



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TESTİS GERM HÜCRE TÜMÖRLÜ HASTALARDA KEMOTERAPİNİN İMMÜN YAŞLANMADAKİ ROLÜ

Tutku ÜNVER

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Yüksel ÜRÜN

ANKARA

2020

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TESTİS GERM HÜCRE TÜMÖRLÜ HASTALARDA
KEMOTERAPİNİN İMMÜN YAŞLANMADAKİ ROLÜ**

Tutku ÜNVER

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Yüksel ÜRÜN

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğünce
BAP-20L0230001 proje numarasıyla ve Türk Onkoloji Grubu Derneği
tarafından desteklenmiştir.**

ANKARA

2020

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Testis Germ Hücre Tümörlü Hastalarda Kemoterapinin İmmün Yaşlanmadaki Rolü” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Tutku ÜNVER

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalında
Tutku Ünver tarafından hazırlanan “Testis Germ Hücre Tümörlü Hastalarda
Kemoterapinin İmmün Yaşlanmadaki Rolü” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri
tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile
kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 27.01.2020

İmza

Prof. Dr. Hakan AKBULUT

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Doç. Dr. Yüksel ÜRÜN

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza

Doç. Dr. Mehmet Ali ŞENDUR

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Üye

Tez Hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	iv
Simgeler Ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii

1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.2. Testis Kanseri İnsidansı ve Sağkalım	2
1.3. Testis Germ Hücre Tümörü	2
1.4. Testis Germ Hücre Tümörü Tedavisi	4
1.5. Moleküler Yaşlanma	6
1.6. Programlı Yaşlanma Teorileri	6
1.7. Moleküler Yaşlanma ve Kanser	10
1.8. Senesans ve Kemoterapi	10
1.9. İmmün Sistem ve Hücrel Yaşlanma	11
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Hasta Seçim Kriterleri	16
2.2. Gereçler	17
2.2.1. Kullanılan Kimyasallar	17
2.2.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	17
2.2.3. Kullanılan Kitler	18
2.2.4. Kullanılan Yazılımlar ve Veritabanları	18
2.3. Yöntem	19
2.3.1. Solüsyonların Hazırlanışı	19
2.3.2. Primer tasarımı	19

2.3.3. Moleküler Deneyler	20
2.3.3.1. Kandan Lenfosit İzolasyonu	20
2.3.3.2. Lenfositlerden RNA İzolasyonu	21
2.3.3.3. Parafine Gömülü Tümör Dokusundan RNA İzolasyonu	21
2.3.3.4. cDNA Sentezi	21
2.3.3.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	22
2.3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	23
3. BULGULAR	24
3.1. Gen İfadeleri Arasındaki Korelasyon	29
4. TARTIŞMA	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
ÖZET	37
SUMMARY	38
KAYNAKLAR	39
EKLER	42
ÖZGEÇMİŞ	44

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, çalışmalarında bana yol gösteren değerli tez danışmanım Doç. Dr. Yüksel ÜRÜN'e,

Sorularımı ve sorunlarımı sabırla dinleyip bana ılık tutan, her görüşmemizde beni bilgi, bilim ve enerjiyle dolduran değerli hocam Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a,

Yüksek lisans programımla tanışmama vesile olan, varlığıyla bana her zaman güç ve güven veren, bu çalışmada ve hayatımda büyük emeği ve etkisi olan değerli dostum Samira ABDİ ABGARMİ'ye,

Destekleri ve arkadaşlıkları benim için çok değerli olan çalışma arkadaşlarım Cansu BABAHAN'a, Müge ÖÇAL DEMİRTAŞ'a, Gizem SONUGÜR'e, Bilge ŞEN'e ve Merve BAKIRCI BESLER'e,

Güler yüzünü ve yardımlarını eksik etmeyen Dr. Pınar KUBİLAY TOLUNAY'a,

Varlığıyla bana yaşam enerjisi ve neşe veren ablam Nalan AKGÜN'e,

Destekleri için Selçuk ŞİMŞEK başta olmak üzere bölümümüz personeline, Prof. Dr. Çağatay ARSLAN ve Sıla ERCİYES ile Prof. Dr. İrfan ÇİÇİN ve Ar. Gör. Ali GÖKYER'e çok teşekkür ederim.

Bu tez, bana dünyanın en şanslı çocuğu olduğumu en karanlık anlarda bile hissettiren annem Zehra ÜNVER ve babam Engin ÜNVER ile birlikte dünyayı ele geçirmek için sabırsızlandığım hayat arkadaşım Hakan AKTULGA'ya ithaf edilmiştir.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
°C	Santigrat derece
AFP	Alfafetaprotein
BEP	Bleomycin, etoposide, cisplatin
bp	Baz çifti
CDC25B	Cell division cycle 25B
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CDK2	Siklin bağımlı kinaz 2
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
dk	Dakika

DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
EtOH	Etanol
gDNA	Genomik deoksiribonükleik asit
gr	Gram
HBA	Human beta-actin
HCG	Human chorionic gonadotropin
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MSH2	MutS Homolog 2
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NER	Nucleotide excision repair
ng	Nanogram

NIH	National Institute of Health
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
P53	Tumor protein 53
PBS	Fosfat tamponu
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RAD51	Rad51 recombinase
RNA	Ribonükleik asit
RRM2	Ribonucleotide reductase regulatory subunit M2
SIRT1	Sirtuin 1
SIRT2	Sirtuin 2
sn	Saniye
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER

Şekil 2.1 Deney planının şematik gösterimi.	16
Şekil 3.1 Hasta ve kontrol grubunda periferel kan mononükleer hücrelerde rölatif gen ekspresyonları	27
Şekil 3.2 Dokudaki Gen İfadelerinin Ortalamaları	28

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1 Gerçek Zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primer çiftleri ve probelerin sızileri	20
Çizelge 2.2 cDNA sentezi reaksiyon koşulları	22
Çizelge 2.3 Gerçek zamanlı PCR koşulları	22
Çizelge 3.1 Çalışmaya alınan hastaların özellikleri	25
Çizelge 3.2 Hasta ve kontrol grubunda periferik kan mononükleer hücrelerde rölaf gen ekspresyonları (ortalama± standart hata)	26
Çizelge 3.3 Hasta grubunda testis tümör dokusunda gen ifadeleri yüzdesi (HBA'ya göre) (Ortalama ± Standart hata)	27

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, normal hücrelerde meydana gelen moleküler değişimlerden köken almaktadır. Sağlıklı hücrelerde çoğalma birtakım geri bildirim mekanizmalarıyla mümkünken kanser hücrelerinde bu mekanizmalar zarar görmüştür ve bu nedenle kontrolsüz olarak çoğalırlar. Dur uyarılarından bağımsız olarak çoğalmak kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biridir; diğer karakteristik özelliklerin arasında apoptozdan kaçmak ile anjiyogenez, invazyon ve metastaz yapabilmek bulunur. Kanser hücreleri çevrelerinden bağımsız olarak çoğalabildikleri gibi ölümden de kaçabilirler; kendilerine vasküler çevre oluşturabilir, çevre dokulara sızabilir ve hatta vücudun diğer uzak bölgelerine ulaşarak buralarda tutunabilirler. Kanser hallmarkları olarak bilinen bu temel özellikler Hanahan ve Weingberg tarafından tanımlanmıştır (2011).

Kanserin sebepleri uzun zamandır araştırılmaktadır. Kanser genetik bir hastalıktır, tüm kanserler DNA dizisinde bir anomali meydana geldiği halde tamir edilememiş veya yok edilememiş tek bir hücreden köken alır. Sağlıklı bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesinin temel sebebi, tamir edilemeyen veya elimine edilemeyen genom hasarıdır.

Kalıtsal kanserler tüm kanserlerin yalnızca %10 kadarını oluşturur; geriye kalan tümörler hücrelerin hayatları boyunca maruz kaldığı mutajenler, mikroorganizmalar, iyonize radyasyon, kimyasal karsinojenler, beslenme alışkanlıkları gibi kalıtsal olmayan çok çeşitli sebeplerden köken alır. Kanser çok basamaklı, çok faktörlü ve çok genli bir hastalıktır.

1.2. Testis Kanseri İnsidansı ve Sağkalım

Testis tümörü 15-35 yaş arasındaki erkek bireylerde en sık rastlanan solid malignitedir (Beck, 2010). Amerikan Kanser Birliği 2019'da 9500'den fazla kişinin testis kanseri teşhisi alacağını ve bunların 9100'den fazlasının hayatta kalacağını öngörmüştür. Her 250 erkekte birinin hayatlarının bir döneminde testis kanseri olacağı tahmin edilmektedir. Testis kanseri genellikle orta yaşlı erkeklerde görülen bir hastalıktır ve teşhis bireyler ortalama 33 yaşındayken konmaktadır (American Cancer Society, 2018).

2008-2014 arasındaki katılımcılardan elde edilen veriye göre SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) tarafından yapılan analizde 5 yıllık göreceli sağkalımın lokalize testis tümörlerinde %99, bölgesel tümörlerde %96 ve uzak yayımlı tümörlerde ise %74 olduğu bulunmuştur (American Cancer Society, 2016).

1.3. Testis Germ Hücre Tümörü

Testis kanserlerinin %90'dan fazlasını germ hücre tümörleri oluşturur. Germ hücreler eşeyli çoğalma için bir organizmanın gametlerini oluşturan öncü hücrelerdir ve erkeklerde spermi oluşturlar. Testis germ hücre tümörlerinin temel çeşitleri seminomlar ve nonseminomlardır. Bu iki tümörün insidansı hemen hemen aynıdır. Bazı testis germ hücre tümörleri ise karışık hücrelidir ve nonseminom olarak sınıflandırılır çünkü karışık hücreli tümörlerin gelişimi ve yayılımı nonseminomlarla benzerlik gösterir.

Seminomlar klasik ve spermatositik olarak iki alt grupta değerlendirilebilir. Seminomların %95'ten fazlası klasik alt gruba dahildir. Klasik seminomlar genellikle 25-45 yaş arasında görülür. Spermatositik seminomalar ise genellikle daha yaşlı erkeklerde görülen, daha ender karşılaşılan bir alt gruptur. Spermatositik seminomlar için ortalama teşhis yaşı 65'tir ve bu tümörler klasik seminomlara göre daha yavaş

büyür, daha az yayılım gösterirler. Seminomların teşhis ve tedavi yanıtında kullanılan belirteçler arasında insan koriyonik gonadotropin (HCG) hormonu bulunmaktadır ve bazı seminomlarda kan HCG düzeyi teşhis ve tedavi yanıtının belirlenmesinde kullanılır (American Cancer Society, 2018).

Nonseminomlar genellikle geç adolesanlarda ve 30 yaşına kadar erkeklerde görülür ve 4 alt gruba ayrılır. Bunlardan ilki embriyonel karsinomdur. Embriyonel karsinom hücreleri tüm testis tümörlerinin yaklaşık %40'ında bulunur fakat tüm testis tümörlerinin yalnızca %3-4'ü salt embriyonel karsinom hücrelerinden oluşmaktadır. Bu hücreler mikroskop altında bir embriyo gibi görünmektedir ve bu tip nonseminomlar oldukça hızlı büyüyerek testis dışına yayılmaya yatkındır. Embriyonel karsinomlarda kanda HCG ile birlikte AFP de artabilir ve bu iki protein bu tümörlerde belirteç olarak kullanılmaktadır. Nonseminomların sınıflandırılmasında ikinci alt grup ise yolk sac karsinomudur. Bu alt sınıf çocuklarda en çok rastlanan testis tümörü çeşididir ve yetişkinlerde ender görülür. Metastatik dahi olsa kemoterapiye çok iyi yanıt veren bir sınıftır. Bu tümörlerde de AFP bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Koriyokarsinom alt sınıfı ise oldukça ender görülen ve hızla büyüyen bir türdür. Saf koriyokarsinomlar oldukça hızlı bir şekilde metastaz yapabilmektedir. Koriyokarsinomlarda sıklıkla kullanılan belirteç ise HCG'dir. Nonseminomların son alt sınıfı olan teratomalar ise mikroskop altında gelişmekte olan bir embriyoya benzer şekilde üç katman halinde gözlenen, diğerlerinden farklı olarak kanda ne HCG ne de AFP'nin artmasına sebep olan tümörlerdir. Teratomlar mature (yetişkin dokulardaki hücrelere benzerlik gösteren), immature (erken bir embriyo ile benzerlik gösteren) ve somatik tip malignansi gösteren ve mature gibi görünmesine rağmen testis dışında bir organda gelişen tümörlerden oluşur.

Testis germ hücre tümörleri gelişimine invaziv olmayan intratübüler germ hücre neoplazisi olarak başlar. Testis karsinom in situ hücreleri sperm üreten seminiferous tübüllerin dışına yayılmamıştır ve her zaman invaziv kansere dönüşmez. Tümörler aynı zamanda testis stromalarında da başlayabilir. Bu tip tümörlere gonadal stromal tümörler denmektedir ve tüm yetişkin testis tümörlerinin %5ini oluşturmaktadır. Stromal tümörler Leydig hücresi tümörleri ve Sertoli hücresi

tümörleri olarak sınıflandırılabilir. Leydig hücresi tümörleri sağlıklı erkeklerde testosteron gibi androjenik hormonları üreten hücrelerdir ve hem çocuklarda hem yetişkinlerde görülebilmektedir. Leydig hücresi tümörlerinin çoğu benignedir, testis dışına yayılmaları enderdir ve genellikle cerrahi ile tam rezeksiyon sağlanır. Sertoli hücresi tümörleri ise spermi oluşturan germ hücreleri destekleyen hücrelerdir ve Leydig hücreleri gibi genellikle benign seyrederekler.

1.4. Testis Germ Hücre Tümörü Tedavisi

Metastatik olsa dahi testis kanserlerinin birinci basamak tedavisi genellikle cerrahidir ve hastaya adjuvan kemoterapi verilir. Testis kanserinin tedavisinde kullanılan temel kemoterapötik ajanlar arasında cisplatin, etoposide, bleomycin, ifosfamide, paclitaxel ve vinblastin bulunmaktadır. Bahsedilen kemoterapötik ajanlar genellikle kombinasyon şeklinde kullanılır. BEP kemoterapi şeması (bleomycin, etoposide ve cisplatin) klinikte sıklıkla ve başarıyla kullanılmaktadır.

Cisplatin bazlı kemoterapinin kullanılmasıyla metastatik hastalıklarda remisyon oranı %15 civarından %70'e kadar, erken evre hastalıklarda ise %95'e kadar çıkmıştır ve cisplatin tabanlı kemoterapi testis germ hücre tümörünün tedavisinde tam iyileşme sağlanabilmesi açısından tedavi edilebilir maligniteler için bir örnek teşkil etmektedir (Beck, 2010). Birinci basamak tedavide en çok kullanılan kombinasyon kemoterapi ajanlarının tamamında cisplatin bulunmaktadır. Metastatik germ hücre tümörlü hastalara genellikle 3-4 kez kemoterapi verilmektedir, dolayısıyla bu bireyler tedavileri süresince toplam 300-400 mg/m² cisplatine maruz kalmaktadır (Chovanec ve ark. 2017).

Cisplatin (Cis-Diamminedichloroplatinum (II)), bir sitotoksik ilaçtır ve alkilleyici ajanlar sınıfında yer alır. Birçok kemoterapi ajanı gibi hücrede DNA hasarına sebep olmaktadır. Sitotoksik etkisini DNA'nın hem intra hem inter zincirleriyle dönüşümsüz çapraz bağlar yaparak gösterdiği ve cisplatin adductlarının (cisplatin bağlanması ile bükülmüş DNA zinciri) DNA'dan NER (nucleotide

excision repair) mekanizmalarıyla kaldırıldığı düşünülmektedir (Duale ve ark., 2007). Organizma düzeyinde ise cisplatin ile tedavi edilmiş hastalarda uzun yıllar sonra bile cisplatin izleri gözlenebilmektedir. Bu hastalarda tedavilerinden 20 yıl sonraya kadar serum platin düzeyinin cisplatin ile tedavi edilmemiş testis germ hücre tümörlü hastalara göre 100-1000 kat fazla olduğu gösterilmiştir (Chovanec ve ark. 2017). Testis kanseri geçirmiş kişilerde hayatlarının ilerleyen dönemlerinde yeniden kanser görülme ihtimali hiç testis kanseri olmamış bireylere göre daha yüksektir ve kemoterapi ile tedavi edilmiş olmanın özellikle lösemi ve MDS riskini artırdığı düşünülmektedir (American Cancer Society, 2018).

Bleomycin antitümör etkinliği olan sitotoksik bir antibiyotiktir. Streptomyces verticillus ile üretilen bu glikopeptit antibiyotik, etkisini tümörde DNA metabolizmasını inhibe ederek gösterir ve özellikle katı tümörlerde antineoplastik olarak kullanılmaktadır.

Etoposide bir topoizomeraz II inhibitörü ve bitki alkaloidi olarak sitotoksik ajanlar arasında yerini almaktadır. Hücre siklusuna spesifik olarak çalışmakta ve hücre döngüsünde G2 ve S fazında olan hücrelerin çoğalmasını topoizomeraz II ve DNA ile kompleks oluşturmak suretiyle engellemektedir. Etoposide, DNA ve topoizomeraz kompleksi çift zincirli DNA'da kırıklar oluşturmaktadır ve bu kırıkların topoizomeraz II bağlanmasıyla tamir edilmesini engellemektedir. Biriken DNA kırıkları hücrenin mitotik faza girmesini engelleyerek hücre ölümüne sebep olmaktadır.

Bu çalışmada BEP kemoterapi şeması ile tedavi edilmiş hastalar yer almaktadır.

1.5. Moleküler Yaşlanma

Yaşlanma her biyolojik organizmanın bir özelliğidir ve çok hücreli organizmalarda hücrelerin ve dokuların detoriasyonu ile karakterizedir. Yenilenebilir dokulara sahip organizmalarda yaşlılık aynı zamanda hiperplazilerle de karakterizedir ve bunların bir kısmı kanser haline dönüşür (Campisi, 2000).

Moleküler yaşlanma zaman içinde hücre seviyesinde moleküler hasar birikimiyle gerçekleşir. Hücrelerin hasarları tamir etmek ve yok etmek için çeşitli mekanizmaları bulunmaktadır fakat bunlar yüzde yüz etkili değildir ve düzeltilemeyen hasarlar ve hatalar zaman içinde hücrelerde birikir. Hücrenin tamir becerisi de yaşla birlikte azalma gösterir (McAuley ve ark., 2017).

1.6. Programlı Yaşlanma Teorileri

Hücresel yaşlılığın sebeplerinin ve mekanizmalarının ne olduğu uzun zamandır tartışılmakta ve araştırılmaktadır.

Geleneksel teoriler arasında Hayflick limiti yaşlanma teorisi bulunmaktadır. Bu görüşe göre hücrelerin çoğalma kapasitesi telomer uzunluğu ve Hayflick limitiyle sınırlıdır ve bu sınırdan sonra hücreler çoğalmayı durdurur (Hayflick ve Moorhead, 1961). Telomerlerin her başarılı hücre bölünmesi sonrası kısaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Campisi, 2000). Yumurta ve sperm hücrelerinin çoğalmayı ve türün devamlılığını sağlayabilmek amacıyla kromozom sonlarındaki telomerlerin kısılmasını önleyerek replikatif potansiyeli korumak için telomerase kullandığı bilinmektedir fakat çoğu yetişkin ve farklılaşmış hücre bu beceriden yoksundur. Telomerler kritik uzunluğa kadar kısaldığında hücre bölünmesi durur, hücre ölümü gerçekleşir ve sonunda organizma ölümü de gerçekleşir.

Hayflick limiti teorisi dışındaki hücresel yaşlanma teorileri temelde programlı yaşlanma teorileri ve hasar/hata teorileri olarak iki sınıfa ayrılabilir. Programlı

yaşlanma teorileri yaşlılığın; yani hücre idamesi, tamirin ve savunma yanıtlarının bozulmasının bireysel ve biyolojik bir kronoloji izlediğini söylemektedir. Diğer yandan hasar/hata teorileri hücrelerin çevresel saldırılar sonucu hasarlar ve hatalar biriktirdiğini ve yaşlılığa sebep olduğunu savunmaktadır. Bu teoriler birbirini dışlamaz.

Programlı yaşlanma teorileri şu şekilde incelenebilir:

- Programmed longevity: Yaşlılık bazı spesifik genlerin açılması veya kapatılması sebebiyle oluşur ve bu şekilde defektler meydana gelmeye başladığında senesans gözlenir. Bu yaklaşıma göre yaşlılık genetik instabilitenin hem sebep hem sonucudur (Davidovic ve ark., 2010; Jin, 2010).

- Endokrin teori: Bu yaklaşıma göre biyolojik saat yaşlılığı kontrol eden hormonlar tarafından düzenlenir. Yaşlılığın hormonal olarak düzenlendiği ve evrimsel olarak korunmuş insulin/IGF-1 sinyal yolağının yaşlılığın hormonal düzenlenmesinde anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir (van Heemst, 2010).

- Immunolojik teori: İmmün sistemin işlevinin zamanla azalmaya programlı olduğunu ve hücrelerin bulaşıcı hastalıklara, kansere ve yaşlanmaya daha yatkın hale geldiğini savunur. İmmün sistemin ergenlikte en aktif haline ulaştığı ve yaşla beraber fonksiyonlarının azaldığı bilinmektedir. Örneğin yaşla beraber antikorların etkinliğinin azaldığı ve çeşitli hastalıklara karşı yanıtın güçleştiği, hücresel stresin arttığı ve sonunda bu durumun hücre için ölümle sonuçlandığı gösterilmiştir (Cornelius, 1972). İmmün sistemdeki bozuklukların kardiyovasküler hastalıklar, inflamasyon, Alzheimer ve kanserle ilişkili olduğu da bilinmektedir.

Hasar/hata teorileri ise aşağıdaki gibi incelenebilir:

- Wear and tear: İlk olarak 1882’de Dr. August Weismann tarafından öne sürülen bu teori hücrelerin ve dokuların kullanılmaya bağlı hasar oluşumuna açık

yaşamsal kısımları olduğunu ve bu kısımlardaki hasarların hücresel yaşlılığa sebebiyet verdiğini savunur (Jin, 2010).

- Rate of living: Bir organizmanın oksijenli bazal metabolizma hızının o organizmanın yaşam ömrüyle ters orantılı olduğu düşünülmüştür. Nematodlarda yapılan destekleyici araştırmalar bulunmaktadır (Brys ve ark., 2007).

- Cross linking theory: İlk olarak 1942’de Johan Bjorksten tarafından öne sürülmüş bu teori çapraz bağlara sahip proteinlerin birikiminin hücre, doku ve vücut fonksiyonlarını yavaşlatarak yaşlılığa sebep olduğunu söylemektedir (Bjorksten ve Tenhu, 1990).

- Serbest radikal teorisi: Süperoksit ve serbest radikallerin hücredeki makromoleküler bileşenlerde hasara sebebiyet verdiğini ve bunun öncelikle hücrelerin ve ardından dokuların fonksiyonlarında bozulmaya sebep olduğunu savunmaktadır. Bu makromoleküller arasında nükleik asitler, şekerler, proteinler ve lipidler gibi yaşamsal hücresel bileşenler bulunmaktadır ve bunların tamamı serbest radikal saldırılarından etkilenir. Nükleik asitler serbest radikaller sebebiyle baz veya şeker grubu değişimleri gösterebilir, tek veya çift zincir kırıkları gerçekleşebilir ve diğer moleküllerle aralarında cross linkler oluşabilir. ROS sinyal yollarının hücresel senesans ve organizmal yaşlanma anlamında kilit rol üstlendiğini savunan çalışmalar bulunmaktadır (Afanasev, 2010).

- Somatik DNA hasar teorisi DNA’da hasarlar sürekli olarak oluşmakta ve tamir edilmektedir fakat tamir verimi yüzde yüz olamamaktadır. Hasar oluşumu ve birikimi tamir mekanizmalarını da etkilemekte ve hasarların varlığı kümülatif olarak daha çok hasarın birikimine sebebiyet vermektedir (Jin, 2010).

Bunların yanında hücresel yaşlanmanın hem intrinsik hem ekstrinsik etkenlerin tamir edilememiş hatalar biriktirmesi sebebiyle olduğunu savunan kombinasyon teorileri de vardır. Örneğin Kirkwood (2017), hücresel yaşlanmanın hem intrinsik

(örn. ROS) hem ekstrinsik (örn. ultraviyole ışıma, toksinlere maruziyet) stres faktörlerine maruz kalarak hasar oluşan hücrelerdeki bu hasarların tanınamaması, düzeltilmemesi veya farklı mekanizmalarla bertaraf edilemeden birikmesi sebebiyle olduğunu söylemektedir. Tamir edilememiş ya da stres yanıtı geliştirilememiş hataların rastgele birikimi sinyal iletiminde sorunlara ve inflamasyona sebep olarak hücresel defektler oluşturmakta, hücresel defektler ise doku seviyesinde fonksiyon bozukluğuna sebep olarak yaşlanmaya sebebiyet vermektedir. Hücresel defektler doku seviyesinde rejenerasyonun da önünde bir engeldir, inflamasyonun yanında DNA’da yaşa bağlı metilasyon değişimleri de gerçekleşir ve bu defektler aynı zamanda kök hücreleri de etkilemekte ve hücresel yorgunluğa sebep olmaktadır (McAuley ve ark., 2017).

Yaşlanmanın bir doğal seçim mekanizması olduğu ve türlerdeki yaşlı bireylerin sayısını azaltarak geç etki gösteren zararlı etkileri oluşturan alellerin ya da genlerin eliminasyonunu sağladığı öne sürülmüştür (Campisi, 2013). Bu evrimsel yaklaşım ilk olarak 1957’de George Williams tarafından ortaya atılmış ve antagonistik pleiotropi hipotezi olarak adlandırılmıştır. Williams’a göre bir organizmada bir genin birden fazla fenotipik özelliği kontrol ettiği durumlarda bu fenotiplerden en az birinin organizmanın uyumu için yararlı ve en az birinin zararlı olduğu durumda antagonistik pleiotropi sözkonusu olur. Bu şekilde, eğer bir gen yaşamın erken evrelerinde gelişime ve geç evrelerinde yaşlılığa sebep oluyorsa yaşlanma evrimsel olarak adaptiftir, yani bu gen uyum için bir trade-off oluşturur ve organizmanın yaşamının geç evrelerinde istenmeyen fenotiplere sebebiyet vermesine rağmen erken evrelerde yararlı fenotiplere sebebiyet verdiği için vazgeçilemezdir ki bu sebepten bir populasyon doğal seçimle mükemmel hale asla erişemez (Williams, 1957).

Hücresel yaşlanma teorilerinin hangisinin doğru olduğuna ilişkin bir fikir birliği bulunmamaktadır.

1.7. Moleküler Yaşlanma ve Kanser

Yaşlanmanın en belirgin özelliği molekül, hücre, doku ve organizma seviyelerinde dereceli olarak fonksiyon kaybı, dejenerasyondur. Yaşa bağlı fonksiyon kaybı tek hücrelilerden çok hücrelilere kadar tüm canlıların ortak özelliğidir. Memelilerde yaşa bağlı dejenerasyon; sarkopeni, damar sertliği, kalp yetmezliği, osteoporoz, akciğer yetmezliği, nörodejenerasyon gibi iyi bilinen patolojilere sebep olur. Türler arasında farklılıklar olmasına rağmen kolektif olarak yaşa bağlı dejenerasyonlar organizma ömrünün ortalarından sonra üstel olarak yükselir ve bu yaş insanlarda 50-60'a tekabül etmektedir (Campisi, 2013).

İnsan gibi yenilenebilir dokulara sahip çok hücreli organizmalarda uygunsuz çoğalmaya sebebiyet veren fonksiyon kazanımları ise hiperplaziye sebebiyet verebilir. Bunun yanında, genetik instabilite sebebiyle bu değişiklikler hücrelere çoğalma, migrasyon ve hatta immün sisteme saldırma şeklinde yeni fonksiyonlar kazandırabilir. Bu fenotipler, kanserin daha önce bahsedilmiş olan hallmarklarını oluşturur.

Kanser de diğer yaşa bağlı dejeneratif hastalıklar gibi organizmanın ortalarından itibaren yükselen insidansa sahiptir ve bu açıdan diğer yaşlılık hastalıklarına benzerlik göstermektedir. Bu benzerliğin önemli bir ayağını da senesans oluşturur. Senesansın moleküler sebepleri arasında onkogenler gibi güçlü mitotik sinyaller, devamlı genomik ve telomerik hasar, epigenomik değişiklikler ve tümör baskılayıcı gen aktivasyonu sayılabilir (Campisi, 2013).

1.8. Senesans ve Kemoterapi

Senesans, hücrenin replikatif potansiyelini kaybetmesi durumudur ve senesant hücreler diğer hücrelerden fizyolojik mitojenlerin varlığında dahi hücrenin siklusa yeniden girememeleriyle, apoptotik ölüme dirençli olmalarıyla, farklılaşmış fonksiyonlara ve senesant fenotipe sahip olmalarıyla ayrılırlar (Campisi, 2000).

Kanser kemoterapisinin tedavisi tamamlanan hastaların ileriki yaşantılarında başka hastalıklar gelişmesinde nasıl bir değişiklik yarattığına dair araştırmalar bulunmaktadır. Testis kanseri geçirmiş ve kemoterapi ile tedavi edilmiş bireylerde HPV semen enfeksiyonunun prevalansını artırdığı gösterilmiştir (Garolla ve ark., 2012). 35 yaşın altında testis kanseri teşhisi konup tedavisi yapılan bireylerde dolaşım sistemi hastalıkları sebebiyle mortalitenin genel popülasyona oranla önemli derecede arttığı gösterilmiştir (Sophie ve ark., 2007). Genel popülasyonla kıyaslandığında tedavi edilmiş testis kanserli bireylerde enfeksiyon ve sindirim sistemi hastalıkları sebebiyle mortalitenin arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda, genel popülasyonla kıyaslandığında yalnızca kemoterapi veya kemoterapi ve radyoterapi ile tedavi edilmiş testis kanserli bireylerde kanser olmayan tüm hastalıklardan kaynaklı mortalitenin arttığı gösterilmiş; dolaşım sistemi hastalıkları, enfeksiyon, solunum sistemi hastalıklarından kaynaklanan mortalitenin arttığı bulunmuştur. Özellikle cisplatinin klinikte yaygın olarak kullanılmaya başlandığı 1975 yılının ardından testis kanseri olup tedavisi tamamlanmış hastaların, bahsedilen hastalıklardan hayatını kaybetme riskinin genel popülasyona göre yüksek olabileceği düşünülmektedir (Sophie ve ark., 2007).

1.9. İmmün Sistem ve Hücresel Yaşlanma

İmmün sistemin insandaki temel işlevi mikroorganizmalar ve kimyasallar gibi çeşitli çevresel ajanlara ve malignitelere karşı vücudu korumaktır. Adaptif immün sistem; antijeni spesifik olarak tanıyarak, hafıza hücreleri üreterek ve karşılaşılan antijene spesifik immünite sağlayan hücrelerin adaptif çoğalmasıyla işlev gösterir. T lenfositler vücutta en yüksek proliferatif potansiyele sahip hücrelerdir ve kullanılmaya bağlı hasar oluşumuna açıktırlar (Weyand ve Goronzy, 2016). Doğumda immün sistemin antijene duyarlı T ve B hücreleri oldukça çeşitlidir ve her biri o kadar seyrek ki hostu koruyamazlar. Dolayısıyla büyüme ve yaşlanmayla birlikte çeşitli enfeksiyon ajanları ve kanser hücrelerine maruz kaldıkça bu antijen-spesifik hücrelerin lenfosit popülasyonundaki oranı artar ve çoğalma kapasitesi çok yüksek naive lenfositlerden çoğalma kapasitesi daha az olan efektör ve hafıza hücrelerine dönüşürler. Klonal çoğalma ve lenfositlerin kalıcılığını maruz kalınan antijenlerin

belirlemesi uzun yıllar boyunca immün hücreler üstünde büyük bir seçici baskı oluşturarak immün sistemi yaşlanmaya oldukça duyarlı bir hale getirir (Weyand ve Goronzy, 2016). Naive lenfosit rezervinin azalması ve antijene spesifik lenfosit klonlarının artması da immün hücrelerin yaşlanmasına (immunosenesans) katkıda bulunur. Lenfositlerin yaşla birlikte çoğalma potansiyelinde ve yanıtlarında azalma olmasının sebepleri arasında birikmiş DNA hasarı olabileceği düşünülmektedir (Fulope ve ark., 2009).

Hücre yaşlanma; hücre siklusu kontrol elemanları, sağkalım sinyalleri, hücre yüzeyi belirteçleri, hücre metabolizması belirteçleri, genomik stabilite, DNA tamir mekanizmaları elemanları gibi çeşitli fenotipler yoluyla çalışılabilir. Bu çalışmada kullanılan belirteçler aşağıdaki gibidir:

CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A), p16(INK4A) ve p14(ARF) tümör baskılayıcı proteinlerini kodlayan bir gendir ve insanda 9p21.3'te bulunur.

p16INK4a bir CDK4 ve CDK6 inhibitörüdür ve işlevini bu siklin bağımlı kinazları bloke etmek suretiyle hücrenin replikasyonunu engelleyerek gösterir. p16INK4a yaşlanmanın biyobelirteçlerinden biri olarak görülmektedir (Wood ve ark., 2016) ve meme kanserli bireylerin tedavisinde kullanılan adjuvan kemoterapiden sonra kanda yaklaşık 15 yıllık kronolojik yaşlanmaya tekabül edecek şekilde arttığı gösterilmiştir (Sanoff ve ark., 2016). Tedavisi kemoterapi ile tamamlanmış testis kanseri hastalarının CD3+ hücrelerinde p16INK4a ekspresyonunda kontrol grubuna göre artış gözlenerek immün yaşlı fenotip bulunduğu gösterilmiştir ve etken olarak kanserin kendisi ve kemoterapi tartışılmıştır (Bourlon ve ark., 2018). p14ARF ise bir tümör baskılayıcı protein olan p53'ün yıkımını engelleyerek işlev gösterir. Hem p14ARF hem p53 proteinlerinin replikatif potansiyelini kaybetmiş hücrelerde bulunduğu bilinmektedir (NIH, 2018).

RAD51, insanda 15q15.1'de bulunur ve tek ve çift zincirli DNA'ya bağlanarak DNA-bağımlı-ATPaz aktivitesi gösteren bir esansiyel tamir proteini kodlar (Baumann

ve ark., 1996). Protein ürünü, DNA hasarının onarılması ve genetik çeşitliliğin sağlanması için evrimsel olarak korunmuş bir mekanizma olan homolog rekombinasyonun anahtar bir enzimidir ve fonksiyon bozukluklarının tümör oluşumunda önemli bir role sahip olabileceği düşünülmektedir (Raderschall ve ark., 2002) Sağlıklı hücrelerde BRCA1 ve BRCA2 gibi proteinleriyle etkileşime girerek hasarlı DNA'yı tamir ettiği bilinmektedir ve genomik hasar yanıtında aktif rol oynadığı düşünülmektedir (NIH, 2018).

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) insanda 20p12.3'te bulunur ve nükleik asit metabolizmasında replikasyon ve tamir mekanizmalarının esansiyel bir bileşeni olarak rol oynamaktadır. Protein ürününün çekirdekte bulunduğu ve DNA polimeraz delta'nın bir kofaktörü olduğu bilinmektedir. Geçtiğimiz yıllarda PCNA'nın DNA Polimeraz Aparatına dahil olmayan hücre siklusu proteinleriyle etkileşime girdiği bulunmuştur ve DNA replikasyonu ile tamirinde üstlendiği roller araştırılmaktadır (NIH, 2018).

CDK2 (cyclin dependent kinase 2), insanda 12q13.2'de bulunur ve hücre siklusunda özellikle G1 fazından S fazına geçişlerde E2F ile birlikte önemli bir kontrol sağlayan, G2 progresyonunda rol oynayan siklin bağımlı bir protein kinaz kodlar (NIH, 2018).

p53; insanda 17p13.1'de bulunur ve çeşitli hücresel streslere yanıt sonrasında hedef genlerin ekspresyonlarını düzenlemek suretiyle hücre siklusunu durdurma, apoptozu başlatma, senesansa gitme, tamiri başlatma ya da metabolik aktiviteleri değiştirme işlevlerine sahip bir tümör baskılayıcı proteini kodlar (Weyand ve Goronzy, 2016). Hücre içinde p53 proteini DNA'ya bağlanır ve bir mediatörün, CDK2'nin aktivitesinin baskılamasını uyarır. p53'ün üretimini uyardığı mediator (p21), CDK2'ye bağlandığında hücre siklusu durdurulur. p53 senesansa önemli bir rol oynamaktadır: yükseldiğinde neoplazi azalır fakat diğer yandan yaşlanma hızı artar (Ventura ve ark., 2017).

CDC25B; insanda 20p13'te bulunur ve hücre siklusunda mitozaya geçmek için gerekli olan, hem nükleer lokalizasyon hem de nükleer export sinyallerine sahip olduğu için M ve G1 fazlarında çekirdeğin içinde, S ve G2 fazlarında sitoplazmada bulunan, onkogenik özelliklere sahip bir fosfatazı kodlar. CDC25B ürünü siklin bağımlı kinaz CDC2'yi iki fosfat grubunu kaldırarak aktive eder ve mitozaya girmek için gereklidir (NIH, 2018).

Sirtuin 1 (SIRT1) insanda 10q21.3'te bulunur ve memelilerde apoptozu ve hücre senesansı inhibe ederek hücre sağkalımını artıran bir proteini kodlar (Espino, Pariente ve Rodriguez, 2012). İnsanda sirtuin ailesi proteinlerinin işlevleri ve mekanizmaları tam olarak ve detaylı bir şekilde aydınlatılmış değildir (NIH, 2018).

Sirtuin 2 (SIRT2), insanda 19q13.2'de bulunur ve genomik stabilite ile hücre siklusuna progresyonunda önemli bir rol oynayan, mitozaya erken girmeyi engelleyen bir antefaz kontrol noktası elemanını kodlar (NIH, 2018).

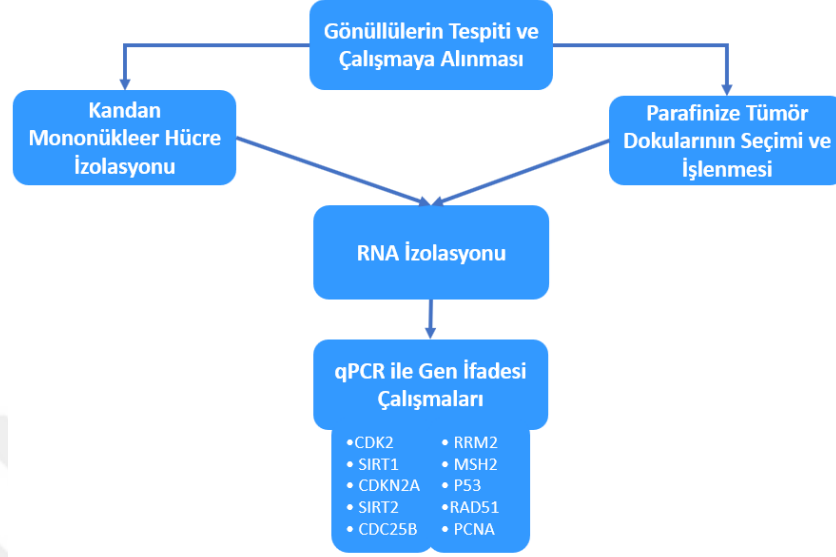
MSH2 (mutS Homolog 2), insanda 2p21-p16.3'te bulunur ve diğer MSH proteinleriyle heterodimerler oluşturarak DNA'daki hatalı eşleşmelere bağlanmak suretiyle tamiri başlatan bir DNA Mismatch repair proteinini kodlar (Uniprot, 2018). Özellikle herediter nonpolipozis kolon kanserinde sıklıkla mutasyona uğramış haldedir. MSH2 proteini MSH3 veya MSH6 ile bir kompleks oluşturarak replikasyon esnasında oluşan DNA hatalarını tanır ve ardından MLH1-PMS2 protein kompleksi tarafından hatayı onarır (NIH, 2018).

RRM2 (ribonucleotide reductase subunit M2), insanda 2p25.1'de bulunur ve dNTP sentezinde hız sınırlandıran bir heterodimerik enzimin (ribonucleotide reductase) küçük subunitini kodlar (OMIM, 2018). dNTP sentezinin azalmasının ardından DNA hasar yanıtıyla birlikte senesansa bağlı hücre siklusundan çıkış gerçekleştiği bilinmektedir. Bununla tutarlı olarak, RRM2'nin downregülasyonunun senesans için hem gerekli hem yeterli olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda; RRM2

baskılanması yoluyla nükleotid metabolizmasının baskılanması, senesansla ilişkili hücre büyümesi durdurulmasının stabil olması için de gereklidir. Ek olarak, RRM2 baskılanmasının iyi huylu nevi ve melanomanın senesans durumuyla korelasyon halinde olduğu ve ifadesinin azaltılmasının melanoma hücrelerinde senesansı yönettiği gösterilmiştir (Aird, 2013).



2. GEREÇ VE YÖNTEM



Şekil 2.1 Deney planının şematik gösterimi.

Tez çalışmamızın akış planı Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

2.1. Hasta Seçim Kriterleri

Bu çalışmaya hastayı izleyen hekimi tarafından rutin tedavi olarak en az 3 kür BEP verilmiş ve en az 6 aydır remisyonda olan bireyler arasında 20-51 yaş arası testis germ hücre tümörlü toplam 22 hasta gönüllü ve bu kişilerle benzer kronolojik yaşta toplam 16 sağlıklı gönüllü alınmıştır.

ÇALIŞMAYA DAHİL OLMA ÖLÇÜTLERİ (HASTA-DENEY GRUBU)

1. Çalışmaya katılmaya onay vermiş olmak
2. 20-55 yaş arasında olmak
3. Patolojik inceleme ile kanıtlanmış testis germ hücre tümörü tanısı almış olmak
4. Rutin tedavi olarak en az 3 kür BEP almış olmak

5. Diyabet hastası olmamak
6. Baę dokusu hastalığı bulunmamak
7. Kronik hastalığı bulunmamak

ÇALIŞMAYA DAHİL OLMA ÖLÇÜTLERİ (KONTROL GRUBU)

1. Çalışmaya katılmaya onay vermiş olmak
2. 20-55 yaş arasında erkek olmak
3. Herhangi bir kanser tanısı almamış olmak
4. Diyabet hastası olmamak
5. Baę dokusu hastalığı bulunmamak
6. Kronik hastalığı bulunmamak

2.2. Gereçler

2.2.1. Kullanılan Kimyasallar

- Lymphoprep (Axis-Shield, 01-63-12-002-A)
- FBS (Biological Industries, 04-001-1A)
- PBS (Capricorn Dulbecco's PBS 10x, PBS-10XA)
- DMSO (Merck, 102952)
- Tris (Applchem, A2264-1000)
- EDTA (Amresco, 1651C381)
- RPMI-1640 (Capricorn Scientific, RPMI-A)
- 5x HotFirePol Probe Universal qPCR Mix (Solis Biodyne, 08-17-00001)

2.2.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- Laminar hava akışlı kabin
- Santrifüj cihazı
- -80°C soğutucu

- -30°C soğutucu
- Hassas tartı
- Tek kullanımlık serolojik pipetler
- Santrifüj tüpleri
- Elektronik pipet
- Otomatik pipet
- pH-metre
- Nanodrop One (ThermoScientific)
- Thermal Cycler (Bio-rad CFX96 Real-Time System)
- Hard-shell 96-well PCR Plate (Bio-Rad, HSP9601)
- Mikrotom (Leica RM-2025)

2.2.3. Kullanılan Kitler

- Aurum Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, 732-6820)
- iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, 170-8891)
- Rneasy FFPE Kit (Qiagen, 73504)

2.2.4. Kullanılan Yazılımlar ve Veritabanları

- SPSS Paket Programı
- NCBI, NCBI BLAST
- Primer3
- IDT Oligoanalyzer

2.3. Yöntem

2.3.1. Solüsyonların Hazırlanışı

- **%2 FBS’li PBS Hazırlanması:** 500 ml’lik PBS içine 10 ml FBS eklenerek hazırlandı.
- **Dondurma Sıvısı Hazırlanması:** %10 DMSOlu RPMI-1640 hazırlandı.

2.3.2. Primer tasarımı

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonunda ilgili gen ifadelerinin tespiti için kullanılması planlanan primerler tasarlandı. Bunun için ilgili genlerin protein ürünlerine uygun transkriptleri Uniprot ile kontrol edildi. Transcript varyantlarının dizileri Ensembl’da tespit edildi ve tüm transkriptlere uygun kısımlar üstünde intron-spanning yöntemiyle baz seçimleri yapıldı. Primer3 ile primer çiftleri ve probelarin tasarımı yapıldı ve dG’si minimum -6.5 olan seçenekler IDT Oligoanalyzer ile analiz edilerek hairpin ve dimer yapıp yapmadıkları kontrol edildi. Yapmayanlar arasından seçilen primer çiftleri ve probelar NCBI BLAST gereci ile blastlanarak genomda eşleştiği yerlerin doğruluğu teyit edildi. HPLC saflıkta, probelar 5’FAM – 3’TAMRA işaretli, 200 nM sentez skalasında olacak şekilde ticari olarak satın alındı.

Kullanılan primer çiftleri probelerin dizileri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Gerçek Zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primer çiftleri ve probelerin dizileri

	Forward Primer	Reverse Primer	Probe
CDC15B	GATTCCCCAGCCCTATG	CCTGGATGGCCTGTCAA	CCACATGGCGGAGCAGAC
CDK2	CCCTGGAGATTCTGAGATTG	TTGGCTTGAATCAGGCATA	GACCCAGATGAGGTGGTGT
MSH2	AAGGCTTCTCCTGGCAATCT	CCCAACTCCAACCTGTCTCT	ACACCCACAACACAATGGAAGCTG
CKDN2A	GAAGGTCCCTCAGACATCCC	GGACCTTCGGTGACTGATGA	CCCGAGGTTTCTAGAGCCTCTCTGG
TP53	GCTGGTTAGGTAGAGGGAGT	GACCCCTGAGCATAAAACAAG	AAGGAAATCTCACCCATCC
PCNA	CGAAACCAGCTAGACTTTCC	ACACCGCTGGAGCTAATATC	GTTGGAGGCACTCAAGGACC
RAD51	AAATGCAGATACTTCAGTGGA	TGGCTTCACTAATTCCTTA	GCATAAATGCCAACGATGTG
RRM2	TGTTTCTATGGCTTCCAAAT	CAGTCTGCCTTCTTCTGAC	CAATGCCATTGAAACGATGC
SIRT1	AATATGCCAAACTTTGCTGT	AGCTGCTTGGTCTAAAAGTG	ATTGTGACAGTTGCCACCC
SIRT2	GACTTCCTGCGGAATTATT	CACCAAACAGATGACTCTGC	CTGCTGGACGAGCTGACCTT
HBA	CCCTGGAGAGAGCTACGAG	AAGGTAGTTCGTGGATGCC	CCAGCCTTCCTTCTGGGCA

2.3.3. Moleküler Deneyler

2.3.3.1. Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Gönüllülerde EDTA’lı tüpe alınan kan 2300g’de 5 dakika santrifüjlenerek plazması ayrıldı. Kalan kısmı 1:1 v:v oranında %2 FBS’li PBS ile seyreltilerek 3 mL’si 4 mL Lymphoprep density gradient mediumun üstüne karışmayacak şekilde eklendi ve 400g’de 30 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında oluşan bulutsu kısımda yer alan periferel kan mononükleer hücreler toplandı ve 1:1.5 v:v oranında %2 FBS’li PBS ile 800g’de 5 dakika yıkandı. Süpernatant atılarak pelet hücreler 1.5 mL dondurma sıvısıyla kaldırıldı ve -80C’de saklandı.

2.3.3.2. Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyonu

RNA izolasyon kitinin yönergeleri takip edilerek izolasyon yapıldı ve ürünlerin miktarıyla kalitesi Nanodrop'ta ölçüldü. Kısaca, lenfositler liziz solüsyonu ve 70% EtOH ile patlatıldıktan sonra yıkama solüsyonuyla nükleik asitlerin kit içeriğindeki kolona tutunması sağlandı ve DNase ile inkübe edilerek kolonda yalnızca RNA kalması sağlandı. Ardından kit içeriğindeki solüsyonlarla yıkamalara devam edildi ve nükleaz içermeyen distile su ile 50 ul son hacimde 12000g'de elüsyon yapıldı. 1.5 ul ile Nanodropta ölçüm yapıldı ve 260nm/280nm absorbanısı 1.9-2.1 arasındaki örnekler çalışmaya dahil edildi.

2.3.3.3. Parafine Gömülü Tümör Dokusundan RNA İzolasyonu

Gönüllülerin ameliyatları esnasında çıkarılarak parafin blokta muhafaza edilen dokuları arasından patoloji raporlarına göre tümör dokusu içerenleri seçilerek mikrotom cihazıyla 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu örneklerden ticari kitin yönergelerine göre RNA izolasyonu yapıldı. Kısaca, alınan kesitlerdeki parafin xylene ile, xylene kalıntıları ise absolute EtOH ile uzaklaştırıldı. Kalan EtOH uçuruldu. Proteinaz K ve tampon uygulaması yapıldı. İnkübasyon sonrasında supernatan toplandı ve DNase uygulaması yapılarak RNA izolasyonu kolonda gerçekleştirildi. Kit içeriğindeki solüsyonlarla yıkama devam ettirilerek elüsyon 20 ul hacminde nükleaz içermeyen distile su ile yapıldı.

2.3.3.4. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan ticari kitin yönergelerine göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. Kısaca, 4 ul reaksiyon karışımına 1 ul reverse transcriptase ve gerektiğinde hacmi 20 ul'ye tamamlayacak kadar nükleaz içermeyen distile su eklenerek 500 ng/ul konsantrasyonunda cDNA sentezi yapıp distile suyla 100 ul'e tamamlandı. -30C'de saklandı. cDNA sentez reaksiyonu koşulları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. cDNA sentezi reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Süre
1.	25 °C	5 dk
2.	30 °C	42 dk
	85 °C	5 dk
3.	8 °C	hold

2.3.3.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Ticari kit protokolüne uygun olarak optimizasyon yapıldıktan sonra elde edilen cDNA'lar araştırılacak gene tekabül eden primer çifti ve probe ile 3 tekrar halinde 96 kuyucuklu plakalara yüklendi ve reaksiyonlar gerçekleştirildi. Kısaca, optimizasyonda en iyi sonuç alınan 4 ul hacimde cDNA örnekleri kuyucuklara yüklendi ve kit tarafından sağlanan qPCR solüsyonundan 2 ul, primer ve probelardan 0.3 ul ve son hacmi 10 ul'ye tamamlamak için PCR-grade su her kuyucuğa eklenerek reaksiyonlar Çizelge 2.3'te gösterilen koşullarda gerçekleştirildi. Sonuçlar cihaz yazılımı üstünden görüntülendi ve kaydedildi.

Çizelge 2.3. Gerçek zamanlı PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Polimeraz Aktivasyonu	95 °C	10 dk	1 cycle
Denatürasyon	95 °C	20 sn	45 cycle
Bağlanma-uzama	60 °C	1 dk	

Kanda çalışılan gen ekspresyonlarında internal kontrol olarak housekeeping gen HBA (human beta actin) kullanılmıştır. Hasta kanlarında kontrole göre relatif ekspresyon ΔC_t yöntemiyle hesaplanmıştır. Dokularda ise yalnızca internal kontrol olarak housekeeping gen HBA kullanılmıştır.

2.3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Verilerin analizinde SPSS 21 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 10.0. Armonk, NY: IBM Corp.) paket programı kullanılmıştır. Değişkenler ortalama $\pm$ standart hata ile yüzde ve frekans değerleri kullanılmıştır. Ayrıca parametrik testlerin ön şartlarından varyansların homojenliği “Levene” testi ile kontrol edildi. Normallik varsayımına ise “Shapiro-Wilk” testi ile bakıldı. İki grup arasındaki farklılıklar değerlendirilmek istendiğinde parametrik test ön şartlarını sağladığı durumda “Student’s t Test”; sağlamadığında ise “Mann Whitney–U testi” kullanıldı. Grupların korelasyonu için “Pearson’s correlation test” kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Çalışmaya toplam testis tümörlü 22 hasta ve yaş olarak benzer 16 sağlıklı gönüllü erkek alınmıştır. Hastaların tamamı cisplatin ile tedavi edilmiştir. Çalışmaya alınan hastaların median yaşı 33.5 (20-51) olarak bulunmuştur. Hastaların özellikleri Çizelge 3.1’de sunulmuştur. Hastaların tamamı BEP kemoterapi şemasıyla tedavi edilmiş, en az 3 kür tedavi almış ve en az 6 aydır remisyonundadır.

Hastaların patolojik değerlendirme sonrası yapılan lenf nodu evrelemeleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır:

- Nx: Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi
- N0: Lenf nodu metastazı yok
- N1: <2cm lenf nodu/nodları
- N2: >2 cm, <5 cm lenf nodu/nodları
- N3: >5cm lenf nodu/nodları

Hastalarda uzak metastaz varlığı aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır:

- M0: Uzak metastaz yok
- M1b: Retroperiton harici lenf nodu veya akciğer metastazı
- M1b: Akciğer dışı visceral metastaz

Tümör çapı sınıflandırılma kriterleri ise aşağıdaki gibidir:

- pT0: Primer tümöre ait bulgu yoktur.
- pT1: Tümör testise sınırlıdır, testis invazyonu olabilir, LVI yoktur.
- pT2: Tümör testise sınırlı ve LVI var veya tunika albuginea pozitif
- pT3: Spermatik kord invazyonu vardır.
- pT4: Skrotum invazyonu vardır.

Hastaların serum belirteçlerine göre sınıflandırılması ise aşağıdaki gibidir:

Sx: Tümör belirteci bilinmiyor

S0: Tümör belirteçleri normal aralıklarda

S1: LDH<1.5xN ve hCG<5000 ve AFP<1000

S2: LDH: 1.5-10xN veya 5000<hCG<50000 veya 1000<AFP<10000

S3: LDH>10xN veya hCG>50000 veya AFP>10000

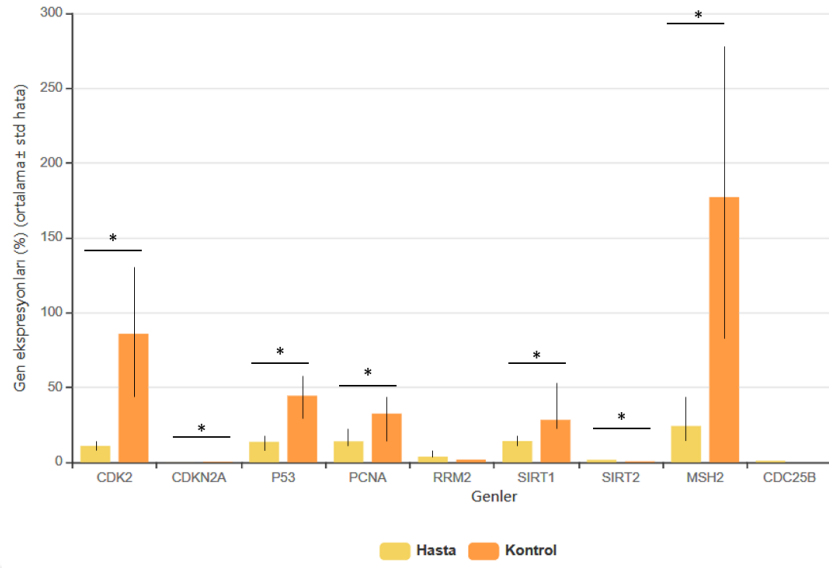
Çizelge 3.1 Çalışmaya alınan hastaların özellikleri

	n (%)
Yaş median	33.5 (20-51)
Tümör Histopatolojisi seminom nonseminom bilinmiyor	9 (40.9) 12 (54.5) 2 (4.5)
Serum belirteçleri S0 S1 S2 S3 Sx	10 (45.5) 6 (27.3) 3 (13.6) 0 3 (13.6)
Metastaz evrelemesi M0 M1a M1b Mx	16 (72.2) 4 (18.2) 0 2 (9.1)
Tümör çapı pT1 pT2 pT3 pT4 pTx	9 (40.9) 9 (40.9) 1 (4.5) 1 (4.5) 2 (9.1)
Lenf Nodu Evresi N0 N1 N2 N3 Nx	8 (36.4) 6 (27.3) 1 (4.5) 4 (18.2) 3 (13.6)

Çizelge 3.2 Hasta ve kontrol grubunda periferik kan mononükleer hücrelerde rölâtif gen ekspresyonları (ortalama± standart hata)

	Hasta Ortalama%	Kontrol Ortalama %	P
CDK2	10.96 ± 7.15	85.91 ± 44.97	0.017
CDKN2A	0.08 ± 0.04	0.33 ± 0.09	0.020
P53	13.64 ± 9.19	44.38 ± 13.23	0.015
PCNA	13.86 ± 10.68	32.52 ± 13.41	0.024
RRM2	3.74 ± 3.15	1.79 ± 0.64	0.065
SIRT1	0.62 ± 0.20	1.53 ± 0.55	0.018
SIRT2	28.22 ± 24.08	14.17 ± 5.05	0.004
MSH2	24.17 ± 17.61	177.24 ± 97.42	0.006
CDC25B	0.89 ± 0.27	0	<0.001

Hasta ve kontrol gruplarının kan mononükleer hücrelerindeki rölâtif gen ekspresyonları Çizelge 3.2 ve Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hastalarda CDK2, CDKN2A, P53, PCNA, SIRT1 ve MSH2 ifadeleri anlamlı olarak az, SIRT2 ve CDC25B ifadeleri anlamlı olarak fazladır.

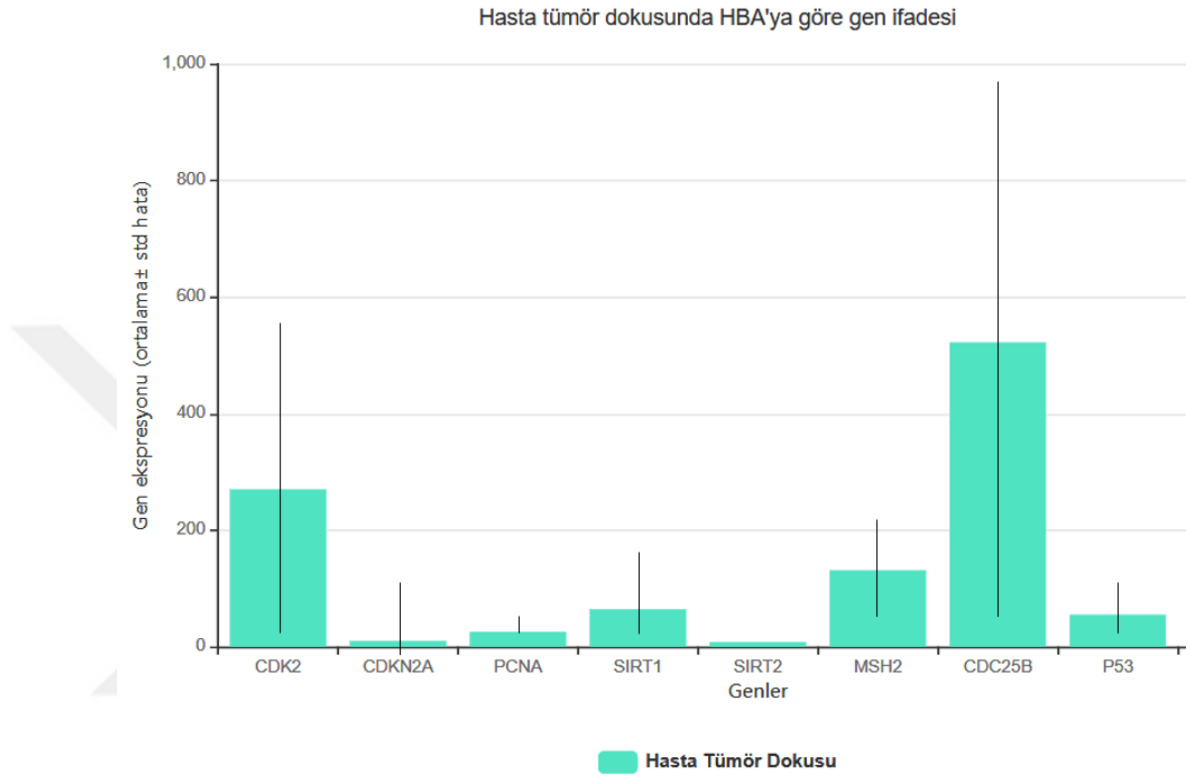


Şekil 3.1 Hasta ve kontrol grubunda periferik kan mononükleer hücrelerde rölatif gen ekspresyonları

Çizelge 3.3 Hasta grubunda testis tümör dokusunda gen ifadeleri yüzdesi (HBA'ya göre) (Ortalama ± Standart hata)

Gen	Ortalama ± Standart Hata %
CDK2	269.73 ± 257.28
CDKN2A	9.50 ± 8.90
PCNA	25.28 ± 17.61
SIRT1	63.93 ± 61.25
SIRT2	7.56
MSH2	130.75 ± 79.55
CDC25B	521.83 ± 451.54

Hastaların dokularında araştırılan gen ifadelerinin housekeeping gen ekspresyonuna göre relatif ortalama değeri ve standart hataları Çizelge 3.3 ve Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Dokudaki Gen İfadelerinin Ortalamaları

3.1. Gen İfadeleri Arasındaki Korelasyon

Dokuda CDK2 ekspresyonu ile dokuda PCNA ($r:0.96$, $p<0.0001$) ve kan mononükleer hücrelerinde SIRT2 ($r:0.77$, $p=0.002$) ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Kan mononükleer hücrelerinde CDK2 ifadesi ile P53 ($r:0.971$, $p<0.0001$), PCNA ($r:0.961$, $p<0.0001$), RRM2 ($r:0.967$, $p<0.0001$), SIRT1 ($r:0.960$, $p<0.0001$), SIRT2 ($r:0.669$, $p=0.001$) ve MSH2 ($r:0.989$, $p<0.0001$) ekspresyonları arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Dokuda CDKN2A ifadesi ile dokuda PCNA ($r:0.989$, $p<0.0001$), dokuda SIRT1 ($r:1.000$, $p<0.0001$), dokuda CDC25B ($r:0.999$, $p<0.0001$) ifadesi arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Dokuda PCNA ifadesi ile dokuda CDKN2A ($r:0.96$, $p<0.0001$), dokuda CDKN2A ($r:0.989$, $p<0.0001$), dokuda SIRT1 ($r:0.987$, $p<0.0001$), kan mononükleer hücrelerinde SIRT2 ($r:0.706$, $p=0.015$) ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Dokuda SIRT1 ekspresyonu ile CDKN2A ($r:1.000$, $p<0.0001$), PCNA ($r:0.987$, $p<0.0001$), MSH2 ($r:0.995$, $p<0.0001$), CDC25B ($r:1$, $p<0.0001$) ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Dokuda MSH2 ifadesi ile doku SIRT1 ($r: 0.995$, $p<0.0001$), kan mononükleer hücrelerinde CDKN2A ($r:0.713$, $p<0.02$), kan mononükleer hücrelerinde SIRT1 ($r:0.804$, $p=0.005$) ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Kan mononükleer hücrelerinde CDK2 ekspresyonu ile P53 ($r:0.971$, $p<0.0001$), PCNA ($r:0.961$, $p<0.0001$), RRM2 ($r:0.967$, $p<0.0001$), SIRT1 ($r:0.960$, $p<0.0001$), SIRT2 ($r:0.669$, $p=0.001$) , MSH2 ($r:0.989$, $p<0.0001$) ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Kan mononükleer hücrelerinde P53 ifadesi ile CDKN2A ($r:0.971$, $p<0.0001$), PCNA ($r:0.980$, $p<0.0001$), RRM2 ($r:0.958$, $p<0.0001$), SIRT1 ($r:0.992$, $p<0.0001$), SIRT2 ($r:0.583$, $p=0.004$) , MSH2 ($r:0.988$, $p<0.0001$) ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Kan mononükleer hücrelerinde PCNA ifadesi ile CDKN2A ($r:0.961$, $p<0.0001$), RRM2 ($r:0.999$, $p<0.0001$), SIRT1 ($r:0.994$, $p<0.0001$), SIRT2 ($r:0.493$, $p=0.020$), MSH2 ($r:0.970$, $p<0.0001$) ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Kan mononükleer hücrelerinde RRM2 ifadesi ile CDKN2A ($r:0.976$, $p<0.0001$), SIRT1 ($r:0.997$, $p<0.0001$), SIRT2 ($r:0.506$, $p=0.019$), MSH2 ($r:0.957$, $p<0.0001$) ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Kan mononükleer hücrelerinde SIRT1 ile SIRT2 ($r:0.514$, $p=0.014$) ve MSH2 ($r:0.976$, $p<0.0001$) ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Kan mononükleer hücrelerinde SIRT2 ile MSH2 ($r:0.667$, $p=0.001$), ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Lenf evrelemesi ile kan mononükleer hücrelerinde CDK2 ($r:0.492$, $p=0.032$), SIRT2 ($r:0.634$, $p=0.004$) ve MSH2 ($r:0.514$, $p=0.024$) ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Tümör çapı ile kan mononükleer hücrelerinde CDC25B ($r:0.529$, $p=0.016$) ifadesi arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

4. TARTIŞMA

Testis kanserleri gençlerde görülen ve kemoterapi ile şifa oranları %90lar civarında olan solid tümörlerdir. Tedavi sonrası bu hastalarda izlenen morbidite ve geç dönemde ortaya çıkan ikincil malignitelerde immün sistem hücrelerinin yaşnamasının rolü olabileceği düşünülmektedir.

Ancak bu konudaki çalışmalar yeterli değildir. Bu tez çalışmamızda özellikle periferik mononükleer hücrelerde yaşlanma ile ilgili olabilecek genlerin ifadelerini testis tümörü nedeniyle kemoterapi alan ve iyileşen hastalar ile bunlarla aynı yaş grubunda sağlıklı gönüllülerde araştırdık.

CDK2 downregülasyonunun hem onkogen uyarımlı hem de DNA hasarı uyarımlı senesant fenotipin bir özelliği olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Alcorta ve ark., 1996; Freedman ve Folkman, 2005; Zalzali ve ark., 2015). Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hastaların kan mononükleer hücrelerinde CDK2 ifadesi anlamlı olarak az bulunmuştur. Bu durum özellikle hastalarda kan mononükleer hücrelerinin proliferatif kapasitelerinin azaldığını ve bunun da immün yaşlanmayla ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Bununla beraber, senesant fenotipin bir diğer özelliği olarak CDK2 ifadesiyle CDK inhibitörleri olan p16INK4A ve p14ARF ifadelerinin negatif korelasyon gösterdiği de bildirilmiştir (Alcorta ve ark., 1996). Bu bağlamda p16INK4A ve p14ARF tümör baskılayıcı proteinlerini kodlayan CDKN2A gen ifadesinde de artma olması beklenebilir. Fakat bizim çalışmamızda ise CDKN2A ifadesinin azaldığı bulunmuştur. Daha aydınlatıcı bir sonuca varabilmek için ilerleyen araştırmalarda diğer temel CDK2 inhibitörü olan p21 ve pRB ifadelerinin de çalışılması aydınlatıcı olabilir (Mitra ve ark. 1999).

Çalışmamızda P53 ifadesinin de azaldığını bulduk (Tablo 3.2.). P53'ün downstream hedefi olan p21'in çalışılması bu çalışmada bulunan azalmış P53 ifadesini P53'e bağımlı senesans mekanizması dışında açıklamaya da yardımcı olabilir.

SIRT1 downregülasyonu prematür senesant fenotipin önemli bir özelliğidir (Ota ve ark., 2007; Pearson ve ark., 2000). Tez çalışmamızda hasta mononükleer hücrelerinde SIRT1 ifadesinin azaldığını bulduk. P53, SIRT1'in substratlarından biridir ve SIRT1 tarafından deasetile edilerek hücre siklusunu yönetir. P53 aktivitesinin SIRT1 tarafından yönetildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Herranz ve ark., 2010; Brooks, 2009). Bu bağlamda P53 ifadesinin azalmış olması SIRT1 ifadesinin azalmasıyla ilişkili olabilir. Nitekim çalışmamızda p53 ve SIRT1 arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

SIRT1 ifadesinin PCNA ile bağlantılı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Sasaki ve ark., 2006). Çalışmamızda da bu iki genin hem kan mononükleer hücrelerindeki ifadeleri hem de dokudaki ifadeleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bununla beraber, bu iki genin tümör çapıyla da pozitif korelasyon gösterdiğini bildiren çalışmalar (Purnomosari, 2014) olmasına karşın bu çalışmada bu genlerin ifadeleri tümör çapıyla ilişkilendirilememiştir.

PCNA bir DNA polimeraz aksesuarıdır ve replikasyonda, tamirde ve siklus progresyonunda çeşitli görevleri olduğu bilinmektedir. Literatürde PCNA'nın CDK2 ile doğrudan kompleks yapmadığını bildiren çalışmalar (De Biasio, 2012) olduğu gibi bu iki genin ifadeleri arasında direkt bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalarda (Koundrioukoff ve ark., 2000) bulunmaktadır. Biz de çalışmamızda kan mononükleer hücrelerinde bu iki genin ifadeleri arasında pozitif korelasyon olduğunu saptadık. Çalışmamızda tümör dokusunda ise benzer bir ilişki saptanamamıştır.

Senesant fenotipi destekleyen gen ifade artışlarının hastaların kronolojik yaşı ile bir ilişkisini saptayamadık. Hasta grubunun yaş dağılım aralığının dar olması

bunda etkili olabileceği gibi kemoterapi veya kanserin kendisi de rol oynamış olabilir. Daha ileri çalışmalarla bu konunun aydınlatılması yararlı olacaktır.

Lenfatik evre (N evresi) ile kan mononükleer hücrelerinde CDK2 ifadesi arasında anlamlı pozitif korelasyon saptadık. Benzer bir ilişki daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Li ve ark., 2001; Li ve ark. 2002). Literatürde çelişkili sonuçlar (Sidler ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2013) bildirilmiş olmakla birlikte biz çalışmamızda kan mononükleer hücrelerinde SIRT2 ve MSH2 arasında pozitif korelasyon saptadık. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

RRM2 DNA hasar yanıtında rol oynayan bir gendir. Bu genin downregüle olması yaşlanma ile ilişkilendirilmiştir. Literatürde RRM2 downregülasyonunun senesant fenotip için gerekli ve yeterli olarak bildirildiği çalışmalar (Aird ve ark., 2013) olmakla beraber knockdown edilmesinin hücre siklusuna girmeye engel olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Aird ve ark., 2013). Aynı zamanda RRM2 overekspresyonunun kötü prognoz belirteci olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (Mazzu ve ark., 2019). Çalışmamızda DNA hasar yanıtının önemli bir elemanı olan RRM2'nin hasta mononükleer hücrelerinde kontrol grubuna göre fazla olduğu bulunmuştur ($p=0.065$) ve bu durum tümör veya kemoterapi kaynaklı artmış hasar yanıtı ile ilişkilendirilebilir.

CDC25 fosfatazlar siklus progresyonunda siklin bağımlı kinazların aktive edilmesinde önemli bir rol oynayan protein ailesidir ve CDC25A, CDC25B ve CDC25C tarafından çok basamaklı ve birden fazla posttranslasyonel mekanizmalı olarak kodlanır. CDC25B'nin mitotik faza geçişte artan bir mitotik regülatör olduğuna ve siklusun bunun dışındaki noktalarında anlamlı değişim göstermediğine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (Lammer ve ark., 1998). CDC25B'nin prognostik değeri de araştırılmıştır ve artmış ifadenin tümör çapı, lenf nodu metastazı, kötü diferansiasyon gibi malignant fenotiplerle pozitif korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2010). Çalışmamızda CDC25B'nin tümör çapı ile ilişkili olduğunun bulunması bu verileri destekler niteliktedir fakat ifadenin lenf nodu

metastazı, serum belirteçleri gibi diğer prognostik belirteçlerle ilişkisi bulunamamıştır.

Çalışmamızda kan mononükleer hücrelerinde MSH2 ifadesinin ortalaması kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. MSH2 yanlış eşleşme tamir mekanizmasının önemli bir üyesidir ve replikasyon hatalarını tespit ederek MLH1-PMS2 protein kompleksiyle düzeltilmesinin öncüsüdür. RAD51 ise çift zincir kırıklarında homolog rekombinasyon yoluyla tamir sağlayan bir proteini kodlar. Çalışmamızda kontrol grubunda RAD51 ifadesi saptanamamış, hasta grubunda ise az sayıda hastada (%13.6) gen ifadesi saptanabilmiştir. Bu tamir genlerinin ifadesinin hasta grubunda az izlenmesinin ve sağlıklı kontrollerde izlenememesi tekniğin hassasiyetinden kaynaklanıyor olabilir. Literatürde P53 ifadesinin RAD51 ifadesiyle pozitif korelasyon gösterdiği (Venkatachalam ve ark., 2017) bildirilmiştir. Bununla beraber literatürde P53 ifadesinin MSH2 ifadesi ile korelasyon gösterdiği ve hatta bu iki gen odağının RAD50 ve RAD51 ile kesiştiği de gösterilmiştir. Nitekim biz de çalışmamızda P53 ile MSH2 arasında pozitif korelasyon olduğunu bulduk ($r:0.988$, $p<0.0001$).

Literatürde azalan SIRT1 ifadesinin SIRT1 inhibisyonu bağımlı hücre ölümüne neden olabileceği ve bunun öncül sebebinin artmış DNA hasarı olabileceği bildirilmiş ve artan DNA hasarının muhtemel sebeplerinden biri olarak MSH tamir elemanlarının ifadesinin yetersizliği tartışılmıştır (Jang et al., 2017). Biz de hastaların hem tümör dokularında SIRT1 ifadesi ile MSH2 ifadeleri arasında hem de hastaların tümör dokularında MSH2 ifadesi ile kan mononükleer hücrelerinde SIRT1 ifadesi arasında korelasyon bulduk. Bu durum azalan hasar yanıtından dolayı hücrelerin DNA hasarının uyardığı senesant halde (DNA damage induced senescent state) veya preapoptotik halde olabileceğini düşündürmektedir. P53 ifadesinin de SIRT1 ile korele halde azalmış olması P53'ten bağımsız senesans veya hücre ölümü mekanizmalarının aktif olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda netlik sağlanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmamızda bleomisin, etoposid ve cisplatin içeren BEP kemoterapi şeması ile tedavi edilmiş ve en az 6 aydır remisyonda olan testis germ hücre tümörlü bireylerde kemoterapinin immün yaşlanmadaki rolü; kemoterapi almamış benzer yaşta sağlıklı kişilerin hücre yaşlanma parametreleri ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Araştırmamızda mRNA düzeyinde CDK2, CDKN2A, CDC25B, RRM2, SIRT1, SIRT2, RAD51, MSH2 ve P53 çalışılmıştır. Yaygın olarak kullanılan Cisplatin bazlı kemoterapinin immün hücrelerinde yaşlılığa bağlı değişikliklerin aydınlatılması hedeflenmiştir.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hastalarda CDK2, CDKN2A, P53, PCNA, SIRT1 ve MSH2 ifadeleri anlamlı olarak azalırken, SIRT2 ve CDC25B ifadeleri anlamlı olarak artmıştır.

Dokuda CDK2 ifadesi ile PCNA ifadesi arasında; CDKN2A ifadesi ile PCNA, SIRT1, CDC25B ifadeleri arasında; PCNA ifadesi ile P53 ve SIRT1 arasında; SIRT1 ifadesi ile MSH2 ve CDC25B ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Kan mononükleer hücrelerinde CDK2 ifadesi ile P53, PCNA, RRM2, SIRT1, SIRT2 ve MSH2 ifadeleri arasında; P53 ifadesi ile CDKN2A, PCNA, RRM2, SIRT1, SIRT2 ve MSH2 ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır.

Lenf evrelemesi ile kan mononükleer hücrelerinde CDK2, SIRT2 ve MSH2 ifadeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir.

Tümör çapı ile kan mononükleer hücrelerinde CDC25B ifadesi arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

Hastalarda CDK2, SIRT1 ve MSH2 downregülasyonunun immün yaşlanmayla ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. CDKN2A ve P53 ifadelerinin azalması ise bunun P53ten bağımsız bir senesans mekanizmasıyla olabileceğini düşündürmektedir. Bu noktada ilerleyen araştırmalarda P21 ve pRB gibi alternatif yolak elemanları araştırılabilir.

Senesant fenotipi destekleyen gen ifade artışlarının hastaların kronolojik yaşı ile bir ilişkisi saptanamamıştır. Bu noktada hasta grubunun yaş dağılım aralığının dar olmasının etkisi olabileceği gibi, tümörün ve kemoterapinin etkisi de olabilir. İlerleyen çalışmalarla bu konunun aydınlatılması faydalı olacaktır.

Çalışmamızda bulunan CDC25B'nin tümör çapıyla korelasyonu literatürü desteklemektedir fakat hasta grubumuzun tamamı halen remisyonda izlendiği için bu gen ifadesinin prognostik değeriyle ilgili bir yorum yapmamız bu aşamada uygun bulunmamıştır.

Takip eden çalışmalarda örneklem sayısının artırılması, doku üzerinde yapılacak çalışmalarda kontrol olarak tümör içermeyen testis dokusunun kullanılması ve araştırılmak istenen parametrelere alternatif yolak elemanlarının da eklenmesi yararlı olacaktır.

ÖZET

Testis Germ Hücre Tümörlü Hastalarda Kemoterapinin İmmün Yaşlanmadaki Rolü

Cisplatin tabanlı kemoterapi şemaları testis germ hücre kanserinin standart tedavisidir. Cisplatinin hücrel yaşlanmayı hızlandırabileceği düşünülmektedir. Bu hastalarda özellikle immün hücrelerde meydana gelebilecek prematür yaşlanma (immunosenesans), kardiyovasküler hastalıklar, enfeksiyon ve ikincil kanserlerden kaynaklı geç mortalitede rol oynayabilir.

Yaşlı immün hücrelerin proliferatif potansiyel, DNA tamir fonksiyonları ve sağkalım sinyalleri gibi yaşla ilişkili parametreleri genç hücrelere göre değişiklik göstermektedir. Bu tezde kemoterapinin moleküler yaşlanma üstündeki rolü, remisyondaki testis germ hücre tümörlü hastaların immün hücrelerindeki yaşla ve siklusla ilişkili biyobelirteçler olan CDK2, CDKN2A, P53, SIRT1, SIRT2, PCNA, RRM2, RAD51, CDC25B ve MSH2 üzerinden araştırılmıştır. Hasta grubunun periferik kan mononükleer hücrelerindeki gen ifadeleri benzer yaştaki sağlıklı gönüllülerle karşılaştırılarak çalışılmıştır. Kandan izole edilen mononükleer hücrelerden ve parafine gömülü tümör bloklarından alınan kesitlerden RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve gen ifadeleri qPCR yöntemiyle tespit edilmiştir.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hastalarda CDK2, CDKN2A, P53, PCNA, SIRT1 ve MSH2 ifadelerinin anlamlı olarak azalırken, SIRT2 ve CDC25B ifadelerinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Genel anlamda tamir elemanları ve siklus elemanlarının ifadeleri arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Lenfatik evreleme ile kan mononükleer hücrelerinde CDK2, SIRT2 ve MSH2 ifadeleri arasında ve tümör çapıyla mononükleer hücrelerdeki CDC25B ifadesi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

Sonuçlarımız hasta mononükleer hücrelerinde prematür senesans olabileceğini ve bunun P53'ten bağımsız bir yolak vasıtasıyla gerçekleşiyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu duruma testis tümörünün kendisinin yol açması mümkün olabileceği gibi, kullanılan kemoterapi ile de ilişkili olabileceğini düşünüyoruz. Daha ileri araştırmalar ile bu konunun aydınlatılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: cisplatin, immünosenesans, testis kanseri

SUMMARY

The Roles of Chemotherapy in Immunosenescence in Testicular Germ Cell Carcinoma Survivors

Cisplatin based chemotherapy regimen is the standard treatment for testicular germ cell carcinoma. Cisplatin is thought to accelerate cellular aging. Immunosenescence in cancer survivors may play a role in cardiovascular diseases, infection and secondary malignancy-related late mortality.

Age-related parameters such as proliferative potential, DNA repair capacity and survival signals of older immune cells differ from those of relatively younger ones. In this thesis, the role of chemotherapy on molecular aging was investigated in testicular germ cell carcinoma survivors with regard to age-related and cell cycle-related biomarkers CDK2, CDKN2A, P53, SIRT1, SIRT2, PCNA, RRM2, RAD51, CDC25B and MSH2. Expressions of abovementioned genes are examined in peripheral blood mononuclear cells in cancer survivors in comparison with healthy volunteers. Mononuclear cells harvested from whole blood and paraffin embedded tumor tissue sections were used to isolate RNA. cDNA synthesis was then performed, and gene expressions were investigated with qPCR.

Compared with control group; CDK2, CDKN2A, P53, PCNA, SIRT1 and MSH2 expressions in cancer survivors displayed a significant decrease whereas SIRT2 and CDC25B displayed a significant increase. In general, cell cycle related genes and repair machinery genes were found to be positively correlated. Lymph node staging and CDK2, SIRT2 and MSH2 expressions in peripheral blood mononuclear cells as well as tumor size and CDC25B expression showed positive correlations.

Our results suggest that the mononuclear cells may be senescent and the underlying pathway may be independent of P53. Testicular tumor itself as well as chemotherapy may be the cause. Further research is needed for clarification.

Keywords: cisplatin, immunosenescence, testicular cancer

KAYNAKLAR

- AFANAS'EV I (2010). Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging—Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. *Aging and Disease*. (1):75–88
- AIRD K, ZHANG G, LI H, TU Z, BITLER B, GARIPPOV A, WU H, WEI Z, WAGNER S, HERLYN M, ZHANG R (2013). Suppression of Nucleotide Metabolism Underlies the Establishment and Maintenance of Oncogene-Induced Senescence. *Cell Reports*, 3(4), pp.1252-1265.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (2018) Testicular cancer [online] Available at: <https://www.cancer.org/cancer/testicular-cancer.html> [Accessed 10 Jan. 2019].
- BAUMANN P, BENSON F, WEST S (1996). Human Rad51 Protein Promotes ATP-Dependent Homologous Pairing and Strand Transfer Reactions In Vitro. *Cell*, 87(4), pp.757-766.
- BECK, S. (2010). Management options for stage 1 nonseminomatous germ cell tumors of the testis. *Indian Journal of Urology*, 26(1), p.72.
- BJORKSTEN J, TENHU H (1990). The crosslinking rheory of aging—added evidence. *Exp Gerontol.*; 25(2):91-5
- BOURLON M, VELAZQUEZ H, OROZCO BL, HINOJOSA J, RIOS-CORZO R, LIMA G, LLORENTE L, ATISHA-FREGOSO T (2018) Collateral damage: Molecular aging and p16INK4a senescence protein in testicular cancer survivors treated with chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 36, pp.548-548.
- BROOKS CL, GU W (2009). How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 123–128.
- BRYN K, VANFLETEREN JR, BRAECKMAN BP (2007) Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, 42(9), pp.845-851.
- CAMPISI J (2000). Cellular Senescence, Aging and Cancer. *TheScientificWorldJOURNAL*, 1(S3), pp.65-65.
- CAMPISI J (2013). Aging, Cellular Senescence and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 2013. 75:685–705
- CHOVANEC M, ABU ZAID M, HANNA N, EL-KOURI N, EINHORN LH, ALBANY C (2017). Long-term toxicity of cisplatin in germ-cell tumor survivors, *Annals of Oncology*, Volume 28, Issue 11, 1 November 2017, Pages 2670-2679.
- CORNELIUS EA (1972) Increased incidence of lymphomas in thymectomized Mice - evidence for an immunological theory of aging. *Experientia*, 28(4), pp.459-459.
- DUALE N, LINDEMAN B, KOMADA M, OLSEN A, ANDREASSEN A, SODERLUND E, BRUNBORG G (2007). Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles. *Molecular Cancer*, 6(1), p.53.
- DAVIDOVIC M, SEVO G, SVORCAN P, MILOSEVIC DP, DESPOTOVIC N, ERCEG P (2010). Old age as a privilege of the “selfish ones” *Aging and Disease*. 1:139–146.

- ESPINO J, PARIENTE J, RODRIGUEZ A (2012). Oxidative Stress and Immunosenescence: Therapeutic Effects of Melatonin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, pp.1-9.
- FULOP T, FRANCESCHI C, HIROKAWA K, PAWELEC G (2009). Handbook on Immunosenescence. Dordrecht: Springer, Netherlands, pp.263-265
- GAROLLA A, PIZZOL D, BERTOLDO A, GHEZZI M, CARRARO U, FERLIN A, FORESTA C (2012). Testicular cancer and HPV semen infection. *Frontiers in Endocrinology*, 3.
- HANAHAN D, WEINBERG RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-74.
- HAYFLICK L, MOORHEAD P (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), pp.585-621.
- HERRANZ D, MUNOZ-MARTIN M, CANAMERO M, MULERO F, MARTINES-PASTOR B, FERNANDEZ-CAPETILLO (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun*; 1: 3.
- JIN K (2010). *Modern Biological Theories of Aging* Aging Dis. 2010 Oct; 1(2): 72–74.
- KELMAN Z (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6), pp.629-640.
- MC AULEY M, GUIMERA A, HODGSON D, MCDONALD N., MOONEY K, MORGAN A, PROCTOR C (2017). MODELLING THE MOLECULAR MECHANISMS OF AGING. *BIOSCIENCE REPORTS*, 37(1).
- MITRA J (1999). INDUCTION OF P21(WAF1/CIP1) AND INHIBITION OF CDK2 MEDIATED BY THE TUMOR SUPPRESSOR P16(INK4A). *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (2018). Genetics Home Reference. Available at: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/> [Accessed 9 Jan. 2018].
- OTA H, AKISHITA M, ETO M, IJIMA K, OUCHI Y (2007) Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* (43): 571–579.
- PEARSON M, CARBONE R, SEBASTIANI C, CIOCE M, FAGIOLI M, SAITO S (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*; 406: 207–210
- RADERSCHALL E, STOUT K, FREIER S, SUCKOW V, SCHWEIGER S, HAAF T (2002). Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res*. 2002 Jan 1;62(1):219-25.
- SANOFF H, DEAL A, KRISHNAMURTHY J, TORRICE C, DILLON P, SORRENTINO J, IBRAHIM J, JOLLY T, WILLIAMS G, CAREY L, DROBISH A, GORDON B, ALSTON S, HURRIA A, KLEINHANS K, RUDOLPH K, SHARPLESS N, MUSS H (2014). Effect of Cytotoxic Chemotherapy on Markers of Molecular Age in Patients with Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106(4).
- SASAKI T, MAIER B, BARTKE A, SCRABLE H (2006) Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal. *Aging Cell*; 5: 413-422.

- SIDLER C, WÓYCICKI R, ILNYTSKYI Y, METZ G, KOVALCHUK I AND KOVALCHUK O (2013) Immunosenescence is associated with altered gene expression and epigenetic regulation in primary and secondary immune organs. *Front. Genet.* **4**:211
- SOPHIE D, ETHEL G, GRACA MD, CHEN JINBO, MCGLYNN KA, SCHONFELD S, STORM H, HALL P, HOLOWATY E, ANDERSEN A, JOENSUU H, ANDERSSON M, KAIJSER M, GOSPODAROWICZ M, COHEN R, PUKKALA E, TRAVIS LB (2007) Noncancer Causes of Death in Survivors of Testicular Cancer, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 99, Issue 7, 4 Pages 533–544
- SULLIVAN M.R.; BERNSTEIN K.A. (2018) RAD-ical New Insights into RAD51 Regulation. *Genes* 2018 **(9)** 629.
- UNIPROT (2018). Homo sapiens (Human) - SIRT2 gene & protein. [online] Available at: <https://www.uniprot.org/uniprot/> [Accessed 10 Jan. 2019].
- VAN HEEMST D (2010) Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging and Disease.* **(1)**147–157.
- VENTURA M, CASCIARO M, GANGEMI S, BUQUICCHO R (2017) Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clinical and Molecular Allergy*, **15**(1).
- WEYAND C, GORONZY K (2016). Aging of the Immune System. Mechanisms and Therapeutic Targets. *Annals of the American Thoracic Society*, **13**, pp. S422-S428.
- WOOD W, KRISHNAMURTHY J, MITIN N, TORRICE C, PARKER J, SNAVELY A, SHEA T, SERODY J, SHARPLESS N (2016). Chemotherapy and Stem Cell Transplantation Increase p16 INK4a Expression, a Biomarker of T-cell Aging. *EBioMedicine*, **11**, pp.227-238.

EKLER

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Testis Germ Hücre Tümörlü Hastalarda Kemoterapinin İmmün Yaşlanmadaki rolü
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Yeniyon Numarası	Dış
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	☐		
	ILAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:06-359-18	Tarih:16 Mart 2018		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşımlar ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Prof.Dr.Irfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Leyla YAZICIOĞLU	Kalp ve Damar Cerrahisi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Inci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Zaife ŞENOCAC	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Derya GÖKMEN	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Yrd.Doç.Dr.Ali Doğan DURSUN	Fizyoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Yrd.Doç.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	H.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
İffet BERKTAŞ	Matematik Mühendisliği	Türkiye Kömür İşletmeleri Genel Müdürlüğü	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	

*Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Aslı BOZER ÇİFTÇİ
A.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Aslı Gibidir

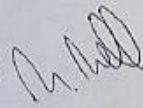
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Testis Germ Hücre Tümörlü Hastalarda Kemoterapinin İmmün Yaşlanmadaki rolü
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 393 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Yüksel ÜRÜN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Onkoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alımları için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
		FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 4	☐			
	Gözetimsel ilaç çalışması	☐			
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐			
	In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐			
	İlaç dışı klinik araştırma	☐			
	Diğer ise belirtiniz:				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:



Aslı BOZER ÇİFTÇİ
A.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Başlı Gibidir

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Ek.2. Etik Kurul Kararı

ÖZGEÇMİŞ

I – Bireysel Bilgiler

Ad: Tutku

Soyad: Ünver

Uyruk: T.C.

Doğum Yılı: 1991

E-mail: tutkuunver@gmail.com

II – Eğitim

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları ABD, Tıbbi Onkoloji BD, Tümör Biyolojisi Yüksek Lisans Programı, Ankara

Lisans: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Lisans Programı, Ankara

Lise: Aydın Fen Lisesi

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi, ANKARA

III-Yabancı Dil:

İngilizce – Çok iyi (IELTS: 8.5/9)

Almanca – Orta

IV– Bilimsel Etkinlikleri

Projeler ve burslar

2019 Testis Germ Hücre Tümörlü Hastalarda Kemoterapinin İmmün Yaşlanmadaki Rolü. BAP - Ankara Üniversitesi, Lisansüstü Tez Projesi

2017 Kanser Tedavisinde İmmün Denetim Noktalarını Hedefleyen Adenoviral Gen Tedavisi Vektörleri Geliştirilmesi. (TÜBİTAK 1001-116S565, bursiyer)

- 2016** Bioremediation: Cobalt and Cadmium Resistance and Memory Retention in *Aeromonas hydrophila*. (senior project)
- 2015** An Analysis On Modern Behavioral Concepts That Relate The Cost Of A Behavior To Its Benefit.
An Analysis On Hamilton's Rule According To Which Natural Selection Should Favor Altruism.
Tissue Engineering for Cannabis spp. Cultivation.
- 2014** Behavioral Pharmacology: Understanding Commercial Drugs and Drug Design.
Behavioral Pharmacology: Understanding Illicit Drugs and Human Drug Metabolism.
Understanding Echolocation In Bats.
- 2013** Effects of Binaural Beats on Cognitive Abilities.
An Analysis On Various Sleeping Patterns in Humans.
Field analysis on METU Campus Flora.
- 2012** Understanding the Concept of Randomness – A Biological Approach.
- 2008** Selülozun Glikoza *Aspergillus niger* Enzimleriyle Hidrolizi.

V-Bilimsel Ödüller

- 1.lik ödülü, Türk Onkoloji Grubu Derneği Ulusal Araştırma Projeleri Yarışması, Testis Germ Hücre Tümörlü Hastalarda Kemoterapinin İmmün Yaşlanmadaki Rolü.
- 1.lik ödülü, Dokuz Eylül Üniversitesi Ulusal Proje Yarışmaları, Selülozun Glikoza *Aspergillus niger* Enzimleriyle Hidrolizi.
- 2.lik ödülü, TÜBİTAK-GYTİ Ulusal Proje Yarışmaları, Selülozun Glikoza *Aspergillus niger* Enzimleriyle Hidrolizi.

VI-Bilişim Teknolojileri

- 2016** E2E Encryption and How to Make the Most Out of It
Mapping of Frequently Used Passwords and PINs on Regional Basis
Retrieving Frequently Used Passwords and PINs of Working Age Population
- 2015** Tempest Attacks Regarding Household Electronic Devices
An Analysis On Concepts of Cyber Security Regarding End Users
A Brief Introduction to Man in the Middle Attacks and How to Prevent Them
Nonce or No Nonce, That Is The Question
- 2014** Possible Flaws of SS7 Protocol and M3UA Standards Via Illicit Mapping
An Analysis on Air Gap Malwares
Introduction to Advanced Cyber Security for Professionals
P2P Networks and What Lies Beyond
Social Engineering: Why the Security Flaws Cannot Be Truly Fixed
- 2013** How Human Element Threatens Cyber Security of Many
Exit Nodes of TOR: Is It Truly Safe?
Cookie Collection Through Session Sniffing and An Introduction to Injection
Protection Against Session Sniffing
Disguising Text Using Hex Analysis
An Analysis on Cryptocurrencies and Blockchain
- 2012** Automated Food Dispenser for Stray Animals
Common Attacks Against Websites Built via Frequently Used CMSs
The Blockchain Standard Infrastructure for Security Experts