



Diagnostic value of microRNAs in prostate cancer patients with prostate specific antigen (PSA) levels between 2, and 10 ng/mL

Prostat spesifik antijen (PSA) değeri 2-10 ng/mL olan hastalarda prostat kanseri saptanmasında mikroRNA'ların tanısai değeri

Serin Akbayır¹, Necati Muşlu², Sema Erden³, Murat Bozlu⁴

ABSTRACT

Objective: Prostate specific antigen (PSA), used for the early diagnosis of prostate cancer (PCa), is one of the best tumour markers known so far. However, in situations when PSA is between 2-10 ng/mL, which is named as grey zone, PSA falls short of distinguishing benign prostate diseases from PCa. On the other hand, it was demonstrated in many previous studies that microRNA (miRNA) could be a marker for cancer. Therefore, in this study, it was aimed to enhance the diagnostic power of PSA, especially with grey zone patients, by the use of miRNA.

Material and Methods: Ninety-four patients included in the study were divided into three groups as "control group" (n=44, PSA=2-10 ng/mL and benign), "PCa 1 group" (n=37, PSA=2-10 ng/mL), and "PCa 2 group" (n=13, PSA >10 ng/mL), according to their pathological results and PSA levels. Free PSA (fPSA) and total PSA (T-PSA) levels were measured with chemiluminometric sandwich immunoassay method. Expressions of miRNAs were analyzed using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. The most appropriate specificity, sensitivity and prediction values were found by drawing the receiver operating characteristic (ROC) curves of total PSA, free/total PSA (f/T PSA) ratio, and miRNAs, and the diagnostic powers were compared with each other.

Results: Diagnostic powers of the f/T PSA ratio and miRNA were compared in PCa 1 and the control groups to determine the marker with higher area under the curve (AUC). It was shown that the diagnostic power of the combination of miR-16-5p and f/T PSA was higher than that obtained when they were used separately.

Conclusion: As a result, while making the the discrimination between benign and malignant prostate in patients with grey zone, it was determined that the combination of miR-16-5p and f/T PSA was more valuable than T-PSA or f/T PSA alone. It was thought that diagnostic role of miRNAs in the early diagnosis of the different stages of PCa needed to be examined in further studies with larger groups.

Keywords: Grey zone; marker; microRNA; prostate cancer.

ÖZ

Amaç: Prostat kanserinin (PCa) erken tanısında kullanılan prostat spesifik antijen (PSA), bilinen en iyi tümör belirteçlerindendir. Bununla birlikte gri zon olarak isimlendirilen PSA'nın 2-10 ng/mL arasında olduğu durumlarda benign prostat hastalıkları ile prostat kanserini ayırmada yetersiz kalmaktadır. Daha önceki çalışmalar mikroRNA'ların (miRNA) kanser için bir belirteç olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada, özellikle gri zon hastalarda PSA'nın tanısai gücünü artırabilmek amacıyla miRNA'ların değeri araştırılmıştır.

Gereç ve yöntemler: Prostat biyopsi sonucu benign olan ve PSA değeri 2-10 ng/mL aralığında olan 44 hasta kontrol, malign olan 37 hasta PCa 1 grubu ve PSA değeri >10 ng/mL ve prostat biyopsi sonucu malign olan 13 hasta ise PCa 2 grubu olarak adlandırıldı. Toplam 94 hasta serumundan serbest PSA (sPSA) ve total PSA (T-PSA) düzeyleri direkt kemiluminometrik sandviç immunoassay yöntemi ile ölçüldü. Plazmadan izole edilen miRNA'ların ekspresyonları ise kantitatif ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) metodu ile çalışıldı. T-PSA, s/T PSA oranı ve miRNA'ların alıcı işletim karakteristik (ROC) eğrileri çizilerek en uygun özgüllük, duyarlılık ve kestirim değerleri bulunarak tanısai güçleri birbirleri ile karşılaştırıldı.

Bulgular: PCa 1 ile kontrol grubu karşılaştırmasında; miRNA'ların tanısai güçleri, daha yüksek eğri altında kalan alana (AUC) sahip olduğu için s/T PSA oranı ile karşılaştırıldı. miR-16-5p ile s/T PSA kombinasyonunun tanısai gücünün tek başına kullanıldığı hallerinden daha iyi olduğu gösterildi.

Sonuç: Gri zondaki hastalarda prostatın benign ile malign ayırımını yaparken miR-16-5p ile s/T PSA kombinasyonunun tek başına T-PSA veya s/T PSA'dan daha değerli olduğu bulundu. Erken tanıda miRNA rollerinin PCa evrelerine göre, daha geniş gruplarla ileri araştırmalarla gösterilebileceğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Gri zon; belirteç; mikroRNA; prostat kanseri.

This study was presented as a poster at the IFCC Worldlab 2014 Congress in Istanbul, on 22-26 June, 2014.

Bu çalışma 22-26 Haziran 2014 tarihli İstanbul IFCC Worldlab 2014 Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

¹Karaman State Hospital, Biochemistry Laboratory, Karaman, Turkey

²Department of Biochemistry, Mersin University School of Medicine, Mersin, Turkey

³Mersin University, Vocational School of Health Services, Mersin, Turkey

⁴Department of Urology, Mersin University School of Medicine, Mersin, Turkey

Submitted:
16.04.2016

Accepted:
23.05.2016

Correspondence:
Serin Akbayır
E-mail:
serinakbayir@hotmail.com

©Copyright 2016 by Turkish Association of Urology

Available online at
www.turkishjournalofurology.com

Giriş

Prostat kanseri (PCa), erkeklerde tüm kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır. İleri yaşlarda görülen, son yıllarda tarama çalışmaları ile daha erken yaşlarda tanı almaya başlayan ve yavaş ilerleyebilen kanserlerdendir.^[1-3] Ülkemiz verilerine göre de erkeklerde görülen kanserler arasında 2. sırada yer almaktadır.^[4]

Etiyolojisi tam olarak netleşme de etnik popülasyonlar ve ülkeler arasında farklı sıklıkta görüldüğü, örneğin Çin ve Japonya'da düşük oranda, Kuzey Amerika ve İskandinav ülkelerinde ise daha yüksek oranda saptandığı, bilinmektedir. Yağlı beslenme, yüksek serum kalsiyum düzeyi, kadmiyum ilişkili meslekler, kronik infeksiyonlar, yüksek androjen seviyeleri ve vazektomi operasyonu ile PCa oluşumunun ilişkili olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır.^[2,3]

Hastaliksız yaşamı artırmak ve mortaliteyi azaltmak için organa sınırlı hastalık durumunda iken PCa tanısının konması önemlidir. Bu amaçla erken tanı için, 50 yaşından sonra yıllık prostat spesifik antijen (PSA) ve parmakla rektal muayene (PRM) kombinasyonu uygulaması önerilmektedir.^[5-7] PSA yüksekliği veya şüpheli PRM olanlarda transrektal ultrason (TRUS) eşliğinde biyopsi, PCa tanısı için altın standart yöntem olarak kullanılmaktadır.^[5-7]

Günümüzde en çok kullanılan tümör belirteci olan PSA'nın, PCa erken tanısı, hastalığın evrelemesi ve tedavinin izleminde önemli katkıları vardır. Lokalize PCa insidansı, PSA ve duyarlılığının artırmak amaçlı kullanılan PSA türevlerinin klinik kullanıma girmesiyle erken dönemde kanser tanısı konulabildiği için, giderek artmıştır. PSA'nın PCa yanında benign hastalıklarda da artması kansere değil organa özgü bir tümör belirteci olduğu görüşünü desteklemiş, ayrıca benign-malign kitle ayırımında özgüllük ve duyarlılığının düşük kalması nedeniyle tümör belirteci olarak değeri sorgulanmaya başlanmıştır. Diğer yandan, özellikle PSA'nın 2-10 ng/mL olduğu değerlerde biyopsi yapılması ve sonrasında tedavi uygulanması yük oluşturmaktadır.^[8,9] Bu nedenle, PCa erken tanısında, girişimsel işlem yapılmadan elde edilebilecek, duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek olan belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla araştırılan moleküllerden biri de mikroRNA'dır (miRNA).

mikroRNA'lar; 21-23 nükleotid uzunluğunda, proteine çevrilmeyen, tek zincirli RNA'lardır.^[10] Mesajcı ribonükleik asit'e (mRNA) tam ya da kısmi bağlanmasına göre yıkımını tetikleyerek veya translasyonunu baskılayarak gen ekspresyonunu düzenleyici rol oynarlar.^[10-12] Genlerinin çoğunun kanser ile ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde veya kırılğan bölgelerde yerleşik olması miRNA'ların neoplazi patogeneğinde önemli rolleri olduğuna işaret etmektedir.^[13]

Normal ile malign dokular arasında miRNA ekspresyon düzeylerinin farklılık göstermesi, ekspresyon şiddeti ile prognoz arasında ilişkinin varlığı yanında doku örnekleri ve vücut sıvılarında uzun süre stabil kalmaları nedeniyle miRNA'ların malign hastalıkların tanı, prognoz ve sınıflamasında yeni belirteçler olabileceklerini düşündürmüştür. Bu amaçla birçok kanser türünde ve PCa'lı gruplarda çalışmalar yapılmıştır.^[14-25]

Bu çalışmada, PSA'nın benign-malign ayırımını yapmakta yetersiz kaldığı düzey olan gri zonda bulunan hastalar hedef alındı. Daha önceki çalışmalarda PCa ile ilişkili bulunan 59 farklı miRNA belirlenerek ekspresyon profilleri çalışıldı. Böylece gri zondaki hastalarda, benign-malign ayırımı yapmada total PSA (T-PSA), serbest/total PSA (s/T PSA) ve miRNA ekspresyon düzeylerinin her birinin ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında tanısal güçlerini değerlendirmek amaçlandı.

Gereç ve yöntemler

Çalışma grubu ve örnek alımı: Ocak 2012 ile Ocak 2013 tarihleri arasında üroloji polikliniğine başvuran, prostat biyopsisi yapılmış hastalar PSA değeri ve patoloji sonuçlarına göre gruplandı. PSA değeri 2-10 ng/mL aralığında olan ve patoloji sonucu benign olan, yaşları 47 ve 83 arasında değişen 44 hasta "kontrol grubu", PSA değeri 2-10 ng/mL aralığında olan ve patoloji sonucu malign olan, yaşları 48 ve 82 arasında değişen 37 prostat kanserli hasta "PCa 1 grubu", PSA değeri >10 ng/mL olan ve biyopsi sonucu malign olan, yaşları 53 ve 81 arasında değişen 13 prostat kanserli hasta ise "PCa 2 grubu" olarak adlandırıldı.

Bu hastalar 18 yaş üstü, PCa nedeniyle ilaç tedavisi almamış, başka bir malignite veya kronik bir hastalık nedeniyle son bir yılda hastaneye yatmamış, PSA değerleri 100 ng/mL üzerinde olmayan ve uzak metastazı bulunmayan katılımcılardır. Çalışmaya katılan hasta ve kontrol gruplarına ait demografik bilgiler kaydedildi. Çalışma Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulun 22.12.2011 tarihli ve 2011/119 sayılı kararınca onaylandı ve çalışmaya katılan tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirilerek yazılı onamları alındı.

Tüm hastaların jelli düz tüplere ve Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere kanları alınarak plazma ve serum eldesi için santrifüj edildi. Advia Centaur XP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown, NY, 10591-5097, USA) hormon otoanalizöründe sPSA ve T-PSA düzeyleri direkt kemiluminometrik sandviç immunoassay yöntemi ile ölçüldü. Plazma örnekleri temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ikinci santrifüjün ardından RNA izolasyonuna kadar 200 µL'si -80°C'de saklandı (ilk santrifüj 4000 rpm'de 15 dakika, ikinci santrifüj 13000 rpm'de 5 dakika).

Tablo 1. Ekspresyon düzeyine bakılan miRNA'lar

let-7a-3p	miR-17-5p	miR-125b-1-3p	miR-146b-5p	miR-25-5p	miR-141-3p	miR-198
let-7a-5p	miR-23a-3p	miR-125b-2-3p	miR-203a	miR-26a-1-3p	miR-141-5p	miR-205-5p
let-7b-3p	miR-23b-3p	miR-143-3p	miR-449a	miR-26a-2-3p	miR-181a-5p	miR-221-3p
let-7b-5p	miR-23b-5p	miR-143-5p	miR-449b-5p	miR-32-3p	miR-181a-2-3p	miR-221-5p
let-7c	miR-100-3p	miR-145-3p	miR-21-3p	miR-32-5p	miR-181c-3p	miR-370
miR-15a-3p	miR-100-5p	miR-145-5p	miR-21-5p	miR-93-3p	miR-181c-5p	
miR-15a-5p	miR-125a-3p	miR-146a-3p	miR-22-3p	miR-93-5p	miR-194-3p	
miR-16-5p	miR-125a-5p	miR-146a-5p	miR-22-5p	miR-135b-3p	miR-194-5p	
miR-16-1-3p	miR-125b-5p	miR-146b-3p	miR-25-3p	miR-135b-5p	miR-196a-3p	

miRNA: mikroRNA

miRNA izolasyonu ve qRT-PCR: Üretici talimatına uygun şekilde, High Pure miRNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak RNA izole edildi ve tekrar kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı. İzole RNA'lardan TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) elde edildi. Bütün reaksiyonlar üretici talimatında belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Reverse transkripsiyon işlemi Gene-Pro Thermal Cycler (B384G, SN: BYQ606002E-060, Kore) kullanılarak yapıldı. cDNA örnekleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi yapılmaya kadar -80°C'de saklandı.

Pre-amplifikasyon işlemi TaqMan PreAmp Master Mix 2X (PN 4391128; Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) ve Megaplex Human Primer Pools Set v3.0 (PN 4444750; Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılarak, üretici talimatında belirtildiği gibi yapıldı. miRNA TaqMan PreAmp Thermal Protokolü Gene-Pro Thermal Cycler (B384G, SN: BYQ606002E-060, Kore) kullanılarak gerçekleştirildi.

Quantitative Real-Time PCR reaksiyonları (qRT-PCR) yüksek kapasiteli BioMark Real-Time PCR sistemi (Fluidigm, South San Francisco, CA, ABD) ile gerçekleştirildi. Pre-amplifiye cDNA örnekleri ile PCR karışımı 96.96 Dynamic Array'ın (Fluidigm, South San Francisco, ABD) örnek kısmına pipetlendi. 1:1 sulandırılmış 20X Assay'ler 96.96 Dynamic Array'ın assay kısmına pipetlendi. BioMark IFC Controller (HX-10273, Fluidigm, San Francisco, CA, ABD) assay ve örnek karışımlarının 96.96 Dynamic Array odacıklarına Fluidigm's Integrated Fluidic Circuit Technology kullanılarak yüklenmiştir. BioMark System ile RT-PCR basamağı üretici talimatlarına göre yapılmıştır.

İstatistiksel analiz

Elli dokuz miRNA (Tablo 1) ekspresyonunun istatistiksel analizleri dolaşımdaki housekeeping gen problemini gideren global

Tablo 2. Kontrol ve hasta gruplarına ait tanımlayıcı bilgiler

Grup	Yaş ortalaması	Alkol (+/-)	Sigara (+/-)	Prostat volümü
Kontrol (n:44)	61,8 yıl	6/38	13/31	50,4 cc
PCa 1 (n: 37)	63,9 yıl	4/33	4/33	42,7 cc
PCa 2 (n:13)	65,5 yıl	2/11	2/11	36,7 cc

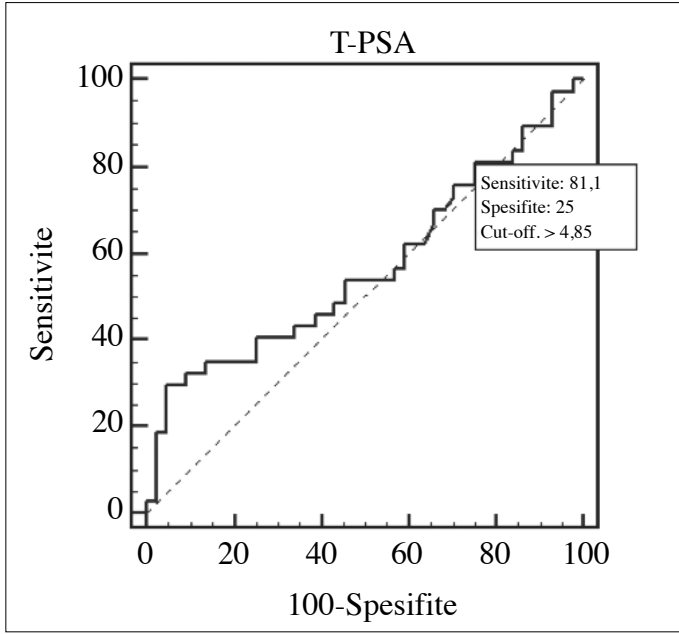
ortalama normalizasyon metodunu kullanan Biogazelle's qbase PLUS 2.0 software (Belgium) ile değerlendirildi. Hasta ve kontrol grupları arasındaki ekspresyon farklılıkları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. miRNA ekspresyon farklılıkları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eşitliği kullanılarak kat değişimi (fold changes) olarak verildi. T-PSA, s/T-PSA ve miRNA ekspresyonlarının tanısal güçleri alıcı işletim karakteristik (receiver operating characteristic; ROC) eğrilerinden elde edilen duyarlılık, özgüllük ve cut-off değerlerine göre değerlendirildi. Bu istatistiksel analizler için MedCalc ve SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Inc; Chicago, IL, ABD) 11,5 istatistik programları kullanıldı. Sonuçların analizleri için ROC Curve ve faktör analizi kullanıldı.

Bulgular

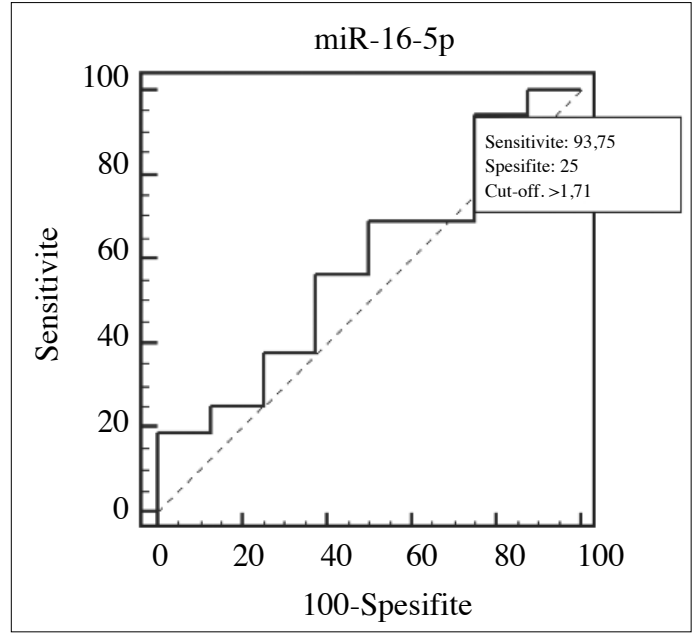
Çalışmaya dahil edilen gruplara ait tanımlayıcı bilgiler Tablo 2'de verildi.

PCa 1 grubu ile kontrol grubunun T-PSA ve s/T PSA oranı verileri karşılaştırılarak, ROC eğrileri çizildi (Şekil 1, 2). Duyarlılık (sensitivite) ve özgüllükleri (spesifite) için optimum değerler belirlenerek bunlara karşılık gelen kestirim değerleri (cut-off) seçildi.

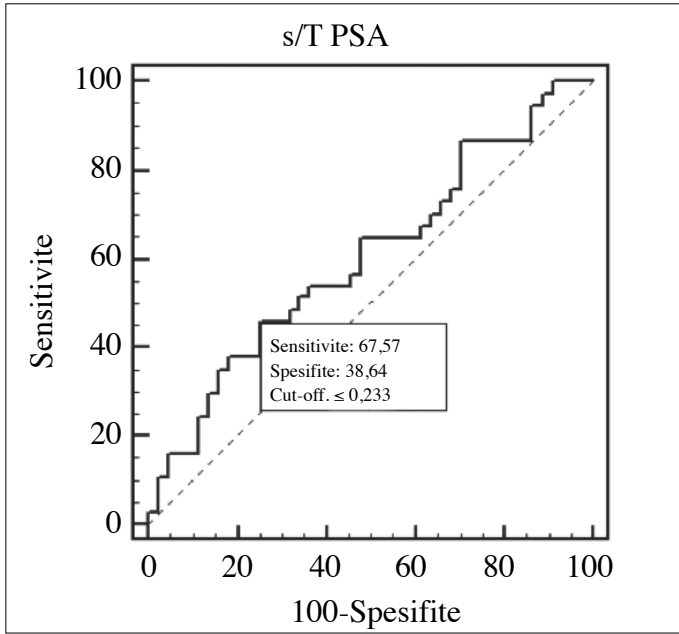
Prostat spesifik antijenin kestirim değeri $>4,85$ ng/mL iken duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla; %81,1 ve %25 idi. s/T PSA oranının kestirim değeri $\leq 0,233$ ($\leq 0,23,3$) iken duyarlılığı ve özgüllüğü



Şekil 1. PCa 1 ile kontrol gruplarında T-PSA'nın ROC eğrisi (AUC=0,566)



Şekil 3. PCa 1 ile kontrol gruplarında miR-16-5p ROC eğrisi (AUC=0,586)



Şekil 2. PCa 1 ile kontrol gruplarında s/T PSA oranının ROC eğrisi (AUC=0,602)

lüğü sırasıyla %67,57 ve %38,64 idi. T-PSA ve s/T PSA oranının eğri altında kalan alanı (area under the curve; AUC) sırasıyla; 0,566 (p=0,3206) ve 0,602 (p=0,1109) olarak hesaplandı.

PCa 1 ile kontrol grup karşılaştırmasında, ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı olan miRNA'lar belirlenerek ROC eğrileri

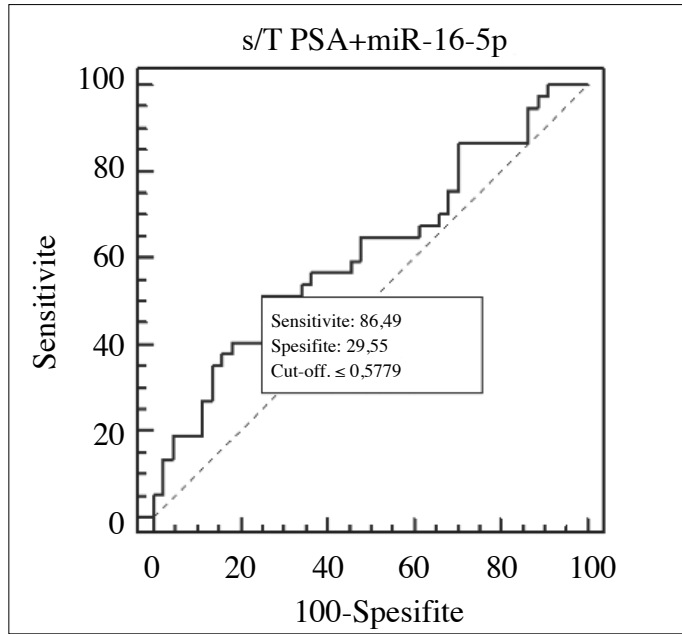
Tablo 3. PCa 1 ile kontrol gruplarında, ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı görülen miRNA'lar

Artan miRNA'lar	Azalan miRNA'lar
miR-16-5p	miR-203a
miR-17-5p	
miRNA: mikroRNA	

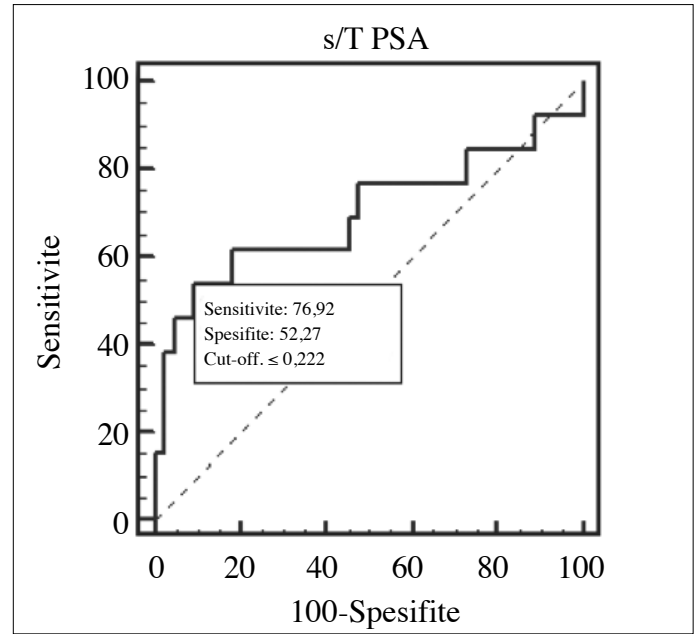
çizildi ve bunlar arasında AUC'si s/T PSA oranına yakın ve yüksek olan miRNA'lar ile duyarlılığı ve tanısal güçleri karşılaştırıldı. Bu iki grup arasında, bakılan miRNA'lar açısından istatistiksel fark bulunamadı (p>0,05).

PCa 1 ile kontrol grupları arasında miRNA ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da bazı miRNA'lar için hem global ortalamaya göre, hem de gruplar arası karşılaştırmaya göre 2 ve üzerinde kat değişimi olduğu görüldü ve bu değişimler anlamlı olarak değerlendirildi. İki kat ve üzerinde değişim görülen miRNA'lar Tablo 3'te verildi.

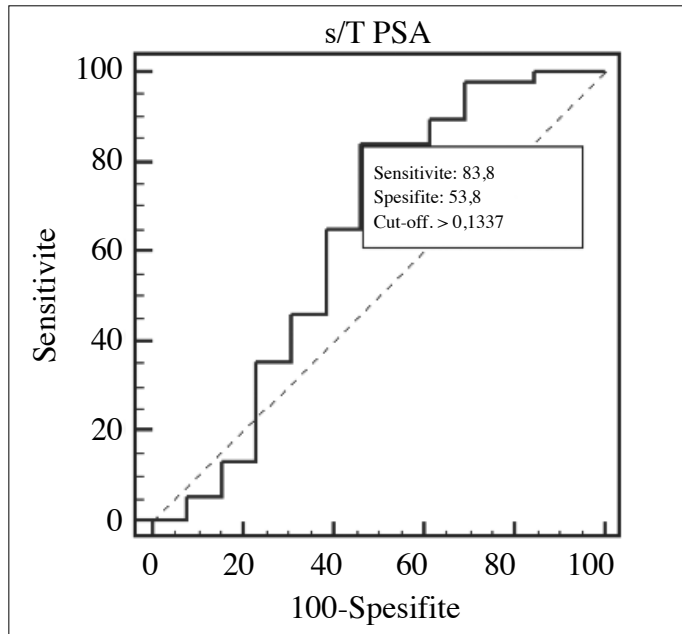
Kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) değerleri baz alınarak gruplar arası karşılaştırma ile anlamlı kat artışının belirlendiği bu 3 miRNA'nın tanısal gücünü değerlendirmek için MedCalc istatistik programı kullanılarak ROC eğrileri çizildi. Optimum özgüllük ve duyarlılık değerleri temel alınarak her bir parametrenin kestirim değerleri belirlendi. Bunlar arasından yalnızca miR-16-5p'nin AUC değerleri diğerlerine göre daha yüksek olarak değerlendirildi.



Şekil 4. PCa 1 ile kontrol gruplarında s/T PSA + miR-16-5p kombinasyonu ROC eğrisi (AUC=0,616)



Şekil 6. PCa 2 ile kontrol gruplarında s/T PSA oranı ROC eğrisi (AUC=0,698)



Şekil 5. PCa 1 ve PCa 2 gruplarında s/T PSA oranı karşılaştırılmasında ROC eğrisi (AUC=0,628)

miR-16-5p için kestirim değeri >1,71 kat iken duyarlılığı %93,75 ve özgüllüğü %25 idi. Buna göre AUC değeri 0,586 ($p=0,5080$) olarak hesaplandı (Şekil 3). s/T PSA oranı AUC'sinden daha düşük değere sahip olsa da bu üç miRNA arasında en yüksek AUC değerine sahip olan miR-16-5p seçilerek s/T PSA oranı ile kombine ROC eğrileri çizilerek değerlendirildi (Şekil 4).

Tablo 4. PCa 1 ve PCa 2 grupları arasında, ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı görülen miRNA'lar

Azalan miRNA'lar

miR-25-3p miR-194-5p

miR-125b-5p miR-203a

miRNA: mikroRNA

PCa 1 ve PCa 2 karşılaştırmasında, s/T PSA oranı için kestirim değeri >0,1337 (>%13,37) olduğunda optimum duyarlılık %83,8 ve optimum özgüllük %53,8 idi. AUC'si ise 0,628 ($p=0,2448$) olarak hesaplandı (Şekil 5). T-PSA>10 ng/mL olan PCa 2 grubunda bazı miRNA'ların ekspresyonları azalmış olsa da (Tablo 4), bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Gruplar arası kat farkı bulunan 4 miRNA'nın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine göre ROC eğrileri çizildi. Bu dört miRNA'nın da AUC'si s/T PSA oranından daha yüksek değerlere sahipti. PCa 1 ve PCa 2 gruplarında s/T PSA oranından daha yüksek AUC değerine sahip olan bu dört miRNA'nın her biri tek tek ve dördü birlikte s/T PSA ile beraber ROC eğrileri çizilerek değerlendirildi, tanısal güçleri karşılaştırıldı (Tablo 5).

PCa 2 grubu ile kontrol gruplarının s/T PSA oranları karşılaştırıldı (Şekil 6). PCa 2 ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamasa da Tablo 6'da gösterilen miRNA'ların gruplar arasında iki ve üstü kat farkının olduğu görüldü. s/T PSA oranı AUC değerinden daha yüksek değere sahip olan iki miRNA belirlendi, miR-125b-5p ve miR-194-5p. PCa 2

Tablo 5. PCa 1 ve PCa 2 grup karşılaştırmasında, ROC eğrileri çizilen parametrelerin verileri

Parametre	Cut-off	AUC	Duyarlılık	Özgüllük
s/T PSA	%13,37	0,628	%83,8	%53,8
miR-25-3p	3,821 kat	0,708	%85,7	%41,67
miR-125b-5p	2,41 kat	0,744	%100	%61,54
miR-194-5p	1,05 kat	0,933	%100	%80
miR-203a	1,038 kat	0,667	%100	%41,67
s/T PSA+miR-25-3p	0,4314	0,647	%84,62	%18,92
s/T PSA+miR-125b-5p	-0,2997	0,601	%76,92	%35,14
s/T PSA+miR-194-5p	0,9065	0,672	%92,31	%24,32
s/T PSA+miR-203a	0,4082	0,707	%92,31	%32,43
s/T PSA+4 miRNA	-0,033	0,576	%92,31	%37,84

ROC: alıcı işletim karakteristik (receiver operating characteristic) eğrileri; AUC: eğri altında kalan alanı (area under the curve); s/T PSA: serbest/total PSA oranı; miRNA: mikroRNA

Tablo 6. PCa 2 ile kontrol gruplarında ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı görülen miRNA'lar

Artan miRNA'lar	Azalan miRNA'lar
miR-181c-5p	miR-25-3p
	miR-125b-5p
	miR-194-5p
miRNA: mikroRNA	

Tablo 7. PCa 2 ile kontrol grup karşılaştırmasında, ROC eğrileri çizilen parametrelerin verileri

Parametre	Cut-off	AUC	Duyarlılık	Özgüllük
s/T PSA	%22,2	0,698	%76,92	%52,27
miR-125b-5p	2,41 kat	0,818	%100	%72,73
miR-194-5p	1,05 kat	0,806	%100	%50
s/T PSA+miR-125b-5p	0,6651	0,626	%84,62	%25
s/T PSA+2 miRNA	-0,4915	0,532	%84,62	%29,55

ROC: alıcı işletim karakteristik (receiver operating characteristic) eğrileri; AUC: eğri altında kalan alanı (area under the curve); s/T PSA: serbest/total PSA oranı; miRNA: mikroRNA

ile kontrol gruplarında s/T PSA oranından daha yüksek AUC değerine sahip olan miR-125b-5p ve miR-194-5p'nin her biri tek tek ve ikisi birlikte s/T PSA ile beraber ROC eğrileri çizilerek tanısal güçleri karşılaştırıldı (Tablo 7).

Tartışma

PCa 1 ve kontrol gruplarının T-PSA verileri ile elde edilen ROC eğrileri sonuçları literatür ile uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızdaki cut-off değeri 4,85 ng/mL, duyarlılığı %81,1 ve özgüllüğü %25 iken, literatürde cut-off değeri 3,9 ng/mL alındığında %85 duyarlılık ve %25 özgüllükle benign hastaları malign olandan ayırabildiği gösterilmiştir.^[8] Çalışmamızda s/T PSA oranının cut-off değeri %23,3 iken duyarlılığı %67,57, özgüllüğü %38,64 idi ve bu sonuçlar önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumluydu. Nitekim önceki çalışmalarda s/T PSA oranı için %14-25 aralığının eşik değer olarak kullanılması önerilmiştir.^[26]

Prostat kanseri tanısı için gri zon PSA değerlerine sahip hastalarla yapılan çalışmalarda s/T PSA'nın tanısal gücünün T-PSA'dan daha iyi olduğu gösterilmiştir.^[8,26] Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak T-PSA (0,566) ve s/T PSA (0,602) ROC eğrileri arasından s/T PSA'nın daha yüksek AUC'ye sahip olması nedeniyle daha iyi ayırım yapabileceği gösterilmiştir.

PCa 1 ile kontrol karşılaştırmasında benign-malign ayırımı için tanısal güçlerini değerlendirdiğimiz miRNA'ların ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı olanların (miR-16-5p, miR-17-5p, miR-203a) ROC eğrileri çizildi. Ancak s/T PSA'dan daha

yüksek AUC değerine sahip bir miRNA yoktu. Kontrol grubuna göre kanserli hastalarda arttığı görülen ve s/T PSA oranı AUC değerine en yakın AUC değeri olan miR-16-5p ile s/T PSA kombinasyonunun tanısal gücü değerlendirildi. Elde edilen AUC, tek başına her iki parametrenin sahip olduğundan daha yüksek bulunmuştur (0,616). Çalışmamız bu kombinasyonun tanısal gücünün daha iyi olduğunu göstermektedir.

Prostat doku örneklerinden yapılan iki çalışmada da miR-16 (yeni isimlendirmede miR-16-5p) ekspresyonu benign prostat dokusu ile karşılaştırıldığında kanserli dokuda azaldığı gösterilmiş, PCa'da metastazı baskılayıcı özelliği olduğu ve metastaz gelişimi ile korele olduğu ileri sürülmüştür.^[27,28] Lokalize ve metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserli hastalarda yapılan ve bu iki patolojik durumun ayırımında belirteç olarak değerlendirildiği çalışmada miR-16 ekspresyonunun lokalize gruba göre metastazlı grupta azaldığı görülmüştür.^[29] Mahn ve ark.^[30] prostat dokuları ve hasta serumlarını karşılaştırdıkları miRNA ekspresyonu çalışmasında; malign ve normal doku miR-16 ekspresyon düzeyleri arasında fark görülmemiş, kanserli hasta serumlarında BPH ve sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu, prostatektomi sonrasında ise işlem öncesine göre azaldığı gözlenmiştir.

miR-16, bazı yayınlarda malign ve benign hastalarda ekspresyon düzeyi farklı olmadığı için plazma miRNA ekspresyon profillemesi için *housekeeping* olarak alındığı görülmüştür. Bazı çalışmalarda kanserli hasta örneklerinde azaldığı yönünde sonuçlar bulunmakta iken çalışmamızda, Mahn ve ark.^[30] serumdan elde edilen sonuçları ile benzer şekilde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kat farkı olarak artmış olduğu görüldü.^[31-33]

Çalışmamızda PCa 1 ve PCa 2 gruplarının verileri ile oluşturulan s/T PSA oranı ROC eğrilerine göre AUC'si hesaplandı (0,628). Anlamlı kat farkı olduğu görülen miR-25-3p, miR-125b-5p, miR-194-5p ve miR-203a'nın PCa 2 grubunda azaldığı görüldü. Her bir miRNA'nın tek tek ve hepsi birlikte s/T PSA oranı ile kombine edilerek ROC eğrileri oluşturulduğunda; miR-194-5p'nin tek başına AUC değeri (0,933) istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,0001$) ve en iyi tanı gücüne sahip olan parametre idi. Kombine olanlardan ise s/T PSA + miR-203a'nın sonuçları diğerlerine göre daha yüksek olarak hesaplandı (AUC=0,707) ve istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p=0,0131$).

Tong ve ark.^[34] prostatektomi örneklerinden qRT-PCR yöntemi ile miRNA ekspresyon profillemesi yaptıkları çalışmada, miR-194 ekspresyonunun (yeni isimlendirmede miR-194-5p) kanserli grupta arttığı gösterilmiştir. Değişmiş miRNA ekspresyonunun prostattaki onkojenik sürece eşlik ettiğini, buldukları anormal miRNA ekspresyonlarının erken hastalık nüks eğilimini yansıtır olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Plazmadan izole edilen ve PSA değerine göre ayrılan iki hasta grubunun karşılaştırıldığı bu

çalışmamızda ise miR-194-5p ekspresyon düzeylerinin PCa 2 grubunda azaldığını bulduk. Doku ve plazma örnekleri ekspresyon düzeyleri arasında farklılık olabileceğini gösteren çalışmaların olması bu çalışma ile literatür arasındaki farklılığın sebebi olabileceğini düşündürmektedir.^[30]

Malign ve normal prostat dokusu örneklerinden real-time PCR ile miR-203 (yeni isimlendirmede miR-203a) ekspresyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-203'ün ilerlemiş prostat kanserlerinde korele olarak azaldığı gösterilerek, "anti-metastatik" olduğu ileri sürülmüştür.^[35] Çalışmamızda da literatürle uyumlu şekilde miR-203a ekspresyon düzeylerinin azaldığı görüldü.

PCa 2 ile kontrol karşılaştırmasında s/T PSA oranı verileri ile oluşturulan ROC eğrileri değerlendirilerek AUC değeri hesaplanmıştır (0,698). Grup karşılaştırmaları sonucu azalmış olarak bulunan miR-125b-5p ve miR-194-5p'nin AUC değerleri s/T PSA oranı AUC değerinden daha yüksek olarak hesaplandı (sırasıyla; 0,818 ve 0,806). Sonrasında tek tek ve beraber s/T PSA oranı ile kombine olarak elde ettiğimiz ROC eğrilerine göre; miR-125b-5p ve miR-194-5p ekspresyonlarının tek başlarına s/T PSA'dan daha yüksek tanısal güce sahip olduğu söylenebilir.

Literatürde miR-125b (yeni isimlendirmede miR-125b-5p) ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır; bazı yayınlarda onkomir olduğu ve prostat kanserlilerde ekspresyonunun arttığı bulunurken, bazı çalışmalarda ise azaldığı gözlenmiştir.^[25,28,29,31-34,36-39] Mitchell ve ark.^[22] metastatik prostat kanserli ve kontrol hastalarının serum örneklerinden qRT-PCR yöntemi ile miRNA ekspresyonlarını karşılaştırmışlar ve kanserli grupta miR-125b ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğunu raporlamışlardır. Özen ve ark.^[36], benign ve prostat kanserli dokudaki miRNA'ların ekspresyonunu karşılaştırmış ve lokalize prostat kanserli dokuda miR-125b ekspresyonunun daha düşük olduğunu görmüşler. Çalışmamızda miR-125b ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kanserli grupta azalmış olarak bulduk.

Çalışmaların çoğunda malign-benign ayırımı için taramada kullanılacak, PSA'nın tanısal gücünü artıracak ya da tek başına daha güçlü bir belirteç olarak kullanılabilecek biyobelirteç bulunması amaçlanmaktadır. Çalışmamızda gri zondaki hastalarda s/T PSA + miR-16-5p kombinasyonunun tek başına T-PSA veya s/T PSA oranı kullanımından daha iyi tanısal gücünün olması önemli bir bulgudur.

PSA değeri >10 ng/mL olan PCa 2 grubundaki miR-194-5p ekspresyonu azalması prostat malignitesi varlığını destekleyebilir ve prognozla ilişkili olabilir. PSA düzeyi >10 ng/mL olan prostat kanseri hastaları ile PSA değeri 2-10 ng/mL aralığında olan benign grup karşılaştırıldığında ise; miR-125-5p ve miR-194-5p ekspresyonlarındaki azalmanın malignite lehine olduğunu ve s/T PSA'dan daha iyi şekilde bu ayırımı yapabildiğini saptadık. An-

cak PSA'nın >10 ng/mL olduğu durumlarda biyopsi kaçınılmaz olduğu için, tarama amaçlı belirteç kullanımı girişimsel işleme maruziyeti azaltmayacak, tanıya gidişi hızlandırmayacaktır.

miRNA ekspresyon profillemeye çalışmalarında; farklı evredeki kanser gruplarının karşılaştırılması, kontrol olarak BPH'lı hasta ya da sağlıklı gönüllülerin alınması, farklı örneklerden izole edilmesi, farklı büyüklükteki popülasyonlardan çalışma yapılması, izolasyon ve ekspresyon değerlendirme yöntemlerinin farklı olması gibi birçok nedenden dolayı çelişkiler olabilmektedir. Küçük popülasyonlarda yapılan çalışmaların geneli ne kadar yansıttığı bilinmeli, iyi bir örneklem grubu seçilmelidir. Sonuçların dağılımının geniş olması ile beraber çelişkili verilerin elde edilmesine sebep olabileceği unutulmamalıdır.

Çalışmamızda rahatlıkla elde edilebilen örneklerden çalışılması, çok sayıda örneği birkaç saatlik tek bir PCR işleminden sonra elde edilen verilerle değerlendirebilmek büyük bir avantajdır. Doku eldesi, miRNA'ların izolasyonu, seçilen yöntemin uzun ve zahmetli olması gibi durumlar çalışmanın verimini de etkileyecektir. Erken tanı için kullanılacak tarama amaçlı her türlü analizin kısa, kolay, ucuz olması, örneğin kolay elde edilmesi istenmektedir.

Sonuç olarak, daha geniş ve evrelerine göre gruplandırılmış popülasyonlarla planlanacak araştırmalarda miRNA ekspresyon profillerinin çalışılmasının Pca'nın erken tanısında miRNA'ların kullanılabilmesini sağlayacağını düşünmekteyiz.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Mersin University School of Medicine (22.12.2011, 2011/119).

Informed Consent: Written informed consent was obtained from patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – N.M.; Design – S.A., N.M.; Supervision – N.M.; Resources – S.A., N.M., M.B.; Materials – S.A.; Data Collection and/or Processing – S.A., S.E.; Analysis and/or Interpretation – S.A., N.M., S.E., M.B.; Literature Search – S.A., N.M.; Writing Manuscript – S.A.; Critical Review – S.A., N.M., M.B.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was supported by Mersin University Scientific Research Projects Units as BAP-TF TTB (SA) 2012-1 TU coded project.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden (22.12.2011, 2011/119) alınmıştır.

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – N.M.; Tasarım – S.A., N.M.; Denetleme – N.M.; Kaynaklar – S.A., N.M., M.B.; Malzemeler – S.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – S.A., S.E.; Analiz ve/veya Yorum – S.A., N.M., S.E., M.B.; Literatür Taraması – S.A., N.M.; Yazıyı Yazan – S.A.; Eleştirel İnceleme – S.A., N.M., M.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma BAP-TF TTB (SA) 2012-1 TU kodlu proje olarak Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer Clin* 2016;66:7-30. [CrossRef]
2. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003;361:859-64. [CrossRef]
3. Reiter RE, deKernion JB. Epidemiology, Etiology, and Prevention of Prostate Cancer. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (eds). *Campbell's Urology*, Volume 4. 8th ed. Philadelphia, London New York, St. Louis, Sydney, Toronto. Saunders 2002;3003-24.
4. Aydın S, Boz MY. Rapid changes in the incidence of urinary cancers in Turkey. *Turk J Urol* 2015;41:215-20. [CrossRef]
5. Smith RA, Mettlin CJ, Davis KJ, Eyre H. American Cancer Society Guidelines for the early detection of cancer. *CA Cancer J Clin* 2000;50:34-49. [CrossRef]
6. Carroll P, Coley C, McLeod D, Schellhammer P, Sweat G, Wasson J, et al. Prostate specific antigen best practice policy. Part I. Early detection and diagnosis of prostate cancer. *Urology* 2001;57:217-24. [CrossRef]
7. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: Results of a multicenter clinical trial of 6630 men. *J Urol* 1994;151:1283-90.
8. Alkibay T, Gürocak S. Tümör immünolojisi ve tümör belirleyiciler. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. Temel Üroloji. 3. Baskı. Ankara: Öncü Basımevi, 2007. p. 687-98.
9. Deliveliotis C, Alivizatos G, Stavropoulos N, Makrychoritis K, Koutsokalis G, Kiriakakis Z, et al. Influence of digital examination, cystoscopy, transrectal ultrasonography and needle biopsy on the concentration of prostate specific antigen. *Urol Int* 1994;53:186-90. [CrossRef]
10. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE* 2007;367:re1. [CrossRef]
11. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993;75:843-54. [CrossRef]
12. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011;12:99-110. [CrossRef]
13. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at

- fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999-3004. [\[CrossRef\]](#)
14. Kong W, Zhao JJ, He L, Cheng JQ. Strategies for profiling microRNA expression. *J Cell Physiol* 2009;218:22-5. [\[CrossRef\]](#)
 15. Blenkiron C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet* 2007;16:R106-13. [\[CrossRef\]](#)
 16. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer* 2008;122:969-77. [\[CrossRef\]](#)
 17. Nelson PT, Baldwin DA, Scearce LM, Oberholtzer JC, Tobias JW, Mourelatos Z. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods* 2004;1:155-61. [\[CrossRef\]](#)
 18. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA* 2007;13:1668-74. [\[CrossRef\]](#)
 19. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol* 2007;7:36. [\[CrossRef\]](#)
 20. Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, Master SR, Baldwin DA, Tobias JW, et al. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr Pathol* 2007;18:163-73. [\[CrossRef\]](#)
 21. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 2008;10:203-11. [\[CrossRef\]](#)
 22. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating micro-RNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10513-8. [\[CrossRef\]](#)
 23. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 2006;5:24. [\[CrossRef\]](#)
 24. Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Wallace TA, Howe TM, Yfantis HG, et al. Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer. *Prostate* 2008;68:1152-64. [\[CrossRef\]](#)
 25. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* 2007;67:6130-5. [\[CrossRef\]](#)
 26. Tefik T, Şanlı Ö, Esen T. Klinik pratikte prostat biyopsi endikasyonu için PSA'nın kullanımı. Baltacı S. Ürolojide Yeni Ufuklar. Ankara: Ayrıntı Basımevi, 2010. p. 19-32.
 27. Watahiki A, Wang Y, Morris J, Dennis K, O'Dwyer HM, Gleave M, et al. MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. *PLoS ONE* 2011;6:e24950. [\[CrossRef\]](#)
 28. Hellwinkel OJC, Sellier C, Sylvester YJ, Brase JC, Isbarn H, Erbersdobler A, et al. A cancer-indicative microRNA pattern in normal prostate tissue. *Int J Mol Sci* 2013;14:5239-49. [\[CrossRef\]](#)
 29. Watahiki A, Macfarlane RJ, Gleave ME, Crea F, Wang Y, Helgason CD, et al. Plasma miRNAs as biomarkers to identify patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Int. J Mol Sci* 2013;14:7757-70. [\[CrossRef\]](#)
 30. Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology* 2011;77:1265 e9-e16.
 31. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008;14:844-52. [\[CrossRef\]](#)
 32. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 2008;14:1271-7. [\[CrossRef\]](#)
 33. Schaefer A, Jung M, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Erbersdobler A, et al. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Exp Mol Med* 2010;42:749-58. [\[CrossRef\]](#)
 34. Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, et al. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Therapy* 2009;16:206-16.
 35. Saini S, Majid S, Yamamura S, Tabatabai L, Suh SO, Shahryari V, et al. Regulatory role of miR-203 in prostate cancer progression and metastasis. *Clin Cancer Res* 2011;17:5287-98. [\[CrossRef\]](#)
 36. Özen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 2008;27:1788-93. [\[CrossRef\]](#)
 37. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 2010;126:1166-76.
 38. Shi XB, Xue L, Ma AH, Tepper CG, Kung HJ, White RW. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting proapoptotic genes. *Prostate* 2011;71:538-49. [\[CrossRef\]](#)
 39. Szczyrba J, Loprich E, Wach S, Jung V, Unteregger G, Barth S, et al. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Mol Cancer Res* 2010;8:529-38. [\[CrossRef\]](#)