kolmogorov-Smirnov Z	, 460
		Asymp. Sig. (2-tailed)	, 984

Tablo 4.11: Kolmogorov-Smirnov Testi ile hasta ve kontrol grubunda miR-16-1 genine ait ΔC_T değerlerinin karşılaştırılması.

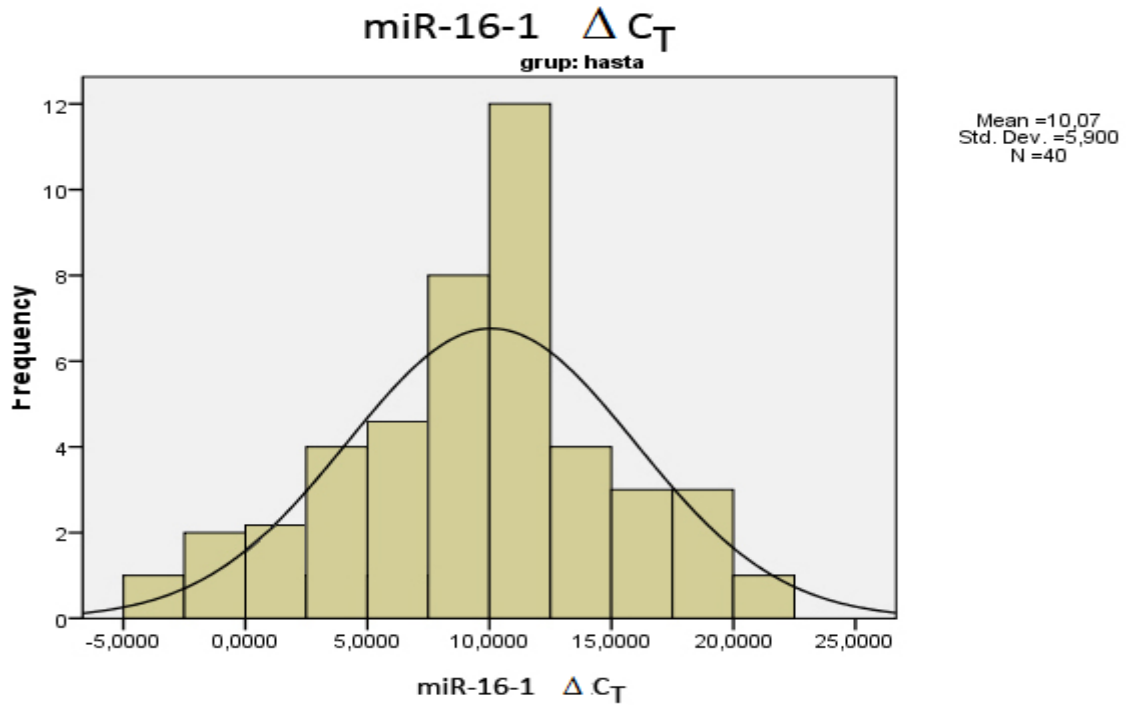
Kolmogorov-Smirnov Testi			
Gruplar			miR-16-1 ΔC_T
Hasta	Normal Parametreler ^{a, , b}	Geçerli N	40
		Ortalama	10, 069592
		Standart Sapma	5, 9002969
	En Aşırı Farklar	Mutlak	, 115
		Pozitif	, 084
		Negatif	-, 115
		Kolmogorov-Smirnov Z	, 728
		Asymp. Sig. (2-tailed)	, 665
Kontrol	Normal Parametreler ^{a, , b}	Geçerli N	15
		Ortalama	6, 984526
		Standart Sapma	6, 0511870
	En Aşırı Farklar	Mutlak	, 194
		Pozitif	, 194
		Negatif	-, 116
		Kolmogorov-Smirnov Z	, 752
		Asymp. Sig. (2-tailed)	, 623



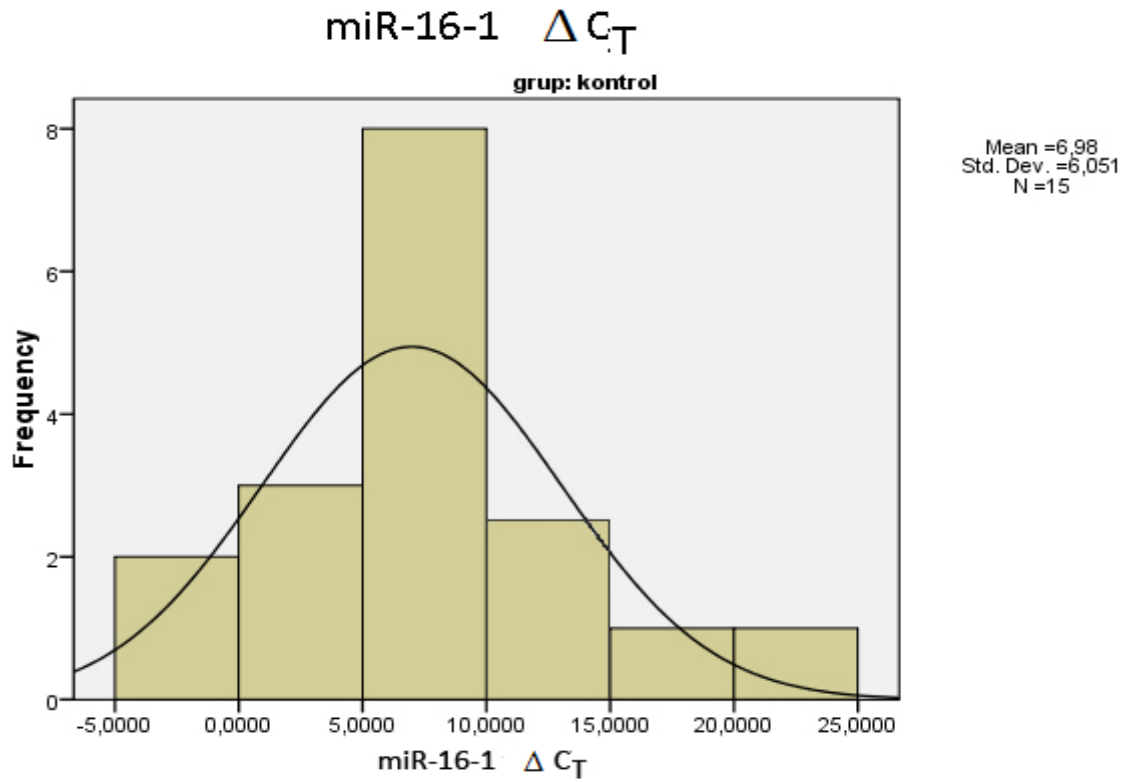
Şekil 4.9: Hasta grubundaki miR-15a geninin ifade düzeyine ilişkin ΔC_T dağılımı.



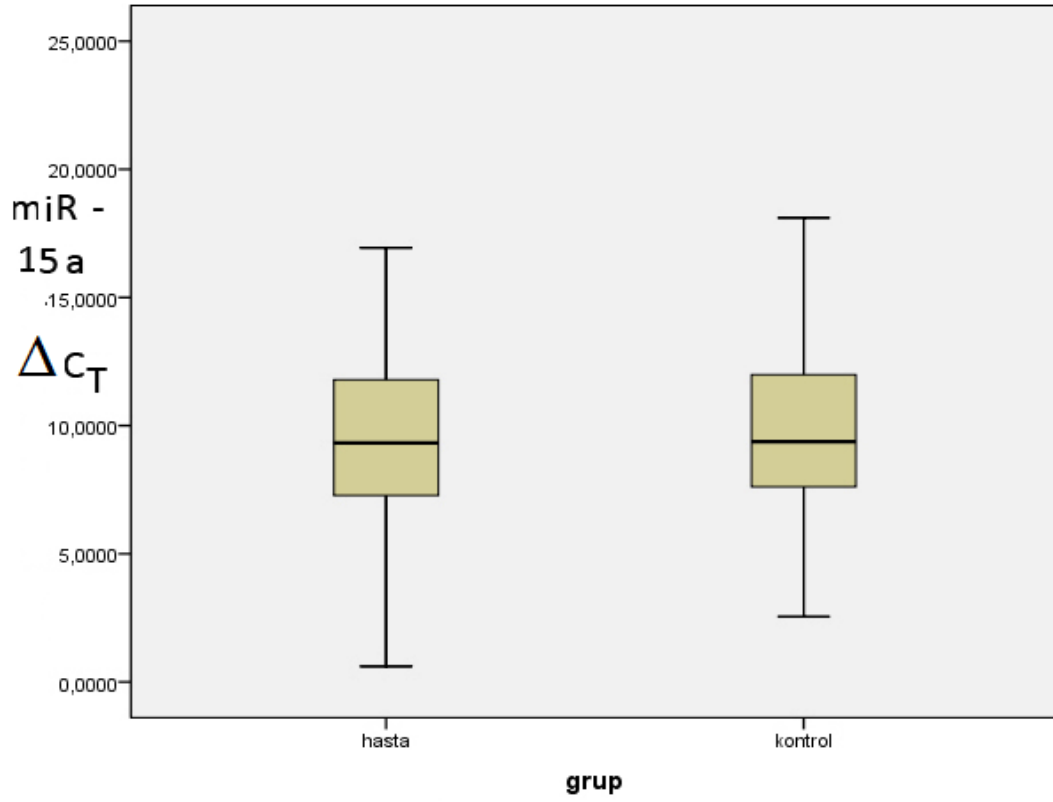
Şekil 4.10: Kontrol grubundaki miR-15a geninin ifade düzeyine ilişkin ΔC_T dağılımı.



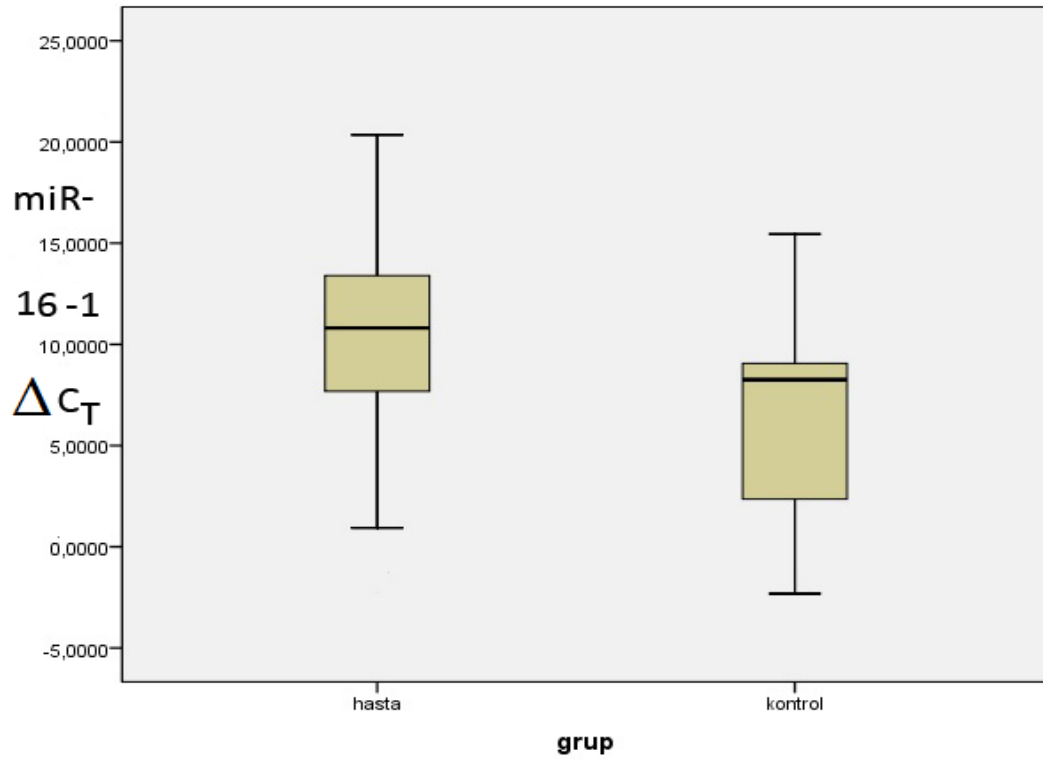
Şekil 4.11: Hasta grubundaki miR-16-1 geninin ifade düzeyine ilişkin ΔC_T dağılımı.



Şekil 4.12: Kontrol grubundaki miR-16-1 geninin ifade düzeyine ilişkin ΔC_T dağılımı.



Şekil 4.13: Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda miR-15a geni ifade düzeylerinin ΔC_T değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.14: Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda miR-16-1 geni ifade düzeylerinin ΔC_T değerlerinin karşılaştırılması.

Tablo 4.12: Mann-Whitney U Testi

	Gruplar	N	Ortalama Farkı	Ortalamalar Toplamı
miR-15a ΔC_T	Hasta	40	27, 83	1113, 00
	Kontrol	15	28, 47	427, 00
	Total	55		
miR-16-1 ΔC_T	Hasta	40	30, 68	1227, 00
	Kontrol	15	20, 87	313, 00
	Total	55		

Tablo 4.13: Test İstatistiği

TEST İSTATİSTİĞİ		
	miR-15a ΔC_T	miR-16-1 ΔC_T
Mann-Whitney U	293, 000	193, 000
Wilcoxon W	1113, 000	313, 000
Z	-, 132	-2, 022
Asymp. Sig. (2-tailed)	, 895	, 032

Çalışmamızda elde edilen verilerin çözümlenmesinde ve yorumlanmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Değerlendirmeler sonucunda miR-15a gen ifadesi düzeylerinin karşılaştırılmasında hasta ve kontrol grubu için çıkan p değeri 0,895 olup, $p < 0,05$ 'i yerine getirmediği için anlamlı bulunmamıştır. miR-16-1 gen ifadesi düzeylerinin karşılaştırılmasında hasta ve kontrol grubu için çıkan değer $p = 0,032$ olarak bulunmuş ve gen ifade düzeylerindeki değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Hodgkin Dışı Lenfomalar tüm kanserlerin % 2,8'ini oluşturmaktadır. HDL, erkeklerde %6,1 görülme sıklığı ve %3,5 ölüm oranı; kadınlarda ise %4 görülme sıklığı ve %2,3 ölüm oranı ile 6.sırada yer alan, milyonda 50 sıklıkla görülen bir kanser türüdür [3]. Son yıllarda hızla gelişen ve yaygınlaşan laboratuvar incelemelerinin yardımıyla lenfoma konusunda da oldukça önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Morfolojik, immunofenotipik, sitogenetik ve özellikle de klinik ve prognostik özelliklerine göre 30'a yakın alt grup tanımlanmıştır. Bu alt gruplar arasında, en önemlilerinden biri Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomadır (DBBHL) [5].

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalar (DBBHL) agresif lenfomaların prototipidir. Genel olarak lenfomalar tüm sistemik kanserler içinde altıncı sırada yer alırken bunların yaklaşık %30 ile 40'ını DBBHL'lar oluşturmaktadır. DBBHL'lar agresif lenfoma grubunun ise %80'inden fazlasını oluşturmaktadır [5].

MikroRNA(miRNA)'lar 21-23 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli, proteine dönüştürülmeyen RNA molekülleridir [7-8]. miRNA'lar, mRNA üzerinde genellikle 3'UTR ('Untranslated Region) bölgeye ve çok nadir olarak da 5'UTR'ye bağlanmaktadır. miRNA'nın ilgili bölgeye bağlanması, mRNA çeviriminin düzenlenmesine ve dolayısıyla mRNA'nın yıkımına neden olmaktadır [9-10]. miRNA'lar onkogenlerin ifadesini inhibe ederek tümör baskılayıcı etki, tümör baskılayıcı genleri susturarak onkogenik etki oluşturabilmektedirler [11-12].

İnsan miRNA genlerinin çoğu kromozomlar üzerindeki kırılgan bölgelerde (fragile sides) yer almaktadır. Bu kırılgan bölgelerin ve dolayısıyla bu noktalarda bulunan miRNA genlerinin kanserle ilişkili olduğu bilinmektedir. miRNA'lar ile kanser arasındaki etkileşim ilk olarak Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarında bildirilmiş ve bu hastaların çoğunda miR-15a ve miR-16-1 ifadesinin çok düşük veya hiç olmadığı gösterilmiştir [13].

Aqeilan ve ark.'ın yaptıkları çalışmada miR-15a/16-1 miRNA'larının aşırı ifadelerinin hücre proliferasyonunu inhibe ederek kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü böylece hem in vitro hem de in vivo şartlarda tümör oluşumunu engellediği gösterilmiştir [55].

BCL2, *MCL1*, *CCND1* ve *WNT3A* gibi birçok onkogenin fonksiyonunun miR-15a ve miR-16-1 genleri ile düzenlendiği belirtilmiş ve söz konusu miRNA'ların ifadesinin azalması KLL, hipofiz adenomları ve prostat kanserinde rapor edilmiştir [55].

Bottoni ve ark.'ın yaptıkları çalışmada ise miR-15a ve miR-16-1'in hipofiz adenomlarında normal hipofiz dokularına kıyasla daha düşük seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu bilgi miR-15a ve miR-16-1'in tümör baskılayıcı bir role sahip olduğunu ve allelik kayıpla miR-15a ve miR-16-1'in inaktivasyonunun tümör oluşumuna yol açabileceği hipotezini doğrulamaktadır [61].

2012 yılında yapılan yine bir başka çalışmada Rivas ve ark. aşırı progestin verilen ve progesteron reseptörü (PR) susturulmuş meme kanseri hücre hatlarında miRNA ifade düzeylerini incelemişlerdir. Daha önce lösemilerde tümör baskılayıcı fonksiyonu olduğu gösterilen miR-16 geninin ekspresyon düzeyine bakılmıştır. Bu çalışmada aşırı progestin ve büyüme faktörleri verilen hücre hatlarında miR-16'nın ifade düzeyinin azaldığı bunun da progesteron reseptör vasıtasıyla sinyal indükleyici ve yazılımı aktifleştirici STAT3 ve onkogenik yazılım faktörü c-myc arasında karşılıklı bir etkileşime neden olduğu vurgulanmıştır. miR-16 hedeflerinin araştırılması sonucunda hücre döngüsünün düzenleyicisi siklin E1 (*CCNE1*) geninin 3'UTR bölgesinde korunmuş miR-16 gen bölgesi içerdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da buna çok benzer olan bir moleküler mekanizma ile progestinin miR-16 ifade düzeyini değiştirebileceği savunulmuştur. Progestin, STAT3 ve c-myc'in de etkisiyle siklin E1 ifadesini tetiklemektedir. Sonuç olarak progestin ile artan siklin E1 ifadesini miR-16'nın ekspresyonu engellemektedir. Bu durum siklin E1'in ve dolayısıyla miR-16 geninin meme kanserinde yeni bir hedef olabileceğini göstermektedir. miR-16 geninin aşırı ekspresyonunun progestin etkili meme tümörü oluşumunda tedavi amaçlı olarak kullanılabileceğini ve meme kanserinde de miR-16'nın tümör baskılayıcı olarak görev alabileceğini göstermektedir [66].

2012 yılında yapılan bir başka çalışmada ise Dai ve ark. miR-15a/16-1 genlerinin daha önce yapılan çalışmalarda tümör gelişimindeki önemli rolü olduğuna ilişkin bulgulara dayanarak bu genlerin kanser tedavisinde bir tedavi metodu olabileceğini düşünmüşler ve vektör tabanlı bir plazmid ile miR-15a/16-1'nin kolon kanserinde anti tümör etkinliğini araştırmışlardır. Yaşam ve proliferasyon gibi birçok tümörjenik karakterle ilişkili olan siklin B1'in (*CCNB1*), miR-15a ve miR-16-1'in

hedefi olduğunu ve bu ilişkiyi kanıtlayan bulgunun ise kolon kanserinde miR-15a/16-1'in ifade düzeylerinin siklin B1 ile ters orantılı oluşu ile kanıtlamışlardır. Çalışma sonunda siklin B1 mRNA dizisi ile miR-15a/16-1 arasında homoloji bulunmuştur. Sonuç itibari ile miR-15a/16-1 genlerinin kolon kanser tedavisinde önemli bir yaklaşım olabileceğini kanıtlanmıştır [67].

Zerdeçal olarak bilinen hint safranında bulunan bir pigment olan kurkumin'in lösemik hücrelerde Wilms' tümör geni 1 (*WT1*) ifadesini düşürdüğü rapor edilmesinden sonra Gao ve ark. Bu konuda daha ileri araştırmalar yapmışlardır. *WT1* gen ifadesinin kurkumin ile düşmesinin moleküler mekanizmasının anlaşılması ve buna bağlı olarak yeni miRNA tabanlı tedavi mekanizmalarının geliştirilmesi amacıyla planlanan çalışmada 24 ve 48 saat olmak üzere farklı zaman dilimlerinde kurkumin verilen K562 ve HL-60 lösemik hücre hatlarında miR-15a/16-1 ve *WT1* ifade düzeyleri incelenmiştir. Kurkumin'in lösemik hücre hatlarında miR-15a ve mir-16-1 genlerinin ifadelerini arttırdığı, *WT1* geninin ifade düzeyini ise düşürdüğü bulunmuştur. Kurkumin'nin lösemik hücrelerde çoğalmayı engelleyici etkisinin miR-15a ve miR-16-1 aracılığıyla *WT1* geninin ifadesinin düşürülmesi yoluyla olduğu bildirilmiştir [68].

Yine 2012 yılında yapılan bir başka çalışmada Jiao ve ark. miRNA gen ifade profillerini iyi huylu pankreatik kistik tümörler (BCT) ile düşük ya da yüksek habis potansiyele sahip pankreatik duktal adenokarsinomlarla (PDAC) karşılaştırmışlardır. Bu iki tip tümörün karşılaştırılmasında miRNA'ların PDAC tümörlerinde çok daha az ifade edildiği gösterilmiştir. Yüksek oranda ifadesi düşen miRNA'lar arasında miR-16 geni de yer almaktadır [69].

An ve ark. [70] ise yüksek mortaliteye sahip olan ve hala nedeni bilinmeyen akut karaciğer yetmezliğinin (AKY) moleküler mekanizmasında miRNA'ların rolünün olup olmadığını araştıran çalışmalarında 26 farklı miRNA'nın ifadesinin düştüğünü ve en yüksek oranda ifade kaybının ise miR-15b ve miR-16'da olduğunu göstermişlerdir. Düşük miR-15b ve miR-16 ekspresyonu bulunan hastalarda hepatosit apoptozunun bcl-2 yoluyla tümör nekroz faktör (TNF) tarafından kontrol edildiği belirtilmiştir. Bu durum AKY tedavisi için miR-15b ve miR-16'nın terapötik yöntem olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Xu ve ark. 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada meme karsinomunda bir RNA bağlayıcı protein olan HVR'nin ifadesinin miR-16 ile ilişkili olduğunu

vurgulamışlardır. miR-16 ifadesinin azaldığı kanserlerde HVR düzeyinin arttığı ve dolayısıyla miR-16'nin yazılım sonrası düzenleyici rolü olduğu belirtilmiştir [71].

Li ve ark. hematolojik malinitelerde bir biyobelirteç olan STAT5'in (transkripsiyon aktivatör) miR-15/16'yı baskıladığını göstermişlerdir. Bu baskılamanın anti apoptotik gen olan *BCL-2*'nin düzeyini etkilediği bildirilmiştir [72].

Chiorazzi ve ark. ise KLL'li hastalarda miR-15a ve miR-16-1 genlerinin lokalize olduğu 13. kromozomun uzun kolunun (13q14.3) heterozigot ve homozigot delesyona uğraması sebebiyle söz konusu miRNA'ların ifadelerinin azalmış ya da tamamen ortadan kalkmış olacağını bildirmişlerdir [53].

Ayrıca 2012 yılında Mian ve ark.'ın yaptıkları genom DNA tipleme çalışmasında DBBHL'lı 166 olgunun 22'sinde kromozomun 13q14.3 bölgesinde DLEU2/miR-15A/miR16'nın silinmiş olduğu bildirilmiştir. Bu 22 olgunun 19'unda da delesyon bölgesinin hayli büyük olduğu ve hatta bu kaybolan bölgenin Retinoblastoma 1(RB1) genini de içerdiği gösterilmiştir. Yine bu çalışmada 172 farklı transkriptin ifade düzeylerinin farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak kromozomun 13q14.3 bölgesindeki delesyonların DBBHL patogenizinde RB1 geninin kaybı ile hücre döngüsünün kontrolünün etkisizleşmesi veya ölüm indükleyici sinyal kompleksini oluşturan ve apoptoza yardımcı olan FAS reseptörünün ifadesinin azalması ile immün sistemden kaçış olmak üzere iki farklı yolun rolü olabileceği bildirilmiştir [63].

miR-15a ve miR-16-1 genlerine ait ifade kaybının hatta yokluğunun KLL etiyolojisi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [13]. Köken aldıkları hücre göz önünde bulundurulduğunda KLL'ler gibi CD19⁺ ve CD20⁺ hücrelerden köken alan DBBHL'larda da miR-15a ve miR-16-1 gen ifade kayıplarının benzer olabileceği düşünülmüş ve o ana kadar literatürde bir bilgi olmaması sebebiyle bu tez çalışması planlanmıştır.

Çalışmamızda KLL'li hastaların aksine, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında diffuz büyük B-hücreli lenfomalı hastalarda miR-15a geninin ifade düzeyinde herhangi bir fark görülmezken ($2^{-\Delta\Delta C_T}$: 0,95), miR-16-1 geninin ifade düzeyinin KLL'ye benzer şekilde yaklaşık 8,54 oranında azaldığı saptanmıştır ($2^{-\Delta\Delta C_T}$: 0,117).

Bulgular bizim çalışma grubumuzdaki DBBHL hastalarda miR-16-1 geninin baskılandığını ancak diğer çalışmalarda olduğu gibi tamamen yok olmadığını göstermiştir. Bu durum DBBHL da miR-16-1'in tümör baskılayıcı rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bugüne kadar miR-16-1 geninin genellikle kayıp kromozom bölgeleri ile ilişkilendirilmiş olması ve anlatımının buna bağlı olarak yorumlanması hala bu genin gerçek hedef geninin ne olduğu konusunu açıklığa kavuşturamamıştır.

Çalışmamızda miR-16-1 geninin ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre 8,54 oranında azaldığı ama yok olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle bizim hasta grubumuzda söz konusu miR-16-1 gen ekspresyonunun kromozom bölge delesyonu ile ilişkili olmadığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Lichtman M, *The Non-Hodgkin Lymphomas*. 7th ed. New York: Williams Hematology McGraw-Hill Book Company; 2005.
2. Weisenburger DD. Pathological classification of non-Hodgkin's lymphoma for epidemiological studies. *Cancer Res.*1992;**52**:5456-5462.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007;**57**:43-66.
4. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010.
5. Kumar V , Fausto N, A A, *Pathologic Basis of Disease*. 7 ed: Robbins Pathology; 2005.
6. Vose JM, Chiu BC, Cheson BD, Dancey J, Wright J. Update on epidemiology and therapeutics for non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2002:241-262.
7. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.*2005;**120**:15-20.
8. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet.* 2006;**38** :8-13.
9. Bagga S, Bracht J, Hunter S, ve ark. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell.* 2005;**122**:553-563.
10. Patz M, Pallasch CP, Wendtner CM. Critical role of microRNAs in chronic lymphocytic leukemia: overexpression of the oncogene PLAG1 by deregulated miRNAs. *Leuk Lymphoma.*2010;**51**:1379-1381.
11. Hanlon K, Rudin CE, Harries LW. Investigating the targets of MIR-15a and MIR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *PLoS One.* 2009;**4**:7169.
12. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science.*2007;**315**:1576-1579.
13. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, ve ark. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2002;**99**:15524-15529.
14. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 2008;**455**:58-63.
15. Abbas AK, Lichtman AH, JS P, *Cellular and molecular immunology*. 4 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000.
16. Abraham Kierszenbaum MD, Ph.D., Laura Tres MD, Ph.D., eds. *Histology and Cell Biology*. 2 ed 2006.
17. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, ve ark. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia,1997. *Hematol J.* 2000;**1**:53-66.
18. Knowles DM, *Neoplastic Hematopathology* 2ed. Philadelphia: A Wolters Company; 2001.

19. McClure RF, Remstein ED, Macon WR, ve ark. Adult B-cell lymphomas with burkitt-like morphology are phenotypically and genotypically heterogeneous with aggressive clinical behavior. *Am J Surg Pathol*.2005;**29**:1652-1660.
20. Greer JP,WM, *Non-Hodgkin lymphoma in adults*. 12 ed. Philadelphia: Wintrobe's Clinical Hematology; 2009; No. 2.
21. Clarke CA, Glaser SL. Epidemiologic trends in HIV-associated lymphomas. *Curr Opin Oncol*.2001;**13**:354-359.
22. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J. Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Ann Oncol*. 2000;**11**:3-10.
23. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*.1998;**16**:2780-2795.
24. Groves FD, Linet MS, Travis LB, Devesa SS. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *J Natl Cancer Inst*.2000;**92**:1240-1251.
25. Jaffe ES, Pittaluga S. Aggressive B-Cell Lymphomas: A Review of New and Old Entities in the WHO Classification. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;**2011**:506-514.
26. Moller MB, Pedersen NT, Christensen BE. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal versus nodal presentation--a population-based study of 1575 cases. *Br J Haematol*. 2004;**124**:151-159.
27. Ansell SM, Armitage J. Non-Hodgkin lymphoma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*.2005;**80**:1087-1097.
28. Said J. Diffuse aggressive B-cell lymphomas. *Adv Anat Pathol*. 2009;**16**:216-235.
29. Dominis M, Dzebro S, Gasparov S, Pesut A, Kusec R. Diffuse large B-cell lymphoma and its variants. *Croat Med J*.2002;**43**:535-540.
30. Friedberg JW, Fisher RI. Diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*.2008;**22**:941-952, ix.
31. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, ve ark. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;**101**:78-84.
32. Kennedy GA, Cull G, Gill D, Marlton P, Norris D, Cobcroft R. Identification of tumours with the CD43 only phenotype during the investigation of suspected lymphoma: a heterogeneous group not necessarily of T cell origin. *Pathology*. 2002;**34**:46-50.
33. Fisher RI, Miller TP, O'Connor OA. Diffuse aggressive lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:221-236.
34. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;**75**:843-854.
35. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs:*Nat Rev Genet*.2008;**9**:102-114.
36. Grosshans H, Filipowicz W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature*.2008;**451**:414-416.
37. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet*.2006;**22**:165-173.
38. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome*.2006;**17**:189-202.

39. Sumariyono, Wijaya LK, S B, Tobing DA. Osteoarticular tuberculosis. *Acta Med Indones.* 2005;**37**:230.
40. Di Leva G, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2006;**78**:180-189.
41. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA.* 2005;**11**:1753-1761.
42. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, ve ark. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;**102**:13944-13949.
43. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006;**6**:857-866.
44. He L, Thomson JM, Hemann MT, ve ark. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.*2005;**435**:828-833.
45. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.*2005;**435**:839-843.
46. Lu J, Getz G, Miska EA, ve ark. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.*2005;**435**:834-838.
47. Yang J, Zhou F, Xu T, ve ark. Analysis of sequence variations in 59 microRNAs in hepatocellular carcinomas. *Mutat Res.*2008;**638**:205-209.
48. Hammond SM. RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemother Pharmacol.*2006:63-68.
49. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS.* 2007;**115**:1090-1106.
50. Zhang L, Huang J, Yang N, ve ark. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;**103**:9136-9141.
51. Georges M, Coppieters W, Charlier C. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Curr Opin Genet Dev.*2007;**17**:166-176.
52. Wu M, Jolicoeur N, Li Z, ve ark. Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis.* 2008;**29**:1710-1716.
53. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, ve ark. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med.* 2005;**353**:1793-1801.
54. Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, Negrini M, Calin GA. Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer. *Expert Opin Biol Ther.*2007;**7**:1009-1019.
55. Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ.* 2010;**17**:215-220.
56. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.*2005;**352**:804-815.
57. Dong JT, Boyd JC, Frierson HF, Jr. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate.* 2001;**49**:166-171.
58. Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol.*2006;**33**:167-173.
59. Nicoloso MS, Kipps TJ, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.*2007;**139**:709-716.
60. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, ve ark. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med.* 2008;**14**:1271-1277.

61. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol.* 2005;**204**:280-285.
62. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;**144**:646-674.
63. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle.* 2008;**7**:2643-2646.
64. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer.* 2008;**122**:969-977.
65. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res.* 2006;**66**:7390-7394.
66. Rivas MA, Venturutti L, Huang YW, Schillaci R, Huang TH, Elizalde PV. Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progestin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast Cancer Res.* May 14 2012;**14**.
67. Dai L, Wang W, Zhang S, ve ark. Vector-based miR-15a/16-1 plasmid inhibits colon cancer growth in vivo. *Cell Biol Int.* 2012.
68. Gao SM, Yang JJ, Chen CQ, ve ark. Pure curcumin decreases the expression of WT1 by upregulation of miR-15a and miR-16-1 in leukemic cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;**31**.
69. Jiao LR, Frampton AE, Jacob J, ve ark. MicroRNAs targeting oncogenes are down-regulated in pancreatic malignant transformation from benign tumors. *PLoS One.* 2012;**7**.
70. An F, Gong B, Wang H, ve ark. miR-15b and miR-16 regulate TNF mediated hepatocyte apoptosis via BCL2 in acute liver failure. *Apoptosis.* Feb 29 2012.
71. Xu F, Zhang X, Lei Y, ve ark. Loss of repression of HuR translation by miR-16 may be responsible for the elevation of HuR in human breast carcinoma. *J Cell Biochem.* 2010;**111**:727-734.
72. Li G, Miskimen KL, Wang Z, ve ark. STAT5 requires the N-domain for suppression of miR15/16, induction of bcl-2, and survival signaling in myeloproliferative disease. *Blood.* 2010;**115**:1416-1424.

FORMLAR

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME VE ONAY FORMU

ÇALIŞMANIN ADI:

B-Hücreli Hodgkin Dışı Lenfomalı Hastalarda miR-15a/miR-16-1 Genlerinin İfade Düzeylerinin Araştırılması

ÇALIŞMANIN AMACI:

Özellikle B-hücreli lenfoma ve Kronik Lenfositik Lösemiler CD19+ ve CD20+ B lenfositlerinden köken almaktadırlar. Daha önce CD19+ KLL'lerde yapılan çalışmalarda 26 farklı miRNA'nın deregülasyonu bildirilmiştir. Bu konu ile ilgili, B-hücreli lenfomaları kapsayan literatürde henüz bir bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda B- hücreli Hodgkin dışı lenfomalı hastalarda öncelikle iki farklı miRNA miR-15a ve miR-16-1 gen ifade düzeyleri, alınabildiği takdirde hastalara ait kemik iliği ile serum ve/veya lenfositlerinden ayrıştırılan RNA'larda araştırılacaktır.

ÇALIŞMANIN İÇERİĞİ:

Deney grubumuzun yeni tanı almış daha önce hiç tedavi görmemiş 40 B-hücreli Hodgkin dışı lenfomalı hasta ile 15 sağlıklı kontrolü kapsamı hedeflenmektedir. Hastalardan ve sağlıklı kontrol grubundan alınan periferik kan ve/veya serum örneklerinden RNA izole edilecektir. Elde edilen RNA'lardan özel primerler aracılığı ile cDNA sentezi gerçekleştirilecektir. Sentezlenen özel cDNA'ler istediğimiz miRNA'lara özgü primer ve problarla ve bir kontrol gen varlığında gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulacak ve miRNA gen ifade düzeyleri değerlendirilecektir.

ÇALIŞMANIN BAŞLAMA TARİHİ VE SÜRESİ:

Çalışmanın Nisan 2011'de başlaması ve 1 yıl sürmesi öngörülmektedir.

ACIKLAMALAR:

Bu çalışmaya gönüllü olmaya karar verirsiniz bu gönüllü bilgilendirilmiş onay formunu imzalamanız gerekecektir. Sadece kendi rızanız ile hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, doktor kontrolünde alınacak kan ve doku örneğiniz ile bilimsel çalışmaya katılmış olacaksınız. Sizden ayrıca araştırmaya yardımcı olacak bazı kişisel bilgileriniz (yaş, meslek, sigara kullanımı vs.) istenebilir. Etik kurullar inceleme amacıyla medikal kayıtlardaki medikal kişisel bilgilerinize ve bu çalışmadan elde edilen bilgilere erişebilirler. Medikal bilgilerinize erişim çalışma için toplanan bilgilerle sınırlı olacaktır. Bu çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılarda veya yayınlarda sunulabilir, ancak bu sunumlarda kimliğiniz açıklanmayacaktır. Ayrıca sizden araştırmayla ilgili olarak herhangi bir maddi talepte bulunulmayacak ve size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Ayrıca bu araştırmaya karar verdiğiniz takdirde ileriye dönük olarak hastalığınız hakkında elde edilecek bilgilerle bilim dünyasına konuyla ilgili olarak önemli derecede katkı sağlayacağınız kesindir. Gönüllü olmaya karar verdiğiniz ve bu bilgilendirilmiş gönüllü onay ve rıza formunu imzaladığınız taktirde yukarıda yazılanları okuyup kabul ettiğinizi ve hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın ailenizin bilgisi dahilinde sadece kendi rızanız ile karar verdiğinizi onaylamış olacaksınız.

Herhangi bir soru yada sorunuz olduğu taktirde ilgili Şeref BUĞRA TUNÇER'e 0212 414 24 34 / 34186 no'lu telefondan ulaşabilirsiniz.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Gönüllüye (hastaya) araştırmadan önce verilmesi gereken bilgiler tarafıma sözlü ve yazılı olarak aktarıldı. Bu koşullarda söz konusu çalışmaya kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Çalışma için alınan materyalimin ilerideki çalışmalarda da kullanılmasını

EVET ☐ Kabul ediyorum.

HAYIR ☐ Kabul etmiyorum.

Hastanın:

Adı Soyadı:

Telefonu:

Adresi:

İmza:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının:

Adı Soyadı:

İmza:

Tanıklık Eden Görevlinin:

Adı Soyadı:

İmza:

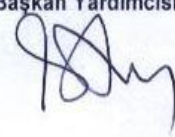
HASTA TAKİP FORMU**PROJE ADI:**

B-Hücreli Hodgkin Dışı Lenfomada miR-15a/miR-16-1 Genlerinin İfade Düzeylerinin
Araştırılması

HASTA İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

TARİH:	
AD VE SOYAD:	
T.C. KİMLİK NO:	
DOĞUM TARİHİ:	
ADRES VE TELEFON:	
AİLEDE LENFOMA VEYA DİĞER KANSER TİPİ ÖYKÜSÜ:	

ETİK KURUL KARARI

	T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
Sayı :585		Tarih : 14.03.2011
Konu : Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK hk,		
Sayın Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK Onkoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi İlgi :11.01.2011 tarihli 78 sayılı yazınız		
Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yük. Lis. Öğr. Şeref Buğra TUNCER'in yürüteceği 2011/507-498 "B-Hücreli Non Hodgkin Lenfomada miR-15a/miR-16-1 Genlerinin İfade Düzeylerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 04.03.2011 tarihli 05 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur. Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.		
Prof. Dr. Berrin UMMAN İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkan Yardımcısı 		
Eki: Tutanak		

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	X	
	SİGORTA		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ		
	İLAN		
	YILLIK BİLDİRİM		
	SONUÇ RAPORU		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		
	DİĞER		Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 05	Tarih : 04.03.2011
	Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK ve Yük. Lis. Öğr. Şeref Buğra TUNCER'in koordinatörlüğü ve sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen tez başvuru dosyası ve araştırma ile ilgili belgeler gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplanıya katılan etik kurul üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	İstanbul Üniversitesi İnsan Denekler Üzerinde Yürütülecek Bilimsel Araştırmalar ve Etik Değerlendirme Kurulları Yönergesi, 10 Aralık 2010 tarihli T.C. Sağlık Bakanlığı İyi Klinik Uygulamaları Klavuzu
---------------	---

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN

ETİK KURUL ÜYELERİ

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	EX	K	E	H X	E	H X	İznil
Prof.Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E	K X	E	H X	EX	H	
Prof.Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	EX	K	E	H X	EX	H	
Prof.Dr. Rukiye EKER ÖMEROĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İstanbul Tıp Fakültesi	E	K X	E	H X	EX	H	
Prof.Dr. Oğuzhan COBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	EX	K	E	H X	EX	H	
Prof.Dr. Pınar SAİP	Onkoloji	İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü	E	K X	E	H X	EX	H	
Uzm.Dr. Ahmet Rıza URAS	Biyokimya	Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araş.Hast.Biyokimya	EX	K	E	H X	E	H X	T.Katılmadı
Doç.Dr. H. Hanzade DOĞAN	Deontoloji	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	K X	E	H X	E	H X	T.Katılmadı
Prof. Dr. Aysen BULUT	Halk Sağlığı	Emekli	E	K X	E	H X	EX	H	
Doç. Dr. Tufan TÜKEK	İç Hastalıkları	Okmeydanı Eğitim ve Araş.Hast.İç Hast.İ.Dahiliye Kliniği	EX	K	E	H X	EX	H	
Prof. Dr. Ünal KUZGUN	Ortopedi	Şişli Etfal E. ve Ars. Hast.	EX	K	E	H X	E	H X	T.Katılmadı
Prof. Dr. Ahmet O. ARAMAN	Eczacılık	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi	EX	K	E	H X	E	H X	T.Katılmadı
Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK	Hukukçu	İstanbul Üniversitesi	E	K X	E	H X	EX	H	
Prof.Dr. Demir TIRYAKI	Biyofizik	Emekli	EX	K	E	H X	E	H X	T.Katılmadı
M. Kerim AKMAN	İİBF İktisat bölümü	Özel (Ekonomist)	EX	K	E	H X	EX	H	

* :Araştırma ile İlgili

** :Toplantıda Bulunma

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Hulusi Behçet Kütüphanesi Kat 3 Çapa Fatih/İstanbul 34380
TELEFON	0 212 414 20 00-313 46
FAKS	0 212 414 21 53
E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	B-Hücreli Non Hodgkin Lenfomada miR-15a/miR-16-1 Genlerinin İfade Düzeylerinin Araştırılması		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	-		
	EUDRACT NUMARASI	-		
	SORUMLU / YARDIMCI ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK		
	SORUMLU / YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Onkoloji		
	KOORDİNATÖRÜN UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK		
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	Onkoloji		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı		
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ	AKADEMİK AMAÇLI (X)	
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1		
		FAZ 2		
		FAZ 3		
		FAZ 4		
		BE/BY		
		DİĞER	Diğer ise belirtiniz:	
		İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA (X)	Belirtiniz:	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ (X)	ÇOK MERKEZLİ	ULUSAL ULUSLARARASI

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	03.03.2011	1	TürkçeX	İngilizce	Diğer
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-	-	Türkçe	İngilizce	Diğer
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	03.03.2011	1	Türkçe X	İngilizce	Diğer
	OLGU RAPOR FORMU	-	-	Türkçe	İngilizce	Diğer

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şeref Buğra	Soyadı	Tunçer
Doğ. Yeri	İstanbul	Doğ. Tar.	09.10.1986
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	22559770692
Email	tuncerbugra@gmail.com	Tel	506 988 20 33

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	H.Ü. Fen-Edb. Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2008
Lise	Üsküdar Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	60	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	74	79	82
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

