

Metastatik Akciğer Kanserli Hastaların Periferik Kanında Yeni Aday Biyomarker: Yüksek DICER1 Ekspresyon Düzeyi

Mukaddes A. SARAL¹, Nurcan ÇIRAK², Gözde K. TÜRKCAN³, Demet A. ÖDEMİŞ⁴, Şeref Buğra TUNÇER⁵, Seda K. ERCİYAS⁶, Özge Ş. ERDOĞAN⁷, Makbule TAMBAŞ⁸, Hülya YAZICI⁹

ÖZ

Amaç: Akciğer kanseri, dünyada kansere bağlı insidans ve mortalite açısından birinci sırada yer almaktadır. Kanserin multifaktoriyel bir hastalık olması nedeniyle kanserle ilişkili mekanizmaların aydınlatılmaya çalışılması oldukça önem taşımaktadır. Kanserle yakından ilgili olan miRNA aktivitesinin çeşitli mekanizmalarla bozulduğu bilinmektedir. Bu mekanizmalardan biri de miRNA işlenmesi sırasında meydana gelen moleküler değişikliklerdir. DICER1, microRNA biyogenezinde önemli bir yere sahiptir. Çalışmamızda, akciğer kanserli hastaların periferik kan lenfositlerinde *DICER1* gen ifade

^{1*} İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kansere Genetiği Bilim Dalı Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ph.D. Mukaddes AVŞAR SARAL.,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5489-9088>,

İstanbul Aydın Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İlk ve Acil Yardım Programı

² İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kansere Genetiği Bilim Dalı, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5974-4731>,

³ İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kansere Genetiği Bilim Dalı, ORCID: <https://orcid.org/orcid.org/0000-0003-0964-4817>,

⁴ İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kansere Genetiği Bilim Dalı, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2271-8481>,

⁵ İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kansere Genetiği Bilim Dalı, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8023-3223>,

⁶ İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kansere Genetiği Bilim Dalı, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4417-4005>,

⁷ İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kansere Genetiği Bilim Dalı, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0893-1251>,

⁸ İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Klinik Onkoloji Anabilim Dalı, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2464-0101>

⁹ İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kansere Genetiği Bilim Dalı, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8919-0482>,

Makale Geliş Tarihi / Received: 10.3.2020 – Makale Kabul Tarihi / Accepted: 4.4.2020

Doi Num: [10.17932/IAU.ASD.2015.007/asd_v06i2003](https://doi.org/10.17932/IAU.ASD.2015.007/asd_v06i2003)

düzeyinin sağlıklı kişilerle karşılaştırılarak metastatik akciğer kanseri gelişimindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışma grubu yeni tanı almış ve daha önce hiç tedavi görmemiş 47 akciğer kanserli hasta ile 45 sağlıklı kişinin periferik kan örneklerinden oluşturuldu. Araştırılan *DICER1* hedef geni, *HPRT1* referans geni ile eş zamanlı olarak Gerçek-Zamanlı PCR yöntemiyle incelendi. Akciğer kanser hastalarına ait gen ekspresyon düzeyi ile sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubu *DICER1* gen ekspresyon sonuçları karşılaştırıldı. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak değerlendirildi.

Sonuçlar: Akciğer kanser hastalarının periferik kan lenfositlerinde *DICER1* gen ifade düzeyinin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) kontrol grubuna göre 1,756 kat arttığı, bu artmış ekspresyon düzeyinin istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0,05$) olduğu görüldü.

Tartışma: Metastatik akciğer kanserli hastaların periferik kan lenfositlerinde yapılan çalışmamızdan çıkan sonuçlar literatürde tümör dokusunda yapılan çalışma ile korelasyon göstermektedir. Bu bağlamda periferik kan lenfositlerindeki *DICER1* ekspresyon düzeyinin, metastatik akciğer hastalarının tümör dokusundaki *DICER1* gen ekspresyon düzeyi hakkında bilgi vereceğini ve dokusuna ulaşamayan hastalar için iyi bir uygulama olacağını düşündürmektedir. Ayrıca çalışma literatürde akciğer kanserli hastaların periferik kan örneklerinde *DICER1* ekspresyonunun araştırıldığı ilk çalışma niteliği taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, *DICER1*, Metastaz, Gen ekspresyonu

A New Candidate Biomarker in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Lung Cancer: High DICER1 Expression Level

ABSTRACT

Objective: Lung cancer is in the first place in the world in terms of cancer-related incidence and mortality. Since cancer is a multifactorial disease, it is very important to try to illuminate the mechanisms associated with cancer. It is known that miRNA activity, which is closely related to carcinogenesis, is impaired with various mechanisms. One of these mechanisms is the molecular changes that occur during miRNA process. DICER1 has an important function in microRNA biogenesis. In our study, it was aimed to investigate the effect of *DICER1* gene expression level on metastatic lung cancer development.

Material and Method: The study groups consist of peripheral blood samples of 47 patients with metastatic lung cancer who had recently been diagnosed but had never been treated and 45 healthy people. The investigated *DICER1* target gene was examined simultaneously with the *HPRT1* reference gene by using the Real-Time PCR method. The results of *DICER1* gene expression levels of patients and those of healthy individuals were compared. The results were evaluated by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Results: The expression level of *DICER1* gene in the peripheral blood lymphocytes of patients with metastatic lung cancer was increased by 1.756 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) fold compared to the healthy control group and the increased expression level was statistically significant, $p < 0.05$.

Discussion and Conclusion: The results of our study were found correlated with the results of the study on tumor tissue of lung cancer in the literature. In this context, it is suggested that *DICER1* expression in the peripheral blood lymphocytes will provide information about the level of *DICER1* expression in tumor tissue of metastatic lung patients whose tissues cannot be reached. In addition, the study is the first to investigate *DICER1* expression in the peripheral blood samples of lung cancer patients.

Keywords: Lung cancer, *DICER1*, Metastasis, Gene expression

Giriş

Akciğer kanseri, dünya genelinde en yaygın görülen ve kansere bağlı ölümlerin başında gelen kanser çeşididir. Globocan 2018 kanser istatistiği verileri; dünya çapında her iki cinsiyette de toplam 18,1 milyon yeni kanser vakası arasında en sık görülen kanser türü olarak %11.6 (2,1 milyon) ve toplam kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olarak %18.4'lik oranla (1,8 milyon kişi) akciğer kanserini göstermektedir. Erken teşhis ve standart tedavideki gelişmelere rağmen, çoğu hasta metastatik veya ileri bir aşamada teşhis edilmekte ve kötü prognoz göstermektedir. Bu nedenle genel olarak akciğer kanserinin 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %15 düzeyinde seyretmektedir (Cagle, Allen, & Olsen, 2013).

Akciğer kanserinin histopatolojik olarak doğru sınıflandırılması uygun tedavinin başlatılması için çok kritiktir. Son yıllarda genetik yönden *EGFR*, *EML4-ALK*, *KRAS*, *ROS1*, *BRAF* gen analizleri gibi moleküler düzeyde gerçekleştirilen incelemeler de histopatolojik sınıflamaya yardım etmektedir. Ayrıca tümör hücrelerinin genetik yapısını ortaya çıkaran bu moleküler testler, kişiselleştirilmiş hedefe yönelik tedavi seçeneklerini de ortaya koymaktadır (Chatziandreou et al., 2015; Cheng et al., 2012; Villalobos & Wistuba, 2017). Histolojik olarak akciğer kanserlerinin çok büyük bir kısmı epitelyal kökenlidir ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki ana alt tipe ayrılmaktadır. KHDAK'leri akciğer kanserlerinin %80-85'ini oluşturmakta olup adenokarsinom (%50-60), skuamöz hücreli karsinom (%30-35) ve büyük hücreli karsinom (%10-15) olmak üzere 3 temel alt tipte sınıflandırılmaktadır (Cagle et al., 2013).

Sigara içmek, akciğer kanserli hastaların %85'i için en yaygın etiyolojik faktördür. Bununla birlikte hiç sigara içmeyenlerde teşhis edilen akciğer kanseri vakalarının sayısı da son zamanlarda artış göstermektedir. Genel popülasyonda sigara içme alışkanlıklarında bir azalma eğilimi görülse de, gelecekte akciğer kanserinin önemli bir sağlık sorunu olarak devam edeceği aşikârdır (Ramalingam, Owonikoko, & Khuri, 2011; Wakelee et al., 2007). Diğer taraftan düşük veya orta gelirli ülkelerde sigara içme oranının daha yüksek olması nedeniyle akciğer kanserine bağlı ölümlerinin %50'sinden fazlasının daha az gelişmiş olan bu ülkelerde meydana

geleceği tahmin edilmektedir (Torre, Siegel, & Jemal, 2016). Akciğer kanserinin oluşumunda etkili olan diğer epidemiyolojik faktörler arasında yaş, cinsiyet, etnik ve coğrafik faktörler, sosyoekonomik durum, diyet, obezite, radyasyon ve hava kirliliği gibi çevresel maruziyetler, asbestos gibi mesleki maruziyetler, Human Immunodeficiency Virus (HIV), Human Papilloma Virüsü (HPV) gibi viral enfeksiyonlar, KOAH, astım, bronşit, amfizem, pnömoni gibi daha önce geçirilmiş akciğer hastalıkları, genetik yatkınlık yer almaktadır (Alberg, Ford, Samet, & American College of Chest, 2007; Bade & Dela Cruz, 2020; Malhotra, Malvezzi, Negri, La Vecchia, & Boffetta, 2016).

İnsanlarda *DICER1* geni, 14q32.13 kromozomu üzerinde 27 ekzondan oluşan, 1922 amino asit içeren bir moleküldür. *DICER1*, mikroRNA'ların (miRNA) olgunlaşmasından sorumlu olan tip III sitoplazmik endoribonükleazdır. Ayrıca RNA interferens mekanizmalarındaki çeşitli etkileşimler için bir yapı (scaffold) görevi görmektedir. *DICER1* geninde oluşan hasarlar, embriyogenez, farklılaşma ve homeostazdan kansere kadar farklı birçok olayda fonksiyonel bozukluklar ile sonuçlanır (Foulkes, Priest, & Duchaine, 2014). *DICER* ve mikroRNA ilişkisi en iyi miRNA'ların oluşum mekanizması üzerinden açıklanabilir. Buna göre miRNA'lar DNA molekülünden öncelikle pri-miRNA olarak oluşurlar. Ardından çeşitli enzimlerin yardımı ile işlenerek kısa sap ve ilmik yapısından oluşan pre-miRNA'ya dönüştürülürler. En son pre-miRNA, RNase III Dicer enzimi tarafından yaklaşık 22 nükleotidlik çift zincirli miRNA'ya dönüştürülür. miRNA dubleksinden sadece bir zincir RISC kompleksine (RNA-indüklenmiş susturma kompleks/RNA-induced silencing complex) dahil olur. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan Argonaute'un etkisiyle bu iki iplikten daha kararlı olanı seçilerek komplekse dahil edilir. Bu iplik kılavuz iplik olarak adlandırılır. Tek zincirli miRNA'yı içeren aktif haldeki RISC baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanarak, ya Argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olur. *DICER1* aynı zamanda RISC kompleksi oluşumunu başlatır. Bu kompleks miRNA ifadesi ve RNA interferans aracılı oluşturulan gen susturulmasından sorumludur. Ek olarak olgun miRNA hedef genlerinin gen ifadesinde de düzenleyici rol oynamaktadır (Iwakawa & Tomari, 2015; Macfarlane & Murphy, 2010). Birçok çalışmada

miRNA'larda gösterilen genomik değişikliklerin kanserle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lee et al., 2019; Rupaimoole & Slack, 2017; Zhang et al., 2006). miRNA'lar, gelişme ve farklılaşmadaki temel rolleri, tümör oluşumunun altında yatan biyolojik mekanizmalarla ilişkileri, stabilitesi ve kolay tespiti nedeniyle, doku ve kan bazlı likit biyopsi niteliği taşıyan kanser biyobelirteçleri sınıfını temsil etmektedirler (Boeri, Pastorino, & Sozzi, 2012). miRNA'ların kansere nasıl katkıda bulunduğu daha iyi anlaşıldıkça, bu küçük moleküllerin tümörlerin sınıflandırılmasında, erken tanı ve tedavinin takibinde biyobelirteçler olarak ve kişiselleştirilmiş-hedefe yönelik potansiyel terapötik uygulamalar için benzersiz hedefler olarak kullanılma olasılıkları da git gide artacaktır (Erson & Petty, 2009). Özellikle akciğer kanseri ile ilgili araştırmalarda yapılan çalışmalarda balgamda, plazmada, serumda veya tam kanda bulunan miRNA'lar son 10 yılda kanserlerin erken tespiti için non-invaziv biyobelirteçler olarak giderek daha fazla ilgi odağı olmuştur (Del Vescovo & Denti, 2015). Ayrıca miRNA biyogenezinde rol alan DICER1, DROSHA, DGCR8, ve AGO2 gibi moleküllerde görülen düzensizliklerin de karsinogenez, kanser kemosenesitivitesi, anjiyogenez, metastaz, proliferasyon ve migrasyon ve kanserli hastaların prognozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Chen et al., 2017; Gurtner, Falcone, Garibaldi, & Piaggio, 2016; Lee et al., 2019; To et al., 2017).

Aslında birçok kanserde aynı anda çok sayıda genin ekspresyon düzeyinin değiştiği ve bu değişikliklerde miRNA'ların etkisinin çok fazla olduğu, bu nedenle akciğer kanseri gibi dokuya ulaşılmasının zor olduğu durumlarda likit biyopsi ya da periferik kandaki biyolojik markerların hastalığın tanısından tedavisine hatta kemoteröpatik ajanın seçimine kadar birçok aşamada çok önemli olduğu, akciğer kanserini takibinde ve tanısının koyulmasında bu tür biyolojik moleküllere ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir. Çalışmamızda akciğer kanserli hastaların periferik kan örneklerinde, miRNA'ların biyogenezinden sorumlu olan *DICER1* geninin ekspresyonundaki değişikliklerin tanısal ve prognostik değerinin araştırılması ve non-invazif bir biyomarker niteliği taşıyıp taşımadığı değerlendirilmiştir.

Materyal ve Metot

Çalışma, “07.02.2012 tarihli ve 04 sayılı Etik Kurul toplantısında” etik yönden uygun görülmüş ve İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Araştırma Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubu 2012-2013 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Klinik Onkoloji Anabilim Dalı’na başvuran yeni tanı almış ve daha önce hiç kanser tedavisi görmemiş 47 metastatik akciğer kanserli hastanın periferik kan örneklerinden oluşturuldu. Kontrol grubu olarak 45 sağlıklı kişinin periferik kan örnekleri kullanıldı. Etik kurul onayı sonrası, kan ve numune alım işlemlerinden önce hastalara ve kontrol grubu olarak kullanılacak sağlıklı gönüllülere bilgilendirilmiş onay formu imzalatılmıştır. Hasta gruplarının cinsiyete göre yaş ortalaması kadın hastalarda 57 ($\pm 3,7$) ve erkek hastalarda 59 (± 5)’dur. Sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması ise kadınlarda 58 ($\pm 4,2$); erkeklerde 56 ($\pm 6,9$) şeklindedir. Hasta grubuna ait özellikler Tablo 1’de gösterilmektedir.

Çalışmada hasta ve sağlıklı kontrol grubundan alınan 10 mL kan örneklerinden ilk önce lenfositler ayrıştırıldı. Ayrıştırılan lenfositlerden total RNA izole edildi. Bu RNA örneklerinden Ters Transkriptaz yöntemiyle cDNA sentezi gerçekleştirildi. Araştırılan *DICER1* hedef geni, *HPRT1* referans geni ile eş zamanlı olarak Real Time PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Çoğalan gen ürünlerinin tespit edilebilmesi için SYBR-Green floresan boyası kullanıldı. Son olarak hastalara ait gen ifade düzeyi sonuçları ile sağlıklı kişilerin sonuçları karşılaştırıldı. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak değerlendirildi.

Periferik Kandan Lenfosit Ekstraksiyonu

Çalışma grubundan EDTA’lı tüpe alınan 10’ar mL kan örnekleri 2 mL Ficoll üzerine yüklendi ve 1910 RPM’de 30 dk. santrifüj edildi. Santrifüjleme sonucunda orta fazında toplanan lenfositler pastör pipet yardımıyla temiz bir tüpte toplandı. 1910 RPM’de tekrar 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine PBS eklenerek çözüldü. Çözülmüş pellet kriyo tüplere aktarıldı. Kriyo tüpler 1910 RPM’de 4 dk. santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. Elde edilen hücreler -80°C derin dondurucuda RNA ekstraksiyonu aşamasına kadar saklandı.

Lenfositten RNA Ekstraksiyonu

Lenfosit pelleti üzerine 1 mL Trizol (Tripure İsolation Agent) eklendi. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. 200 µL kloroform eklendi ve vortekslendi. Oda ısısında 2-15 dk inkübe edildi. +4°C'de 12,000 g'de 15 dk santrifüj yapıldı. Üstteki şeffaf faz yeni bir 1,5 mL'lik polipropilen santrifüj tüpüne alındı, 500 µL izopropanol eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5-10 dk inkübe edildi. +4°C'de 12,000 g'de 10 dk santrifüj yapıldı. Tüplere 1'er mL %75'lik etanol eklendi, 3 saniye vortekslendi. +4°C'de 7500g'de 5 dk santrifüj yapıldı ve sıvı faz uzaklaştırıldı. RNA'dan alkolü uzaklaştırmak için, numuneler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Pellet 25 µL RNaz-free su ile çözüldü ve 56°C'de 10-15 dk inkübe edildi. Ekstrakte edilen RNA'lar -80°C'ye porsiyonlanarak (aliqout) kaldırıldı.

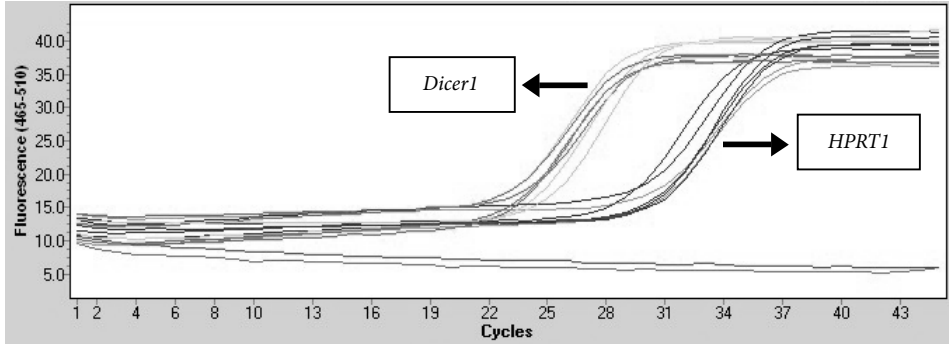
RNA Kalite Kontrolü ve cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinin saflık ölçümleri NanoDrop 2000 Spektrofotometre [THERMO SCIENTIFIC] cihazı kullanılarak yapıldı. Elde edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu A260/A280 nm dalga boylarındaki ölçülen absorbans değerlerine göre belirlendi. Absorbans değeri 1.6-2.0 OD aralığında olan RNA'lar saf/uygun RNA örnekleri olarak bir sonraki aşama için işleme alındı.

Real Time PCR reaksiyonu için Ters Transkriptaz enzimi kullanılarak RNA'dan cDNA sentezlendi. Bu aşamada Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit [THERMO] protokolü uygulandı.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Gen İfadelerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada araştırdığımız genlerin anlatım düzeyleri LightCycler 480II'de (Roche, Mannheim, Germany) Real Time PCR kullanılarak analiz edildi. Reaksiyon sırasında çoğalan gen ürünlerinin saptanabilmesi için SYBR Green floresan boyası kullanıldı. Grupların periferik kan örneklerinden elde edilen cDNA örnekleri hedef ve referans genlerine ait primerler kullanılarak yapılan gerçek-zamanlı PCR işlemine tabi tutuldu ve hasta grupları ile sağlıklı kontroller arasında var olan gen ifade düzeyi değişiklikleri tespit edildi. Örneklerle ait gen ifade düzeylerini gösteren gerçek-zamanlı PCR grafikleri Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1: Akciğer kanserli hastaların periferik kan örneklerine ait DICER1 ve HPRT1 referans geninin RT-PCR eğrileri

Hasta grubuna ait *DICER1* gen ifadesinin kontrol grubuna göre ne kadar oranda arttığı ya da azaldığı *HPRT1* gen ifadesi referans alınarak belirlendi. Gen ekspresyon düzeyinin hesaplandığı formül aşağıdaki gibidir:

$$\Delta C_T = C_T (\text{hedef gen}) - C_T (\text{referans gen})$$
$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T (\text{hasta}) - \Delta C_T (\text{sağlıklı kontrol})_{\text{ort}}$$
$$2^{-\Delta \Delta C_T} = 2^{-[(C_T \text{ hedef} - C_T \text{ ref})_{\text{hasta}} - (C_T \text{ hedef} - C_T \text{ ref})_{\text{kontrol}}]}$$

İstatistiksel Analiz

SPSS v16.0 programı ile yapılan istatistiksel analizlere göre; araştırma kapsamında incelenen gruplar arasındaki dağılımın normallik varsayımı Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Kolmogorov-Smirnov testinde Z değeri $p > 0,05$ büyük olduğu için (Kolmogorov-Smirnov $Z = 1,483$; $p > 0,05$), grupların normal dağılım gösterdikleri ve verilerin çözümlenmesinde ANOVA testinin kullanılmasının uygun olduğu görüldü. ANOVA testi ile yapılan değerlendirmeye göre hasta ve kontrol grupları arasındaki $2^{-\Delta \Delta C_T}$ değerleri kullanılarak yapılan analizlerde artmış *DICER1* ifade düzeyinin, hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0,05$) olduğu görüldü.

Sonuç

Çalışma grubumuzdaki akciğer kanser hastalarının tamamı tanı anında metastatik hastalığı olan Evre IV hastalardan oluşmaktadır. Bu hastaların %92,5'i tanı anında kemik metastazına sahipken %7,5'i ise beyin metastazına sahiptir. Hastaların %92,5'i KHDAK histolojisi, %7,5'i ise

KHAK histolojisi taşımaktadır. Akciğer kanser hastalarının %88,7'sinin 10 yıldan fazla sigara kullanma öyküsü bulunurken, sadece %11,3 gibi çok az bir bölümünde sigara kullanma öyküsü bulunmamaktadır. Hastaların 3 kuşak geriye gidilerek yapılan ailedeki kanser öykülerinin sorgulanmasından elde edilen bilgilere göre hasta alt gruplarında bir özellik saptanmadığı görülmüştür. Hastalar arasında alkol kullanan ve kullanmayanların dağılımının ise birbirine çok yakın olduğu izlenmiştir.

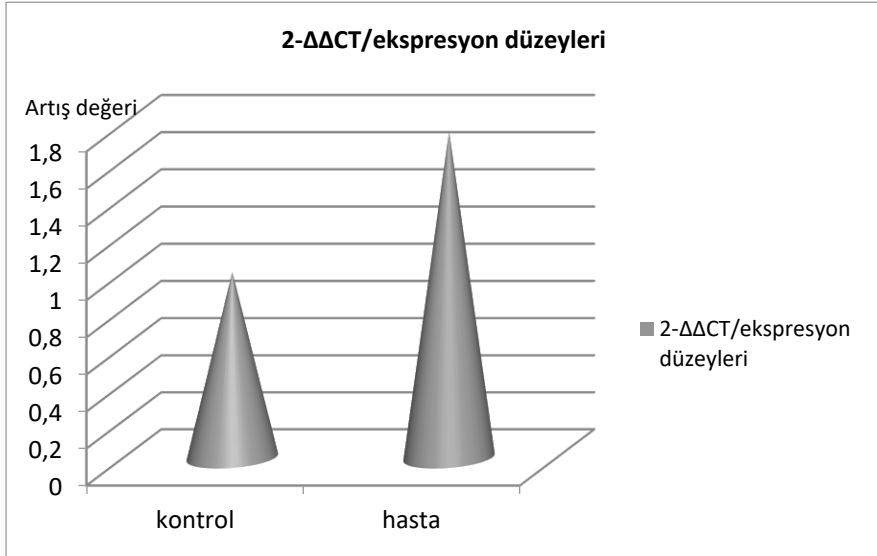
Akciğer kanserli hasta grubu; yaş, cinsiyet ve etnik olarak bire bir eşleştirilmiş sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, *DICER1* gen ifade düzeyinin, $1,756 (2^{-\Delta\Delta C_t} = 0,57)$ kat arttığı saptanmış (Şekil 2) ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Ayrıca *DICER1* geninin artan ifade düzeyi ile hastaların sigara ve alkol kullanma hikâyesi karşılaştırılmış ve istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır ($p > 0,05$). Çalışmada kullanılan vakaların demografik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Akciğer Kanser Hastalarının Demografik ve Klinik Özellikleri

Özellikler	Hasta N=47 (100%)	
Alt gruplar	Kemik metastazlı	42 (92.5%)
	Beyin metastazlı	5 (7.5%)
Histoloji	KHDAK	45 (92.5%)
	KHAK	2 (7.5%)
Cinsiyet	Erkek	39 (84%)
	Kadın	8 (16%)
Hasta Yaş Ort. (SD)	Kadın	57 ($\pm 3,7$)
	Erkek	59 (± 5)
Sağlıklı Yaş Ort. (SD)	Kadın	58 ($\pm 4,2$)
	Erkek	56 ($\pm 6,9$)
Sigara durumu	Kullanıyor	41 (88.7%)
	Kullanmıyor	6 (11.3%)
Alkol hikâyesi	Kullanıyor	24 (50.9%)
	Kullanmıyor	23 (49.1%)

KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri; KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri

Şekil 2: Akciğer Kanserli Hasta Grubu ile Kontrol Grubunun Gen İfade Düzeyleri



Tartışma

Kanserin karmaşık ve heterojen bir hastalık olması sebebi ile karsinogenezde aynı anda çok sayıda genin ekspresyon düzeyinin değiştiği ve bu değişikliklerde miRNA'ların etkisinin oldukça fazla olduğu bilinmektedir. Kanserde miRNA aktivitesi çeşitli mekanizmalarla bozulmaktadır. Bu mekanizmalardan biri de miRNA işlenmesi sırasında meydana gelen moleküler değişikliklerdir. DICER1, microRNA biyogenezinde önemli bir yere sahiptir (Macfarlane & Murphy, 2010). Çalışmamızda, akciğer kanserli hastalarda *DICER1* gen ifade düzeyinde meydana gelen değişiklikler araştırılarak olgun miRNA oluşmasını engelleyen mekanizmalardan birinin incelenmesi ve kanser gelişimine etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca akciğer kanserinde tarama yöntemlerinin radyasyon maruziyeti yaratması veya invaziv doku biyopsileri gibi zorlu prosedürleri içermesi sebebi ile kanseri tespit etmek için daha az maliyetli ve daha kolay tanı koydurabilecek biyolojik moleküllere ihtiyaç vardır. Çalışmamızda akciğer kanserli hastaların periferik kan örneklerinde, miRNA'ların biyogenezinden sorumlu olan *DICER1* geninin ekspresyonundaki değişikliklerin tanısal ve prognostik değeri ile non-invazif bir biyomarker niteliği taşıyıp taşımadığı araştırılmıştır.

DICER1'in mRNA ekspresyonunun önemli bir modülatörü olarak tanımlanmasının ardından, birçok çalışmada, *DICER1* ve diğer miRNA'yı işleyen aile üyelerinin ekspresyonundaki varyasyonun kanser insidansı ve sonucu üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Foulkes et al., 2014). Genel olarak daha düşük seviyelerde tespit edilen *DICER1* ve *DROSHA*'nın akciğer, meme, cilt, endometriyal ve yumurtalık kanserinde kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Foulkes et al., 2014; Karube et al., 2005; Pampalakis, Diamandis, Katsaros, & Sotiropoulou, 2010). Tersine, metastatik prostat kanserinde *DICER1*'in aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (Chiosea et al., 2006). Başka bir çalışmada da oral kanser hücrelerinde gösterilen *DICER1* aşırı ekspresyonunun, hücre proliferasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Jakymiw et al., 2010). Çeşitli kanserlerde *DICER1*'in ifade düzeylerinin artması veya azalması ile ilgili tutarsızlıkların teknik farklılık ve zorluklara, doku özgüllüğüne veya başka bir biyolojik sürece bağlı olup olmadığı açık değildir. Öte yandan akciğer kanserli hastaların parafine fikse edilmiş doku örneklerinden elde edilen histopatolojik alt tiplerinde karşılaştırmalı olarak *DICER1* ekspresyon seviyesine bakılmış ve yassı hücreli karsinomlarda, invaziv adenokarsinomlara göre *DICER1* ifade düzeyinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Chiosea et al., 2007). KHDAK hücre hattı ve parafine fikse edilmiş doku örneklerinde yapılan bir başka çalışmada ise *DROSHA*, *DICER* ve *AGO2*'nin KHDAK gelişimindeki rolü RT-PCR ve İmmünohistokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. *DICER1* ekspresyonunun evre II'de evre I tümörlere göre, evre III'te ise evre II ve evre I tümörlere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmış ve *DICER1*'in tümörün ileri evresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Prodromaki et al., 2015). Çalışmamızda *DICER1* ekspresyon düzeyi sağlıklı kontrollere göre metastatik akciğer kanserli hastaların periferik kanında 1,756 kat oranında artış göstermiş ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). *DICER1*'in miRNA biyogenezindeki birçok fonksiyonunun bilinmesi nedeniyle çalışmamızda akciğer kanserli hastalarda gösterilen bu gen ifadesindeki artışın, tümörün oluşumuna ve ilerlemesine yardımcı olduğunu düşündürmektedir. Metastatik akciğer kanser hastalarının periferik kan lenfositlerinde yapılan çalışmamızdan çıkan sonuçlar literatürde tümör dokusunda yapılan çalışma ile korelasyon göstermektedir. Bu bağlamda periferik kan lenfositlerindeki *DICER1* ekspresyon düzeyinin, metastatik

akciğer hastalarının tümör dokusundaki *DICER1* gen ekspresyon düzeyi hakkında bilgi vereceğini ve dokusuna ulaşamayan hastalar için iyi bir uygulama olacağını düşündürmektedir. Ayrıca çalışma literatürde akciğer kanserli hastaların periferik kan örneklerinde *DICER1* ekspresyonunun araştırıldığı ilk çalışma niteliği taşımaktadır.

Çalışmamızın zayıf yönü olarak, hasta sayısının az olması nedeni ile histopatolojik alt tiplere, cinsiyete ve metastatik alt gruplara göre karşılaştırmaların ayrı ayrı yapılması, aynı hastaların tümör dokusunda da *DICER1* gen ekspresyonunun incelenmesi mümkün olmamıştır. Ancak genel olarak metastatik hastalığa sahip akciğer kanserli hastalar ile sağlıklı kontroller arasında çıkan anlamlı fark bu molekülün hastalığın progresyonunda oldukça önemli olduğunu ön bir bilgi olarak vermiştir. Gelecekte planlanacak çalışmalarda bu eksikliklerin giderilerek kan dolaşımında tespit edilebilen bir biyobelirteç olarak *DICER1* geninin tanısallık gücü hastalığın diyagnoz ve prognozundaki etkisi, daha iyi anlaşılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Alberg, A. J., Ford, J. G., Samet, J. M., & American College of Chest, P. (2007). Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132(3 Suppl), 29S-55S. doi: 10.1378/chest.07-1347
- [2] Bade, B. C., & Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*, 41(1), 1-24. doi: 10.1016/j.ccm.2019.10.001
- [3] Boeri, M., Pastorino, U., & Sozzi, G. (2012). Role of microRNAs in lung cancer: microRNA signatures in cancer prognosis. *Cancer J*, 18(3), 268-274. doi: 10.1097/PPO.0b013e318258b743
- [4] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi: 10.3322/caac.21492

- [5] Cagle, P. T., Allen, T. C., & Olsen, R. J. (2013). Lung cancer biomarkers: present status and future developments. *Arch Pathol Lab Med*, 137(9), 1191-1198. doi: 10.5858/arpa.2013-0319-CR
- [6] Chatziandreou, I., Tsioli, P., Sakellariou, S., Mourkioti, I., Giannopoulou, I., Levidou, G., . . . Saetta, A. A. (2015). Comprehensive Molecular Analysis of NSCLC; Clinicopathological Associations. *PLoS One*, 10(7), e0133859. doi: 10.1371/journal.pone.0133859
- [7] Chen, X., Li, W. F., Wu, X., Zhang, H. C., Chen, L., Zhang, P. Y., . . . Tang, K. F. (2017). Dicer regulates non-homologous end joining and is associated with chemosensitivity in colon cancer patients. *Carcinogenesis*, 38(9), 873-882. doi: 10.1093/carcin/bgx059
- [8] Cheng, L., Alexander, R. E., Maclennan, G. T., Cummings, O. W., Montironi, R., Lopez-Beltran, A., . . . Zhang, S. (2012). Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol*, 25(3), 347-369. doi: 10.1038/modpathol.2011.215
- [9] Chiosea, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Acquafondata, M., McHale, T., Sobol, R. W., & Dhir, R. (2006). Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 169(5), 1812-1820. doi: 10.2353/ajpath.2006.060480
- [10] Chiosea, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Luo, J., Mantha, G., Sobol, R. W., & Dacic, S. (2007). Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, 67(5), 2345-2350. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3533
- [11] Del Vescovo, V., & Denti, M. A. (2015). microRNA and Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol*, 889, 153-177. doi: 10.1007/978-3-319-23730-5_9
- [12] Erson, A. E., & Petty, E. M. (2009). miRNAs and cancer: New research developments and potential clinical applications. *Cancer Biol Ther*, 8(24), 2317-2322. doi: 10.4161/cbt.8.24.10765
- [13] Foulkes, W. D., Priest, J. R., & Duchaine, T. F. (2014). DICER1: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 14(10), 662-672. doi: 10.1038/nrc3802

- [14] Gurtner, A., Falcone, E., Garibaldi, F., & Piaggio, G. (2016). Dysregulation of microRNA biogenesis in cancer: the impact of mutant p53 on Drosha complex activity. *J Exp Clin Cancer Res*, 35, 45. doi: 10.1186/s13046-016-0319-x
- [15] Iwakawa, H. O., & Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol*, 25(11), 651-665. doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.011
- [16] Jakymiw, A., Patel, R. S., Deming, N., Bhattacharyya, I., Shah, P., Lamont, R. J., . . . Chan, E. K. (2010). Overexpression of dicer as a result of reduced let-7 MicroRNA levels contributes to increased cell proliferation of oral cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 49(6), 549-559. doi: 10.1002/gcc.20765
- [17] Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., . . . Takahashi, T. (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*, 96(2), 111-115. doi: 10.1111/j.1349-7006.2005.00015.x
- [18] Lee, S. S., Min, H., Ha, J. Y., Kim, B. H., Choi, M. S., & Kim, S. (2019). Dysregulation of the miRNA biogenesis components DICER1, DROSHA, DGCR8 and AGO2 in clear cell renal cell carcinoma in both a Korean cohort and the cancer genome atlas kidney clear cell carcinoma cohort. *Oncol Lett*, 18(4), 4337-4345. doi: 10.3892/ol.2019.10759
- [19] Macfarlane, L. A., & Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*, 11(7), 537-561. doi: 10.2174/138920210793175895
- [20] Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*, 48(3), 889-902. doi: 10.1183/13993003.00359-2016
- [21] Pampalakis, G., Diamandis, E. P., Katsaros, D., & Sotiropoulou, G. (2010). Down-regulation of dicer expression in ovarian cancer tissues. *Clin Biochem*, 43(3), 324-327. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.09.014

- [22] Prodromaki, E., Korpetinou, A., Giannopoulou, E., Vlotinou, E., Chatziathanasiadou, M., Papachristou, N. I., . . . Papachristou, D. J. (2015). Expression of the microRNA regulators Drosha, Dicer and Ago2 in non-small cell lung carcinomas. *Cell Oncol (Dordr)*, 38(4), 307-317. doi: 10.1007/s13402-015-0231-y
- [23] Ramalingam, S. S., Owonikoko, T. K., & Khuri, F. R. (2011). Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances. *CA Cancer J Clin*, 61(2), 91-112. doi: 10.3322/caac.20102
- [24] Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 16(3), 203-222. doi: 10.1038/nrd.2016.246
- [25] To, S. K. Y., Mak, A. S. C., Eva Fung, Y. M., Che, C. M., Li, S. S., Deng, W., . . . Wong, A. S. T. (2017). beta-catenin downregulates Dicer to promote ovarian cancer metastasis. *Oncogene*, 36(43), 5927-5938. doi: 10.1038/onc.2017.185
- [26] Torre, L. A., Siegel, R. L., & Jemal, A. (2016). Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol*, 893, 1-19. doi: 10.1007/978-3-319-24223-1_1
- [27] Villalobos, P., & Wistuba, II. (2017). Lung Cancer Biomarkers. *Hematol Oncol Clin North Am*, 31(1), 13-29. doi: 10.1016/j.hoc.2016.08.006
- [28] Wakelee, H. A., Chang, E. T., Gomez, S. L., Keegan, T. H., Feskanich, D., Clarke, C. A., . . . West, D. W. (2007). Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol*, 25(5), 472-478. doi: 10.1200/JCO.2006.07.2983
- [29] Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M. S., Giannakakis, A., . . . Coukos, G. (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(24), 9136-9141. doi: 10.1073/pnas.0508889103